

AUTOMATIZACIÓN DEL ANÁLISIS DE LAS MUTACIONES FACTOR V LEIDEN, F12 C46T Y RS7025486 DEL GEN DAB2IP MEDIANTE SONDAS TAQMAN CON PCR EN TIEMPO REAL

I. Coll, I. Tirado, B. Cuevas, E. Martínez-Sánchez, J. Mateo, A. Santamaría, J. Fontcuberta

Unitat d'Hemostàsia i Trombosi. Departament d'Hematologia.

Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona

Introducción: Hasta el momento se han descrito varios factores genéticos que se han implicado en la patogénesis del tromboembolismo venoso. El objetivo de este trabajo fue automatizar los métodos de análisis genético de las mutaciones: Factor V Leiden, F12C46T y rs7025486 del gen DAB2IP de manera que permita procesar un elevado número de muestras de manera sencilla, rápida y reproducible.

Material y métodos: La extracción de ADN se realizó mediante MagnaPure Compact (Roche). Se utilizó la PCR en tiempo real 7500 (Applied Biosystem) mediante sondas Taqman específica de alelo. Para ello se seleccionaron muestras de ADN de pacientes (n=50) donde cada una de las mutaciones había sido genotipadas previamente por otro método. En el caso de las mutaciones Factor V Leiden y F12C46T se realizó por PCR a tiempo real con sondas específicas de alelo con el Light Cycler 2.0 (Roche). En el caso de las mutaciones del rs7025486 DAB2IP (c.18554G>A) por secuenciación directa con el 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Resultados: Diseñamos el protocolo de detección de cada mutación combinando con una extracción automática (MagnaPure Compact Roche) y una PCR a tiempo real con sondas Taqman específica de alelo en el formato de placa de 96 muestras. En todas las muestras analizadas obtuvimos como resultado el mismo genotipo observado para cada mutación que por el método comparativo. Sin embargo, el proceso el proceso automatizado en PCR en tiempo real en placa permite genotipar un gran número de muestras en cada ensayo (n=92) junto a los controles correspondientes (n=4) frente a las 32 muestras que se pueden analizar por el LC 2.0. Además en el caso del Factor V Leiden y rs7025486 DAB2IP se realizaron con las mismas condiciones de PCR y se pueden analizar simultáneamente en la misma placa de reacción. Si este protocolo se realiza a partir de una extracción automática de ADN, todo el proceso; desde que llega la sangre hasta que se entrega el resultado puede durar un total de 2 horas.

Conclusión: La automatización con PCR a tiempo real en formato de placa de 96 utilizando sondas TaqMan permite analizar cada una de las mutaciones de forma sencilla, rápida, fiable y reproducible. Además es adecuado para genotipar tanto un número pequeño como un elevado número de muestras de ADN, y analizar varios SNP's en la misma placa.

Red RECAVA RD 06/0014/0016.