

Area: CT - Tecnologías

Título del Trabajo: ETAPAS PRELIMINARES EN EL DISEÑO DE TÉCNICA ALTERNATIVA DE DETECCIÓN DE LA MUTACIÓN DF508

Autores: MARTÍNEZ, MAURICIO A. - SOTO, SUSANA - LEIVA LAURA C.

E-mail de Contacto: mauriam01@hotmail.com

Tipo de Beca: UNNE Iniciación Tipo A **Resolución Nº:** 987/10 **Período:** 01/03/2011 - 01/03/2014

Proyecto Acreditado: Proyecto PFIP - 2009 Diseño e implementación de técnica alternativa para detección de fibrosis quística en pacientes enfermos y portadores, COFECIT 2012-2014

Lugar de Trabajo: Facultad de Cs. Exactas y Naturales y Agrimensura

Palabras Claves: amplicones, electroforesis en poliacrilamida, Gel Red ®

Resumen:

La fibrosis quística (FQ) es una de las enfermedades genéticas mortales más frecuentes en la raza caucásica, con una incidencia estimada entre 1 por cada 2500 a 3500 recién nacidos vivos. Se basa en mutaciones del gen CFTR (gen regulador de la conductancia transmembrana de la FQ), siendo la $\Delta F508$ la de mayor incidencia en Argentina; consiste en una delección de tres pares de bases (CTT) en el exón 10 que resulta en la pérdida de un aminoácido (fenilalanina) en la posición 508 de la proteína. Dado el alto porcentaje de presentación en nuestra población, es importante detectar esta mutación, a través de estudios genéticos, ya que es el único modo de detección de portadores. Siendo los test comerciales de costo relativamente elevados, es de interés el desarrollo de técnicas alternativas, basadas en la hibridación con sondas, que permita detectar la presencia de mutaciones del gen CFTR en portadores sanos como así también en pacientes enfermos sospechosos de padecer FQ.

En este trabajo se presentan las etapas preliminares en el diseño de una metodología de detección por hibridación con sondas, centradas en la propuesta de "primers", análisis de amplicones por electroforesis en gel de poliacrilamida y posterior tinción con colorante no mutagénico.

En primer lugar se seleccionó, a partir de la literatura, el par de primers apropiado para la amplificación de una región de 138 pb del gen CFTR que incluya la mutación: Primer Forward (F): 5' AAGCACAGTGGGAAGAATTC 3' Primer Reverse (R): 5' CTCTTCTAGTTGGCATGCT 3'. Luego, muestras de sangre provenientes de individuos homo y heterocigotas, como así también negativos con respecto a la mutación $\Delta F508$, fueron procesadas para extracción de ADN con Bromuro de Cetiltrimetilamonio (CTAB). Para la amplificación por PCR se preparó una Master Mix conteniendo: Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.5, 50 mM KCl, 1 mM Triton X-100), 200 μ M cada dNTP, 0.1 μ M cada primer, 3 mM MgCl₂ y 1 U de Taq DNA Polymerase. El volumen final fue de 50 μ l. El programa de termociclado fue: 4 min 95° C (un ciclo) / 1 min 95 °C / 1 min 56 °C / 1 min 74 °C (30 ciclos) / 5 min 74°C (un ciclo). Los fragmentos amplificados fueron sembrados en un Gel de Poliacrilamida al 12% incluyendo en una de las calles un marcador de peso molecular, y se sometió a electroforesis durante 30 minutos a 70 voltios. La tinción se llevó a cabo mediante inmersión del gel en la solución colorante (Gel Red ® 1:3300 de solución madre 10.000 X y adición de 0,1 M NaCl) imprimiendo agitación continua durante 30 minutos. Se visualizaron las bandas amplificadas con un transiluminador UV.

Se detectaron amplicones de 138 pb provenientes de ADN de individuos sanos y de portadores (heterocigotas). La técnica permitió distinguir la posición de amplicones de 135 pb correspondientes al fragmento proveniente del gen mutado que carece del triplete codificante del aminoácido fenilalanina, tanto en el ADN de individuos homocigota como en el de portadores. Esta diferencia correspondiente a tres pares de base fue claramente resuelta por las condiciones implementadas y la tinción con este colorante no mutagénico facilitó el manejo de materiales y muestras con respecto a las complicaciones que trae aparejado el revelado con bromuro de Etidio.

Los resultados alcanzados en esta instancia de la técnica permiten dar paso a los ajustes en la próxima etapa, consistente en la hibridación con sondas. Sin embargo este método en sí mismo podría aplicarse para una detección preliminar de la mutación.