

TECHNICAL MANUAL

Y Chromosome AZF Analysis System



Productos sanitarios
para diagnóstico
in vitro



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hanover, Alemania



INSTRUCCIONES DE
USO DEL PRODUCTO
MD1631



PROMEGA
2800 Woods Hollow Rd.
Madison, WI USA

Printed in USA
Revised 3/14
Part# TM252

Y Chromosome AZF Analysis System



Manual técnico TM252

INSTRUCCIONES DE USO DEL PRODUCTO MD1631.

Toda la literatura técnica se encuentra disponible en Internet en www.promega.com
Visite nuestra web para verificar que está utilizando la versión más reciente de este manual técnico.

1.	Uso previsto del producto.....	1
2.	Descripción	2
3.	Componentes del producto	3
4.	Consideraciones generales	3
A.	Muestra patrón de ADN	3
B.	Condiciones de PCR	4
C.	Termocicladores	4
D.	Control de la contaminación	5
E.	Reacciones de control	5
5.	Reacciones de amplificación	5
A.	Preparación de la reacción.....	6
B.	Protocolo de ciclo térmico mediante PCR óptimo para el termociclador Perkin-Elmer Model 480	8
C.	Electroforesis en gel de agarosa	8
D.	Análisis de los datos: controles.....	9
E.	Análisis de los datos: muestras experimentales	10
6.	Bibliografía	11
7.	Apéndice.....	11
A.	Composición de tampones y soluciones	11
B.	Hojas de cálculo.....	12

1. Uso previsto del producto

El Y Chromosome AZF Analysis System^(a) cumple los requisitos de la Directiva 98/79/CE de la Unión Europea sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro. El Y Chromosome AZF Analysis System proporciona un método multiplex basado en PCR para analizar la integridad de la región AZF del cromosoma Y humano. El Y Chromosome AZF Analysis System está pensado para su uso como parte de un plan de diagnóstico con objeto de caracterizar la infertilidad masculina. Los resultados del diagnóstico obtenidos mediante este sistema se deben interpretar junto con otros datos clínicos o de laboratorio. Esta información resulta potencialmente útil para los pacientes que se estén planteando la fertilización in vitro, puesto que las deleciones situadas en la región AZF del cromosoma Y se transmiten a los descendientes masculinos engendrados mediante fertilización in vitro, lo que tiene como resultado la infertilidad del niño.



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hanover,
Alemania

2. Descripción

El Y Chromosome AZF Analysis System proporciona un método para la detección de la región AZF del cromosoma Y humano. El sistema consta de 20 pares de cebadores que son homólogos a sitios con secuencias marcadas previamente identificados y cartografiados (SSM; 1-7). Estos cebadores amplificarán los segmentos cortos de ADN no polimórficos del cromosoma Y al utilizarlos en reacciones en cadena de la polimerasa (PCR; 6,8). Los cebadores se han combinado en cinco juegos de Multiplex Master Mix para su uso en PCR multiplex. Esto permite determinar la presencia o la ausencia de las 20 SSM realizando cinco amplificaciones mediante PCR simultáneas (figura 1). Las deleciones del cromosoma Y localizadas en las regiones amplificadas por estos juegos de cebadores se han asociado con la infertilidad masculina (1,2,6,9-17). En general, las regiones adyacentes del cromosoma Y no aparecen como productos de amplificación secuenciales dentro de una única reacción de amplificación multiplex. Las excepciones son las regiones SY242 y SY208 del locus DAZ, que aparecen representadas como productos de amplificación secuenciales en las reacciones con Multiplex B Master Mix, y las regiones SY84 y SY86 de los loci DYS273 y DYS148 que aparecen representadas como productos de amplificación secuenciales en las reacciones con Multiplex E Master Mix.

Las Multiplex Master Mixes A-D contienen un par de cebadores de control que amplifican los fragmentos del locus SMCX ligado al cromosoma X. La quinta Multiplex Master Mix, Multiplex E, contiene un par de cebadores de control que amplifica una región única tanto del ADN masculino como femenino (ZFX/ZFY). Estos pares de cebadores de control son controles internos para las reacciones de amplificación multiplex y prueban la integridad de la muestra de ADN genómico. Finalmente, la Multiplex E Master Mix también incluye un par de cebadores que amplifica una región del gen SRY, que actúa como amplificación de control para el factor determinante testicular situado en el brazo corto del cromosoma Y humano.

