

AUTOMATIZACIÓN CON EL QIAXCEL EN EL ANÁLISIS DE FRAGMENTOS DE DNA POR ELECTROFORESIS CAPILAR DE ALTA RESOLUCIÓN EN EL ESTUDIO DE SNP'S IMPLICADOS EN LA TROMBOSIS VENOSA

B. Cuevas, I. Tirado, I. Coll, J.C. Souto, M. Carrasco, 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 electroforesis en la genotipación de SNP's: del grupo ABO, FXIII Val34Leu (c. 103G>T; rs5985) Antitrombina Cambridge tipo I (SERPINC1 G13268C; Ala384Pro) y tipo II (SERPINC1 G13268T; Ala384Ser) de manera que permita procesar un elevado número de muestras de manera sencilla, rápida y reproducible.

Material y métodos: Se utilizó el método de electroforesis capilar de alta resolución con el equipo QIAxcel (Quiagen. Izasa). Se seleccionaron muestras de ADN genotipadas previamente por PCR y análisis de RFLP's y analizado con electroforesis convencional con bromuro de etidio. Los enzimas de restricción y las agarosas utilizados: para grupo ABO KpnI i MspI y agarosa tipo Nusieve (Iberlabo), para FXIII Val34Leu DdeI y agarosa tipo Metaphor (Iberlabo) y para la Antitrombina Cambridge PvuII y con agarosa NMP (Normal Melting Point, Iberlabo).

Resultados: Diseñamos los protocolos de análisis de fragmentos de ADN en electroforesis capilar de alta resolución en placa de 96 pocillos por un lado para todos los productos amplificados mediante PCR con el método AM420 (A: cartucho de screening, M: resolución media; 420 segundos de electroforesis). Para el análisis del producto de digestión se utilizó el método AM420 (A: cartucho de screening, M: resolución media, 420 segundos de electroforesis) con 60 segundos de carga para FXIII Val34, la Antitrombina Cambridge y el exón 6 del gen ABO. En el caso del exón 7 del gen ABO se utilizó un protocolo AL420 (A: cartucho de screening, L: baja resolución; 420 segundos de electroforesis). En todos los casos se utilizó el marcador de peso de 50-800pb y el marcador de alineamiento de 15-1000 pb. En todas las muestras analizadas obtuvimos como resultado el mismo genotipo observado por el método comparativo. Sin embargo la electroforesis capilar permite genotipar un gran número de muestras en cada ensayo (n=96) en un tiempo de 10 minutos hasta 1 hora como en función del número de muestras frente al método convencional que dura un total de 4-6 horas y para un máximo de 28 muestras. Además este nuevo método reduce la manipulación de geles con bromuro de etidio.

Conclusión: La electroforesis capilar de alta resolución permite realizar un análisis de SNP's de forma sencilla, rápida, segura y reproducible. Además es un sistema que permite genotipar un número elevado de muestras de ADN.

Red RECAVA RD 06/0014/0016

(ver tabla en página siguiente)

AUTOMATIZACIÓN CON EL QIAXCEL EN EL ANÁLISIS DE FRAGMENTOS DE DNA POR ELECTROFORESIS CAPILAR DE ALTA RESOLUCIÓN EN EL ESTUDIO DE SNP'S IMPLICADOS EN LA TROMBOSIS VENOSA

B. Cuevas, I. Tirado , I. Coll, J.C. Souto, M. Carrasco, J. Fontcuberta

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

Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona

Tabla (PO-378)

Tabla (PO-378)													
Paciente	Diag-nóstico	TPH	Status	Inicio defibrotide	Duración to (días)	Respuesta	SG+100	Causa exitus	Cifra máxima	Inr/tpa al inicio	Bilirrubina día +10 (mg/dl)	Bilirrubina al inicio del to (mg/dl)	Creatinina al inicio del to (mg/dl)
				(día post-TPH)					Bilirrubina (mg/dl)				
1	LMA	Ablativo	RC1	7	9	RC	SÍ	NA	5,46	1/27,5	3,17	1,34	0,58
		No emparen-tado											
2	LLA B CO-MUN	Ablativo	RC3	6	5	NR	NO	HDA	15,38	1,7/41	15,25	4,35	0,91
		No emparen-tado											
3	LLC P53+ Y 13q-	Minialotras-plante	RC3	9	14	RC	SÍ	NA	16,87	1/33,7	11,42	8,96	4,04
		Emparentado											
4	LMA	Ablativo	Recaída precoz post-ALOTPH	11	4	NR	NO	Fracaso hepático	16,14	1,1/33,2	3,81	8,45	1,11
		No emparen-tado											
5	LLA B CO-MUN	Ablativo	RC1	5	5	NR	NO	Infec-ción	36,22	0,9/32,8	11,62	1,7	0,67
		Emparentado											