



Genética molecular

Universidad Nacional de Quilmes

Trabajo Práctico N°5

Detección de microdeleciones en el Cromosoma Y mediante PCR Multiplex

Distintos trabajos indican que aproximadamente el 15% de las parejas en edad reproductiva experimentan algún tipo de infertilidad. La mitad de esos casos se atribuye a infertilidad masculina.

Los estudios desarrollados por varios centros de fertilidad en más de 17000 hombres indican un descenso del 50% en la calidad y la motilidad espermática durante los últimos 30 a 50 años.

La evaluación inicial apunta al análisis del semen y testeo hormonal. El primero puede revelar *azoospermia* (ausencia de la motilidad espermática en el eyaculado), *oligozoospermia* (menos de 20×10^6 espermias/ml) o conteo normal de espermias pero con morfología anormal.

Las causas de la infertilidad masculina incluyen agentes infecciosos, exposición prolongada a diferentes productos químicos, trauma, desórdenes inmunes o endócrinos y desórdenes genéticos.

Existen grandes regiones en el cromosoma Y asociadas con la producción de células espermáticas, conocidas como AZF (*azoospermia factor*) a, b, d y c (en ese orden de aparición). Deleciones en algunas de estas regiones se asocian a *infertilidad masculina*.

Hombres que padezcan deleciones en la región AZF_a, o en múltiples regiones AZF son diagnosticados con oligozoospermia severa. Deleciones en AZF_b, AZF_c y AZF_d se asocian con azoospermia y oligozoospermia.