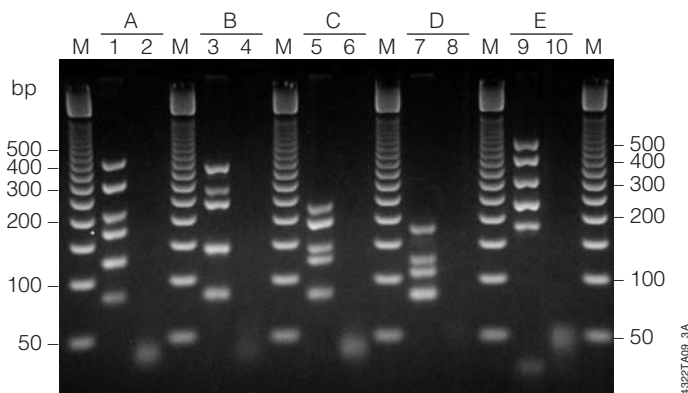
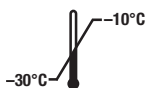


Figura 1. Ejemplo de amplificación de ADN genómico masculino. Amplificación de ADN genómico masculino (MD115A) (calles 1, 3, 5, 7, 9), así como de control negativo sin ADN (calles 2, 4, 6, 8, 10), para cada una de las Multiplex Master Mixes.

3. Componentes del producto

Producto	Tamaño	Nº de cat.
Y Chromosome AZF Analysis System	25 reacciones	MD1631

Prohibida su venta en Estados Unidos. Sólo para exportación. El Y Chromosome AZF Analysis System incluye:



• MD154A	Multiplex A Master Mix	500 µl
• MD155A	Multiplex B Master Mix	500 µl
• MD156A	Multiplex C Master Mix	500 µl
• MD157A	Multiplex D Master Mix	500 µl
• MD158A	Multiplex E Master Mix	500 µl
• M300C	GoTaq® DNA Polymerase(c)	200 u
• P119F	Nuclease-Free Water	1,25 ml
• G452C	50bp DNA Step Ladder (340 ng/µl)	90 µg
• MD115A	Male Genomic DNA (50 ng/µl)	2,5 µg
• G190B	Blue/Orange 6X Loading Dye	1 ml

Condiciones de almacenamiento: Conserve todos los componentes de -10 a -30°C. Evite realizar múltiples ciclos de congelación-descongelación.



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hanover, Alemania

4. Consideraciones generales

A. Muestra patrón de ADN

La concentración, la pureza y el tamaño del ADN constituyen consideraciones importantes con el fin de asegurar unos resultados satisfactorios con el Y Chromosome AZF Analysis System. Un ADN de mala calidad puede tener como resultado un aumento del la amplificación de fondo o un fallo de la amplificación. El fallo de la amplificación se puede manifestar como una ausencia completa de amplificación en todas las bandas con las Mutiplex Master Mixes o como la formación de subpoblaciones residuales de alelos en las mezclas maestras individuales. Con el fin de evitar esto, utilice únicamente ADN de alta calidad con una proporción de absorbancia $A_{260}/A_{280} \geq 1,8$. El ADN no se debe someter a esfuerzos cortantes y debe estar libre de proteínas contaminantes, de etanol o de sales (especialmente EDTA; la concentración de EDTA debe ser $<0,4$ mM).

Cuantifique el ADN antes de su uso en el Y Chromosome AZF Analysis System, dado que la adición de una cantidad demasiado grande o demasiado pequeña de ADN puede hacer que las reacciones fallen. Para la estimación de la concentración de ADN se pueden utilizar las medidas espectrofotométricas (absorbancia) a 260 nm (A_{260}) en las que $1 \text{ uA} = 50 \text{ µg}$ de ADN bicatenario/ml. En cada reacción de amplificación mediante PCR multiplex se deben utilizar cincuenta nanogramos de ADN. Se puede obtener una sobreestimación de la concentración de ADN mediante espectrofotometría si la proporción A_{260}/A_{280} es baja o si el valor de la absorbancia es pequeño (inferior a 0,1).



Legenda de símbolos



Productos sanitarios para diagnóstico in vitro



Conservar de -10 a -30°C



Contiene suficiente para "n" pruebas



Representante autorizado

B. Condiciones de PCR

Es posible que se formen gradientes de concentración en las Multiplex Master Mixes conservadas a -20°C . Tras descongelar las muestras según las indicaciones, agite con vórtex cada tubo durante 10-15 segundos antes del uso. Precaliente el instrumento hasta 94°C antes de colocar los tubos en su interior. No utilice más de 1 unidad de ADN polimerasa GoTaq[®] por cada reacción de amplificación mediante PCR multiplex. Los volúmenes finales habituales de la PCR con el Y Chromosome AZF Analysis System son de 25 μl . Unos volúmenes de PCR de 12,5 μl pueden tener como resultado la aparición de múltiples bandas residuales, por lo que no se deben utilizar.

C. Termocicladores

El Y Chromosome AZF Analysis System se ha desarrollado mediante el uso del termociclador Perkin-Elmer DNA Thermal Cycler 480. El uso con otros termocicladores necesitará la validación y optimización del protocolo por parte del usuario.

