

Kvantitativní fluorescenční polymerázová řetězová reakce (QF-PCR)



QF-PCR

Kvantitativní fluorescenční polymerázová řetězová reakce (QF-PCR)

představuje metodu vhodnou k rychlé diagnostice
nejčastějších aneuploidií
a umožňuje okamžitý management patologických těhotenství



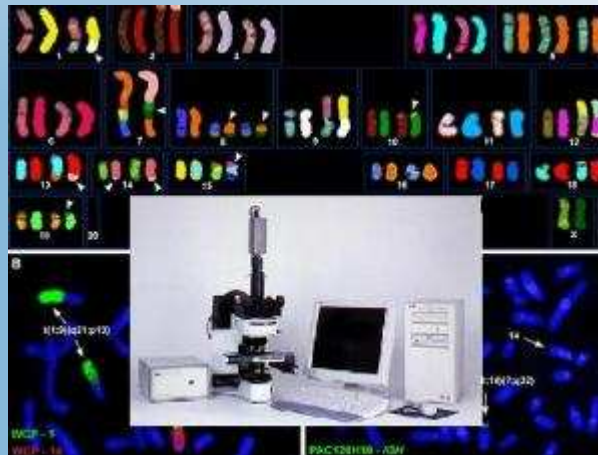
QF-PCR

Při analýze se využívá PCR amplifikace chromozom-specifických polymorfních STR markerů. Metody využíváme v prenatální i postnatální diagnostice a analýze potracených plodů



Klasické metody vyšetření

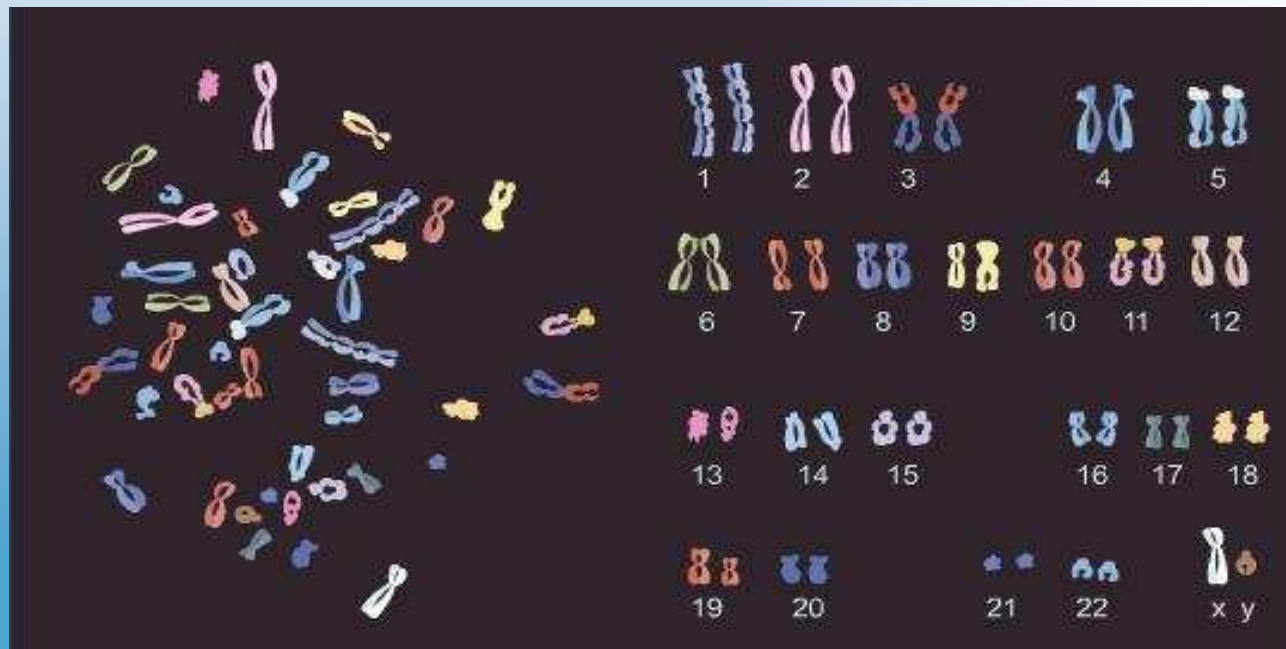
Vyšetření karyotypu (hodnocení barvených metafázických chromozomů v optickém mikroskopu)



Klasické metody vyšetření

Karyotyp

- je soubor všech chromosomů v jádře buňky.
- V buněčných jádrech určitého druhu je konstantní do počtu, velikosti i tvaru chromozómů a jako takový se používá jako druhový znak
- je jeden ze základních objektů **cytogenetiky**



hodnocení barvených metafázických chromozómů v optickém mikroskopu)

Vyšetření karyotypu

- základní metodou vyšetření karyotypu (nejen) v rámci prenatální diagnostiky chromozomálních aberací

Výhody

- možnost prohlédnout celý karyotyp, zhodnotit strukturu každého jednotlivého chromozomu - a i jejich počet.

Nevýhody

- časová náročnost

klasické vyšetření karyotypu vyžaduje kultivaci získaných buněk ve speciálním médiu, což výrazně prodlužuje dobu, která uplyne mezi samotným odběrem vzorku a vydáním výsledku.

- amniocentéza či odběr choriových klků je nutné počítat v průměru s minimálně dvoutýdenní lhůtou (výsledky CVS bývají obecně o něco dříve díky většímu růstovému potenciálu choriových buněk).

- kordocentéza má v tomto případě značnou výhodu rychlého zpracování vzorku (obecně jen několik dní), neboť je odebírána fetální krev (velký růstový potenciál lymfocytů).

