

Validación del kit Verifiler Express en muestras de diferentes fluidos y soportes

Caputo M, *Sala A*, Ginart S, Corach D. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Departamento de Microbiología, Inmunología y Biotecnología, Cátedra de Genética Forense y Servicio de Huellas Digitales Genéticas, C1113AAD, Buenos Aires, Argentina. e-mail: mcaputo@ffyb.uba.ar

Palabras clave: Veriflex Express, direct DNA amplification kits; high-throughput databanking

Introducción. La amplificación directa de ADN en el genotipado forense reduce el tiempo analítico cuando se analizan grandes conjuntos de muestras. El éxito de la amplificación depende principalmente de dos factores: por un lado, la química de PCR y, por otro, el tipo de sustrato sólido donde se depositan las muestras [1]. Dado la diversidad de muestras recibidas en el servicio en cuanto a fluido y soporte, se requiere de una estrategia de trabajo unificada para optimizar tiempos de trabajo [2].

Objetivos. Desarrollar una única estrategia de trabajo para la tipificación de muestras de referencia de distintos fluidos y soporte mediante el kit Verifiler Express (Thermo Fisher Scientific).

Material y Métodos. Se establecieron condiciones de amplificación e inyección partiendo de muestras en distintos soportes como ser sangre en papel Whatman® 3 MM, FTA, o Whatman® Grado 1 o saliva en hisopo. Se determinó el umbral analítico mediante el método de análisis de negativos y el umbral estocástico mediante el método de diluciones seriadas de DNA. Además se determinó el rango de concentraciones óptimo de trabajo para DNA líquido.

Resultados y Discusión. La estrategia de trabajo consistió en un “scale down” del protocolo original [3]. Luego de varias pruebas realizadas a partir de distintos soportes y tratamientos, se determinó el protocolo de trabajo que consistió en la amplificación directa de sangre en papel utilizando 5ul de Mix, 5ul de Primer Mix y 2,5 de Prep-n-Go Buffer y de 5ul de Mix, 5ul de Primer Mix, 1,5 de TE y 1ul de extracto de Hisopado bucal pretratado con Prep-n-Go Buffer durante 20 min a temperatura ambiente. Para el ciclado se utilizó el equipo Veriti Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific) con rampa de velocidad en modo máximo: 95°C 1 minutos, 27 ciclos de 94°C 3 segundos, 59°C 16 segundos, 65°C 29 segundos aumentando la extensión final a 15 minutos a fin de evitar -/+A. Las condiciones de inyección fueron de 1,5kV durante 3 segundos utilizando 1ul de producto de amplificación, 0,5ul de LIZ 600 y 9 ul de Formamida en un equipo 3500 Genetic Analyzer utilizando POP-7™ (Life Technologies), y capilar de 50-cm. Los

electroferogramas fueron analizados, con el software experto Gene-Mapper® ID-Xv 1.2 (Life Technologies). El umbral analítico fue fijado en 50 RFU y se obtuvo un umbral estocástico de 150 RFU siendo el rango de amplificación óptimo de 0,25ng a 4ng. En la tabla 1 se muestran los parámetros de calidad obtenidos. Se determinaron los parámetros del método de análisis del software para garantizar la calidad de los resultados.

Parámetro	Papel	Hisopado Bucal
Altura de pico	2778	2184
SD	2765	2206
PHR	0,90	0,89
SD	0,07	0,10

Tabla 1. Resultados de los parámetros evaluados para la estrategia utilizada. PHR (peak height ratio); SD (standard deviation)

Conclusiones. Se estableció una estrategia de trabajo unificada para la amplificación directa de muestras de sangre en papel e hisopado bucal alcanzando perfiles de alta calidad y confiabilidad con mínimos porcentajes de reamplificación y/o reinyección.

Agradecimientos. Agradecemos a Thermo Fisher Scientific por la colaboración en este trabajo. Este trabajo fue financiado con recursos genuinos provenientes de la transferencia de servicio a terceros por parte del Servicio de Huellas Digitales Genéticas

Referencias.

1. Aboud, M. et al., (2013). Electrophoresis. 34:1539-1547.
2. Caputo, M et al., (2017). Journal of Forensic and Legal Medicine, 47: 17-23.
3. VeriFiler™ Express PCR Amplification Kit. User Guide.