Utilice únicamente tubos de pared delgada para la amplificación mediante PCR. Con el termociclador Perkin-Elmer Model 480 utilice tubos de reacción GeneAmp[®] de pared delgada de 0,5 cm de capacidad.

1. Termocicladores con tapas térmicas frente a no térmicas.

Se encuentran disponibles termocicladores con tapas térmicas o con tapas no térmicas. En el caso de los termocicladores que tienen una tapa no calentada (p. ej., el Perkin-Elmer DNA Thermal Cycler 480), es necesario colocar un recubrimiento de aceite mineral sobre la reacción para evitar la evaporación de la misma durante el ciclo térmico. Para los termocicladores con tapas térmicas, no resulta necesario el recubrimiento con aceite mineral. La tapa térmica de estos termocicladores evita la evaporación de la reacción durante el transcurso del ciclo térmico. No obstante, asegúrese de que la tapa térmica funciona correctamente. En el caso de que observe que sus tubos de reacción amplificados en un termociclador equipado con tapa térmica muestran condensación en la tapa y alrededor de la parte superior del tubo de reacción, esto constituye una indicación de que la tapa térmica no funciona correctamente y es posible que se haya obtenido un mal resultado de las amplificaciones del sistema. **Si no está seguro de la calibración de su tapa térmica u observa condensación en el tubo de reacción, añada un recubrimiento de aceite mineral.**

2. Velocidad de la rampa de calentamiento / enfriamiento del termociclador.

El tiempo que dura un ciclo del termociclador entre las temperaturas de desnaturalización, anillamiento y extensión de los perfiles de ciclo término de PCR (denominados frecuentemente “tiempo de rampa”) puede afectar a la amplificación mediante PCR. La velocidad con la que el termociclador realiza un ciclo entre las temperaturas del perfil de ciclo térmico de PCR depende de su fabricación. El protocolo de ciclo mediante PCR proporcionado se ha optimizado para el termociclador Perkin-Elmer Model 480. Los usuarios deberán validar los tiempos de rampa para utilizar otros termocicladores.

3. Calibración del equipo.

El éxito de la amplificación mediante PCR, especialmente en la PCR multiplex, depende de la realización de un ciclo térmico preciso. Asegúrese de la calibración del equipo termociclador que está utilizando con el Y Chromosome AZF Analysis System.

D. Control de la contaminación

Resulta fundamental evitar la contaminación con ADN de los componentes de reacción. Para evitar la contaminación, las áreas de trabajo previas y posteriores a la amplificación deben estar aisladas, preferiblemente en salas separadas. Utilice siempre puntas de pipetas con barrera frente a aerosoles, pipetas exclusivas para la preparación de las reacciones, guantes desechables limpios y evite la contaminación por arrastre de las soluciones de reserva. Los lugares de trabajo y las pipetas deben limpiarse con una solución de lejía suave antes y después de cada uso.

E. Reacciones de control

En cada experimento se deben incluir reacciones de control adecuadas.

1. En todos los casos se deben llevar a cabo reacciones de amplificación en paralelo con las muestras, utilizando el control positivo Male Genomic DNA como patrón. La amplificación mediante PCR del control positivo Male Genomic DNA suministrado siempre debe dar lugar a los productos de amplificación esperados (consulte los tamaños esperados en el Apartado 7.B, Tabla 1).
2. Siempre se debe llevar a cabo una reacción de amplificación mediante PCR con un control negativo sin ADN en paralelo con las muestras, con objeto de verificar que los reactivos no están contaminados con ADN. La amplificación mediante PCR de un control sin ADN no debe producir producto de amplificación alguno.

5. Reacciones de amplificación

Materiales que ha de aportar el usuario

(En el Apéndice, Apartado 7.A, se encuentran las composiciones de las soluciones.)

- Aceite mineral ligero libre de nucleasa
- Termociclador
- Tubos de amplificación de pared delgada
 - En el caso del termociclador Perkin-Elmer DNA Thermal Cycler 480, utilice tubos de reacción GeneAmp® de pared delgada de 0,5 ml de capacidad (nº de componente N801-0737, N801-0611 o N801-0537 de Applied Biosystems)
- Gel de agarosa preparado: minigeles de NuSieve® 3:1 al 4 % más agarosa con tampón TBE preparada Reliant® (nº de cat. 54927, 54928 o 54929 de Cambrex)
- 1 tampón de TBE
- Bromuro de etidio
- Puntas de pipeta resistentes a aerosoles
- Transiluminador de UV

A. Preparación de la reacción

Consulte en la figura 2 un resumen del diagrama de flujo del protocolo de preparación de la reacción. En este procedimiento, se colocan alícuotas de los ADN de muestra en un tubo de reacción. Separadamente, se añade ADN polimerasa *Taq* a cada una de las Multiplex Master Mixes. A continuación, la Multiplex Master Mix que contiene ADN polimerasa *Taq* se añade a los tubos de reacción que contienen el ADN de muestra. Cada muestra de ADN se analiza utilizando cada una de las cinco Multiplex Master Mixes.