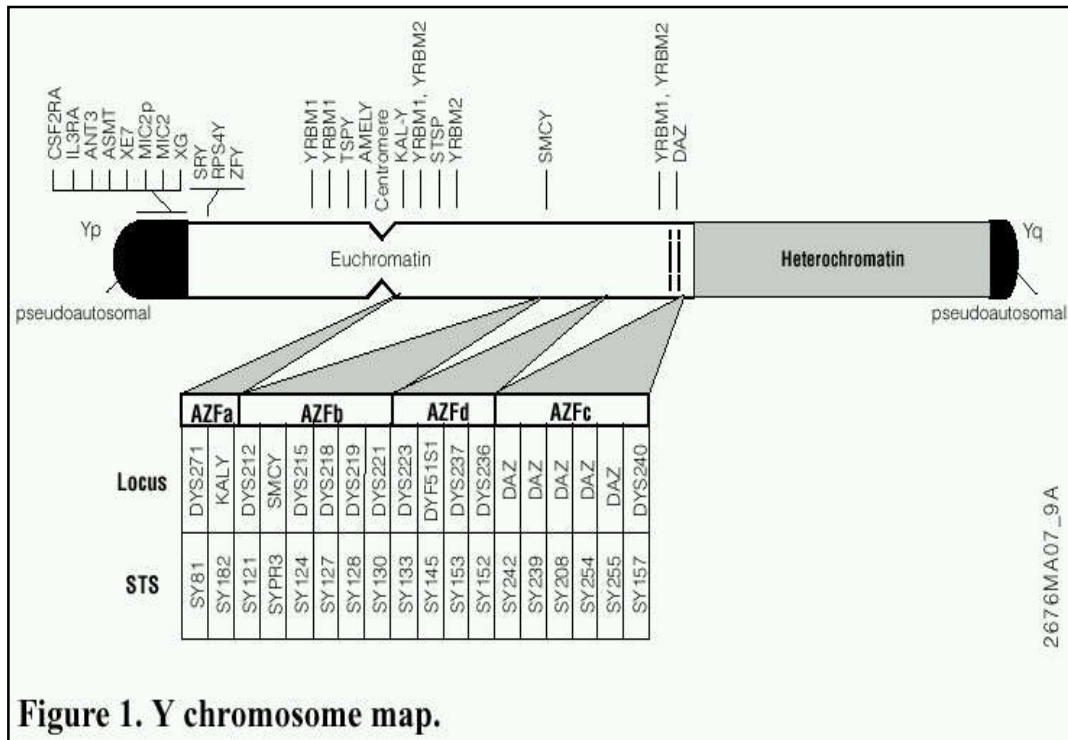


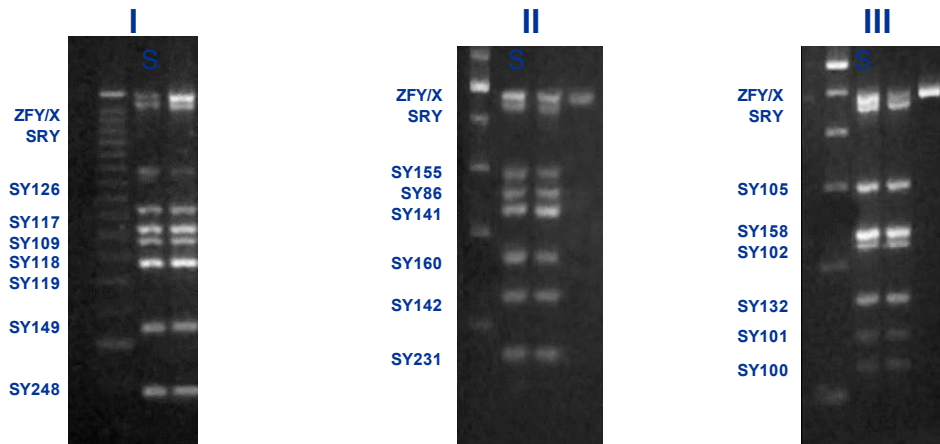
Figure 1. Y chromosome map.

Objetivos:

A partir de 3 reacciones en múltiplex de PCR, se detectará la presencia o ausencia de fragmentos en 17 loci AZF, los cuales representan los 4 sub-intervalos AZF (a-d) previamente mencionados.

Las reacciones se realizarán en 15 µl finales utilizando 50 ng de DNA. Las muestras serán controles normales y casos con algún tipo de deleción.

Las reacciones en múltiplex que vamos a utilizar son:



La concentración de los reactivos se muestra en la siguiente tabla:

Multiplex	Locus	STS	Tamaño (pb)	Condiciones PCR		% Geles - Tinción	Ciclado	
				[primers]				
1/2	1	ZFY	495	1.2/100 µl	Buffer 1X Taq : 4/100 µl DNA : 50 ng	Agarosa Nusieve 2.8% Tinción en la corrida: SYBR SAFE 3 ½ Hs	95° C 5' 95° C 1' x 35 60° C 1' 68° C 1' 68° C 5'	
	2	SRY	472	1.2/100 µl				
	3	DYS 217	SY 126	323				4/100 µl
	7	DYS 211	SY 119	191				2/100 µl
3/4	1	ZFY	495	1.2/100 µl	Buffer 1X Taq : 4/100 µl DNA : 50 ng	Agarosa Nusieve 2.8% Tinción en la corrida: SYBR SAFE 3 ½ Hs		
	2	SRY	472	1.2/100 µl				
		DYS 209	SY 117	262				2/100 µ
		DYS 210	SY 118	218				2/100 µl
		DAZ	SY 248	94				4/100 µl
5/6	1	ZFY	495	1.2/100 µl	Buffer 1X Taq : 4/100 µl DNA : 50 ng	Agarosa Nusieve 2.8% Tinción en la corrida: SYBR SAFE 3 ½ Hs		
	2	SRY	472	1.2/100 µl				
		DYF 43 S1	SY 109	233				2/100 µ
		DYS 1	SY 149	133				2/100 µl

La separación y visualización de los fragmentos se realizará por electroforesis en geles de agarosa *low melting* (de bajo punto de fusión, marca Nusieve) al 4%, teñidos con el agente intercalante GelRed.