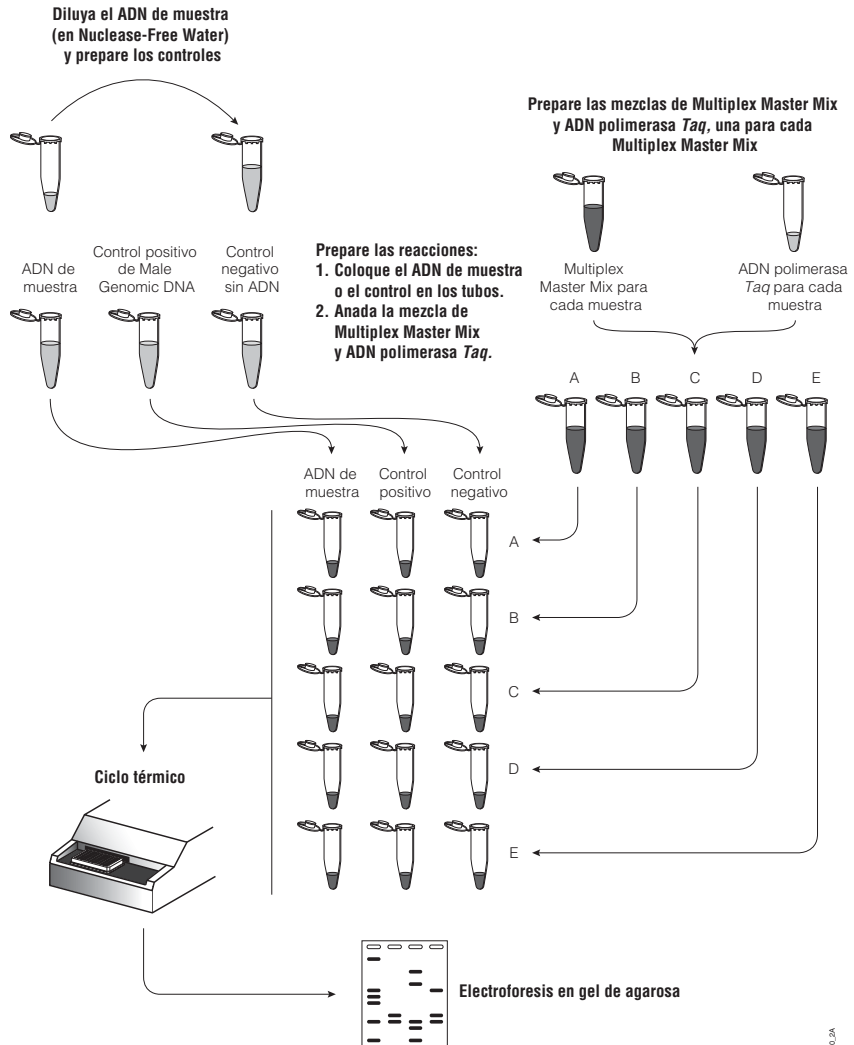


Figura 2. Representación esquemática del análisis con el Y Chromosome AZF Analysis System.

1. Descongele las Multiplex Master Mixes, Nuclease-Free Water y Male Genomic DNA en hielo. Una vez descongeladas, consérvelas en hielo. Agite con vórtex las Multiplex Master Mixes durante 5-10 segundos antes del uso.
2. Complete la tabla siguiente para determinar el número de reacciones para cada Multiplex Master Mix. Para cada muestra de ADN habrá cinco tubos de reacción, uno para cada Multiplex Master Mix. Incluya un control positivo de Male Genomic DNA y un control negativo sin ADN para cada Multiplex Master Mix.

Multiplex Master Mix	Nº de ADN de muestra	Control positivo de Male Genomic DNA	Control negativo sin ADN	Tubos de reacción totales
A		1	1	
B		1	1	
C		1	1	
D		1	1	
E		1	1	

3. Prepare y etiquete el número necesario de tubos de reacción determinado anteriormente. Utilice tubos de amplificación de pared delgada. Coloque los tubos de reacción en hielo.
4. En un tubo separado, diluya cada muestra de ADN hasta 10 ng/μl con el Nuclease-Free Water suministrada. Mezcle bien con vórtex durante 5-10 segundos. Añada 5 μl de ADN a los tubos de reacción etiquetados debidamente que se encuentran en el hielo.

Muestra de ADN de control positivo: Para la muestra de control positivo de Male Genomic DNA, diluya el Male Genomic DNA hasta 10 ng/μl añadiendo 6 μl de Male Genomic DNA a 24 μl de Nuclease-Free Water. Mezcle bien con vórtex durante 5-10 segundos. Añada 5 μl a los tubos de reacción etiquetados adecuadamente que se encuentran en el hielo.

Muestra de control negativo sin ADN: Para el control negativo (sin ADN), añada 5 μl de Nuclease-Free Water a los tubos de reacción etiquetados adecuadamente que se encuentran en el hielo.

5. Prepare cinco mezclas de Multiplex Master Mix / ADN polimerasa GoTaq® en hielo, una para cada Multiplex Master Mix. Agite con vórtex las Multiplex Master Mixes antes de usarlas.

Componente	Volumen por reacción	Volumen por 10 reacciones
Multiplex Master Mix	20 μl	200 μl
ADN polimerasa GoTaq® (5 u/μl)	0,2 μl	2 μl
volumen final	20,2 μl	202 μl

6. Mezcle agitando en el vórtex.
7. Añada 20 μl de la mezcla de Multiplex Master Mix/ADN polimerasa GoTaq® a los tubos de reacción apropiados, que contienen el ADN de muestra o los controles, conservados en hielo.
8. Mezcle agitando suavemente con vórtex.

9. Centrifugue los tubos brevemente para hacer descender todo el contenido al fondo de los mismos. Mantenga los tubos de reacción en hielo hasta que se encuentren listos para el ciclo térmico.
10. Los termocicladores que no dispongan de tapa térmica (por ejemplo, el Perkin-Elmer Model 480 thermal cycler) requieren la aplicación de un recubrimiento con aceite mineral sobre las reacciones en el tubo de reacción. Inclina los tubos y añada una gota de aceite en la pared lateral del tubo, dejando que descienda por ella.

B. Protocolo de ciclo térmico mediante PCR óptimo para el termociclador Perkin-Elmer Model 480

El siguiente protocolo se ha optimizado para el termociclador Perkin-Elmer Model 480. En el caso de utilizar un termociclador diferente, el usuario es responsable de la validación y optimización del protocolo.

Es crucial precalentar el instrumento hasta 94 °C antes de colocar los tubos en su interior.

Termociclador	Tubos de reacción	ADN Polimerasa	Condiciones de PCR
Model 480	Tubos de reacción GeneAmp® de pared delgada, 0,5 ml	GoTaq® DNA Polymerase	94°C durante 2 minutos, después 94°C durante 1 minuto 57°C, durante 30 segundos 72°C durante 1 minuto Repetir durante 35 ciclos y después: 72°C durante 5 minutos bajada y mantenimiento a 4°C

C. Electroforesis en gel de agarosa

Para llevar a cabo la electroforesis y conseguir una posterior visualización óptima de los productos de amplificación, se requieren minigeles de NuSieve® 3:1 al 4% más agarosa con tampón TBE preparada Reliant® (Nº de Cat 54927, 54928 ó 54929 de Cambrex).

1. Diluya el marcador de peso molecular del siguiente modo:

Componente	Volumen
50bp DNA Step Ladder	12 µl
Blue/Orange 6X Loading Dye	4 µl
Nuclease-Free Water	8 µl

2. Añada 2,5 µl del Blue/Orange 6X Loading Dye a cada tubo de amplificación y mezcle.
3. Cargue 10 µl del marcador de peso molecular diluido en el primer pocillo del gel.
4. Cargue 10 µl/pocillo de cada muestra.
5. Cargue 10 µl del marcador de peso molecular diluido en el último pocillo del gel.
6. Coloque el gel en TBE 1X que contenga 0,5 µg/ml de bromuro de etidio y aplique 5 V/cm (medidos como la distancia entre los electrodos) hasta que el frente de tinte de azul de bromofenol migre hasta el final del gel.
7. Fotografe el gel con ayuda del transiluminador de UV (320 nm).

D. Análisis de los datos: Controles

Compruebe que las reacciones de control han producido los resultados esperados antes de analizar sus muestras. Las hojas de cálculo proporcionadas (consulte el Apartado 7.B, Tabla 1) se pueden utilizar tanto para el análisis de los controles como para el de las muestras experimentales.

1. **Control negativo sin ADN:** No deberían aparecer productos de amplificación específicos en las calles que contienen las reacciones de control negativo sin ADN. Pueden aparecer algunas bandas o manchas de bajo peso molecular como resultado de las interacciones de los cebadores. Los resultados no se pueden considerar válidos si se observan productos de amplificación en las reacciones de control negativo sin ADN. Esto es indicativo de ADN contaminante y se debe repetir el experimento poniendo especial cuidado para evitar la contaminación.
2. **Control positivo de Male Genomic DNA:** En la tabla 1 (Apartado 7.B) se indica el número y tamaño de los productos de amplificación para cada Multiplex Master Mix. La reacción de control positivo con Male Genomic DNA para cada Multiplex Master debería mostrar todas las bandas indicadas para esa Multiplex Master Mix (Apartado 7.B, Tabla 1). Los tamaños de los productos de amplificación se pueden estimar comparándolos con el marcador 50bp DNA Step Ladder incluido en el gel. Si no están presentes todas las bandas esperadas en las reacciones con el control positivo de Male Genomic DNA o si se observan bandas extra importantes, esto es indicativo de un problema con los reactivos de amplificación o con el termociclador. Los resultados no se pueden considerar válidos si cualquiera de los productos de amplificación no aparece en las reacciones con el control positivo de Male Genomic DNA.
3. **Cebador de control en las Multiplex Master Mixes:** En las reacciones con las Multiplex A, B, C y D Master Mix, el producto de amplificación más pequeño (83 pb) se debería producir a partir de un locus ligado al cromosoma X (SMCX). En el caso de la Multiplex E Master Mix, el producto de amplificación más grande (496 pb) se debería producir a partir de los genes ZFY/ZFX. La ausencia de estos productos es indicativa de un problema con esa amplificación mediante PCR multiplex particular. En el caso de que estas bandas de control aparezcan con el control positivo de Male Genomic DNA pero no con el ADN de muestra, esto sugiere que puede haber algún problema con el ADN genómico utilizado como patrón. Los problemas con el ADN de muestra pueden ser: la presencia de impurezas, una cuantificación del ADN imprecisa o un ADN degradado. Verifique el patrón de ADN en un gel de agarosa antes de repetir la amplificación. Repita las amplificaciones para cualquiera de las reacciones con ADN de muestra en las que no aparezca el producto de control. Puede resultar necesario aislar de nuevo el ADN genómico patrón.



E. Análisis de los datos: muestras experimentales

Las hojas de cálculo proporcionadas en el Apéndice, Apartado 7.B, se pueden utilizar para el análisis de las muestras experimentales. Determine la presencia o la ausencia de los productos de PCR esperados (Apartado 7.B, Tabla 1). Si en estas reacciones no aparece alguno de los productos, se pueden localizar con ayuda de la hoja de cálculo para la cartografía del cromosoma Y (Apartado 7.B, Tabla 2). Todas las deleciones deberían aparecer contiguas. Si faltan múltiples bandas de amplificación y esas bandas no se localizan en regiones adyacentes del cromosoma Y (Apartado 7.B, Tabla 2), estas representan bandas residuales y no son deleciones. En este caso, se deberá repetir el análisis. La ausencia de una sola banda de amplificación en una muestra puede representar una banda residual y, por tanto, se deberá repetir el análisis para confirmar que el locus no se amplifica. Tenga en cuenta que es posible que un locus presente en una muestra no se amplifique si existe una mutación en uno de sus cebadores. Los resultados del diagnóstico obtenidos con este sistema se deben interpretar únicamente junto con otros datos clínicos o de laboratorio. La Figura 3 muestra un ejemplo de análisis en gel de un ADN de muestra que tiene una deleción del cromosoma Y entre las posiciones del mapa 15 a 20.

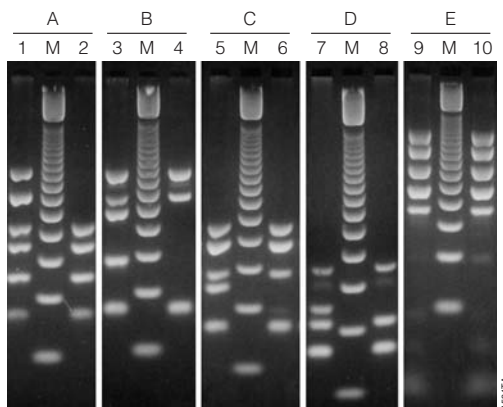


Figura 3. Ejemplo de un análisis en gel de la deleción del cromosoma Y. Se muestran los productos de amplificación de las reacciones de las Multiplex A-E Master Mix. Cada una de las Multiplex Master Mix se utiliza para la amplificación de las muestras de Male Genomic DNA (MD115A) (calles 1, 3, 5, 7, 9) y de una muestra representativa que contiene deleciones del cromosoma Y (calles 2, 4, 6, 8, 10). Las bandas resultantes de la amplificación del control positivo de Male Genomic DNA se comparan con las bandas resultantes de la amplificación del ADN genómico de prueba que contiene deleciones del cromosoma Y (observe las bandas con deleciones en todas esas calles, excepto en la correspondiente a Multiplex E). El marcador (calles M) es el 50bp DNA Step Ladder suministrado con el sistema.

Hemos observado algunas bandas no específicas que aparecen por encima o por debajo de los productos de amplificación esperados en el gel de agarosa (en particular una banda débil en Multiplex D aproximadamente a 150 pb y en Multiplex E por encima del control). Verifique que sus controles negativos (amplificaciones de muestras sin ADN) no muestran unos productos de amplificación mediante PCR detectables. Siempre y cuando sus controles negativos no muestren productos de amplificación mediante PCR, estas bandas no específicas no tienen efecto sobre el análisis. **Nota:** Se ha observado la presencia de señal positiva SY133 en algunos individuos que muestran una deleción AZFb, lo cual sugiere que el locus SY133 se encuentra presente de manera adicional en el cromosoma de estos.

6. Bibliografía

1. Vollrath, D. *et al.* (1992) The human Y chromosome: A 43-interval map based on naturally occurring deletions. *Science* **258**, 52-9.
2. Reijo, R. *et al.* (1995) Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nature Genet.* **10**, 383-93.
3. Foote, S. *et al.* (1992) The human Y chromosome: Overlapping DNA clones spanning the euchromatic region. *Science* **258**, 60-6.
4. Affara, N. *et al.* (1996) Report of the second international workshop on Y chromosome mapping 1995. *Cytogenet. Cell. Genet.* **73**, 33-76.
5. Kent-First, M.G. *et al.* (1996) Gene sequence and evolutionary conservation of human SMCY. *Nat. Genet.* **14**, 128-9.
6. Kent-First, M.G. *et al.* (1999) Defining regions of the Y-chromosome responsible for male infertility and identification of a fourth AZF region (AZFd) by Y-chromosome microdeletion detection. *Mol. Reprod. and Dev.* **53**, 27-41.
7. Vogt, P.H. *et al.* (1997) Report of the third international workshop on Y-chromosome mapping 1997. *Cytogenet. Cell Genet.* **79**, 1-20.
8. Skaletsky, H. *et al.* (2003) The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature* **423**, 825-37.
9. Pryor, J.L. *et al.* (1997) Microdeletions in the Y chromosome of infertile men. *New Eng. J. Med.* **336**, 534-39.
10. Kent-First, M.G. *et al.* (1996) The incidence and possible relevance of Y-linked microdeletions in babies born after intracytoplasmic sperm injections and their fathers. *Mol. Hum. Reprod.* **2**, 943-50.
11. Kostiner, D.R., Turek, P.K. and Reijo, R.A. (1998) Male infertility: Analysis of the markers and genes on the human Y chromosome. *Hum. Reprod.* **13**, 3032-8.
12. Kuroda-Kawaguchi, T. *et al.* (2001) The AZFc region of the Y chromosome features massive palindromes and uniform recurrent deletions in infertile men. *Nat. Genet.* **29**, 279-86.
13. Lahn, B.T. and Page, D.C. (1997) Functional coherence of the human Y chromosome. *Science* **278**, 675-80.
14. Reijo, R. *et al.* (1996) Severe oligozoospermia resulting from deletions of azoospermia factor gene on Y chromosome. *Lancet* **347**, 1290-3.
15. Repping, S. *et al.* (2002) Recombination between palindromes P5 and P1 on the human Y chromosome causes massive deletions and spermatogenic failure. *Am. J. Hum. Genet.* **71**, 906-22.
16. Saxena, R. *et al.* (1996) The DAZ gene cluster on the human Y chromosome arose from an autosomal gene that was transposed, repeatedly amplified and pruned. *Nat. Genet.* **14**, 292-9.
17. Simoni, M. *et al.* (1999) Laboratory guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions. *Int. J. Androl.* **22**, 292-9.

7. Apéndice

A. Composición de tampones y soluciones

tampón de TBE 1X

89 mM	Base de Tris
110 mM	ácido bórico
2 mM	EDTA



B. Hojas de cálculo

Tabla 1. Perfil de productos de amplificación mediante PCR para las muestras de prueba.

Registre la presencia (+) o la ausencia (-) de los productos de amplificación mediante PCR para cada muestra experimental.

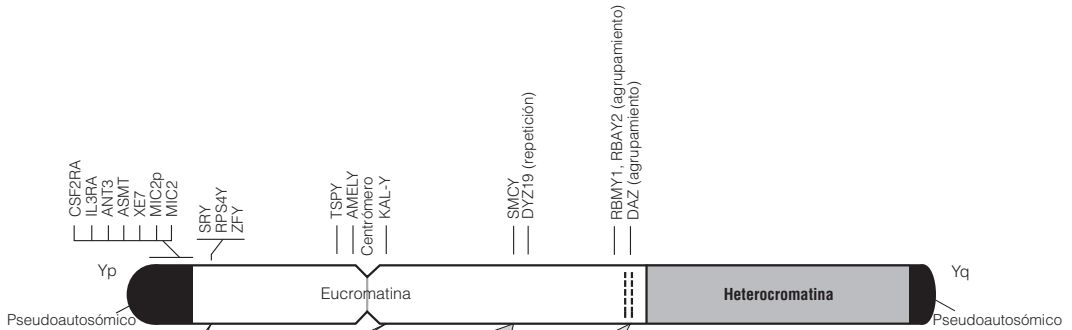
Multiplex A Master Mix				Muestras (+/-)
SSM	Locus	Tamaño del producto (pb)	Posición en el mapa	
SY254	DAZ	380	18	
SY157	DYS240	290	20	
SY81	DYS271	209	2	
SY130	DYS221	173	11	
SY182	KAL-Y	125	5	
	SMCX	83	Control	

Multiplex B Master Mix				Muestras (+/-)
SSM	Locus	Tamaño del producto (pb)	Posición en el mapa	
SYPR3	SMCY	362	7	
SY127	DYS218	274	9	
SY242	DAZ	233	16	
SY208	DAZ	140	17	
	SMCX	83	Control	

Multiplex C Master Mix				Muestras (+/-)
SSM	Locus	Tamaño del producto (pb)	Posición en el mapa	
SY128	DYS219	228	10	
SY121	DYS212	190	6	
SY145	DYF51S1	143	14	
SY255	DAZ	124	19	
	SMCX	83	Control	

Multiplex D Master Mix				Muestras (+/-)
SSM	Locus	Tamaño del producto (pb)	Posición en el mapa	
SY133	DYS223	177	12	
SY152	DYS236	125	15	
SY124	DYS215	109	8	
	SMCX	83	Control	

Multiplex E Master Mix				Muestras (+/-)
SSM	Locus	Tamaño del producto (pb)	Posición en el mapa	
	ZFX/ZFY	496	Control	
SY14	SRY	400	1	
SY134	DYS224	303	13	
SY86	DYS148	232	3	
SY84	DYS273	177	4	



AZFc/AZFd proximales

	SRY		AZFa		AZFb										AZFc		SMCX	SMCX	SMCX	SMCX	ZFX ZFY				
	SRY	DYS271	DYS148	DYS273	KALY	DYS212	SMCY	DYS215	DYS218	DYS219	DYS221	DYS223	DYS224	DYS224	DYF51S1	DYS236	DAZ	DAZ	DAZ	DYS240	SMCX	SMCX	SMCX	SMCX	
	SY14	SY81	SY86	SY84	SY182	SY121	SYPR3	SY124	SY127	SY128	SY130	SY133	SY134	SY145	SY152	SY242	SY208	SY254	SY255	SY157	Control Multiplex A	Control Multiplex B	Control Multiplex C	Control Multiplex D	Control Multiplex E
1																									
2																									
3																									
4																									
5																									
6																									
7																									
8																									
9																									
10																									
11																									
12																									
13																									
14																									
15																									
16																									
17																									
18																									
19																									
20																									

Tabla 2. Hoja de cálculo para la cartografía del cromosoma Y. Para obtener una información más detallada, consulte la figura 2 complementaria de la referencia bibliográfica 8. Los palíndromos 8, 7, 6, 5 y 4 se localizan en la dirección proximal de la región SY121 y en la dirección distal de la región SY182 (1). La región SY121 se encuentra en el límite distal de P4 (8). La región AZFb se extiende desde P5 hasta la región proximal a P1 (8). La región AZFc incluye P1 y P2 (8). Al menos una copia de SY157 se localiza fuera del límite de la región AZFc. **Nota:** Se ha observado la presencia de señal positiva SY133 en algunos individuos que muestran una deleción AZFb, lo cual sugiere que el locus SY133 se encuentra presente de manera adicional en el cromosoma de estos.



^(a)U.S. Pat. No. 6,242,235, Australian Pat. No. 761757, Canadian Pat. No. 2,335,153, Chinese Pat. No. ZL99808861.7, Hong Kong Pat. No. HK 1040262, Japanese Pat. No. 3673175, European Pat. No. 1088060 and other patents pending.

© 2013, 2014 Promega Corporation. All Rights Reserved.

GoTaq is a registered trademark of Promega Corporation.

GeneAmp is a registered trademarks of Roche Molecular Systems, Inc. Reliant is a registered trademark of CBM Intellectual Properties, Inc. NuSieve is a registered trademark of Lonza Sales AG.

Please contact Promega Technical Services or access our web site at www.promega.com for the most up-to-date information on Promega products.