- omezená schopnost detekovat určité chromozomální přestavby malého rozsahu (například mikrolece)
- určovat původ marker chromozomů apod.

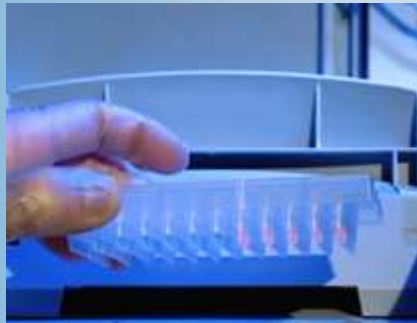
V této oblasti pak nastupují metody molekulární cytogenetiky jako je například FISH (fluorescent in-situ hybridization - fluorescenční in-situ hybridizace).

QF-PCR - nová metoda

neboli kvantitativní fluorescenční polymerázová řetězová reakce

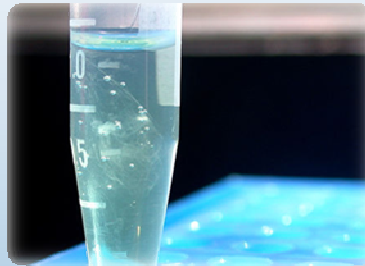
(Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction)

- speciální aplikací klasické PCR metody, sloužící k namnožení definovaného úseku DNA.
- V rámci prenatální diagnostiky se lze také setkat s označením amnioPCR (v souvislosti s amniocentézou - jako metodou, použitou k získání vzorku).
- Tato metoda umožňuje vyloučit / potvrdit numerické odchylky vybraných chromozomů a to v extrémně krátkém časovém období jednoho, maximálně dvou dnů.
- Nejčastěji jde o chromozomy, jejichž numerické abnormality tvoří většinu (cca 90 %) chromozomálních aberací: 13, 18, 21, X a Y.

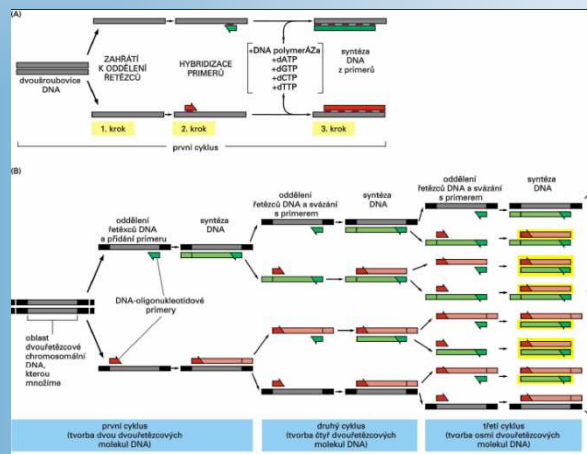


QF-PCR

- Ze vzorku AMC, CVS se pomocí některé ze standardních metod nejprve **izoluje DNA**.



- **Polymerázová řetězová reakce-PCR**



QF-PCR

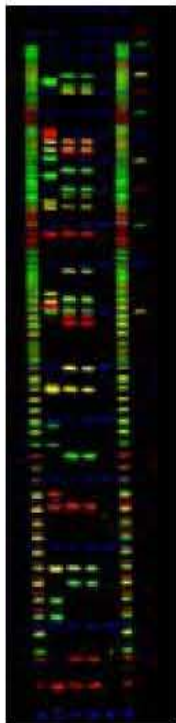
Pro vlastní PCR metodu jsou připravené speciální „kity“
s fluorescenčně značenými primery.

Tyto primery ohraničují specifické lokusy na příslušných chromozomech (13, 18, 21, X a Y), které se pro potřeby této metody též označují jako markery.

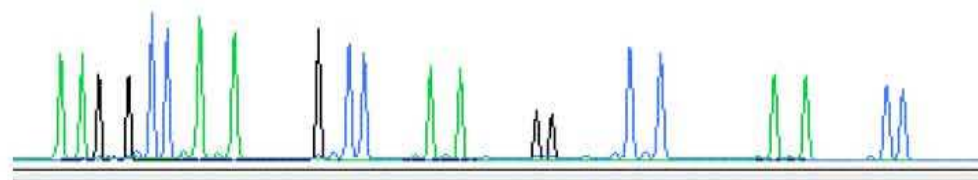
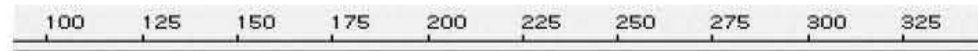
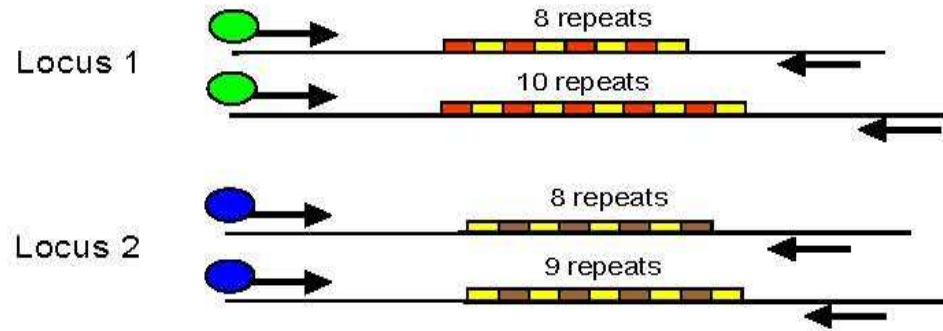
Jedná se o takové úseky, které obsahují vysoce polymorfní sekvence mikrosatelitní DNA - krátké tandemové repetice STR (Short Tandem Repeats).

QF-PCR

Metoda PCR amplifikuje STR oblasti a vytváří fluorescenčně značené amplikony za pomoci lokus specifických primerů



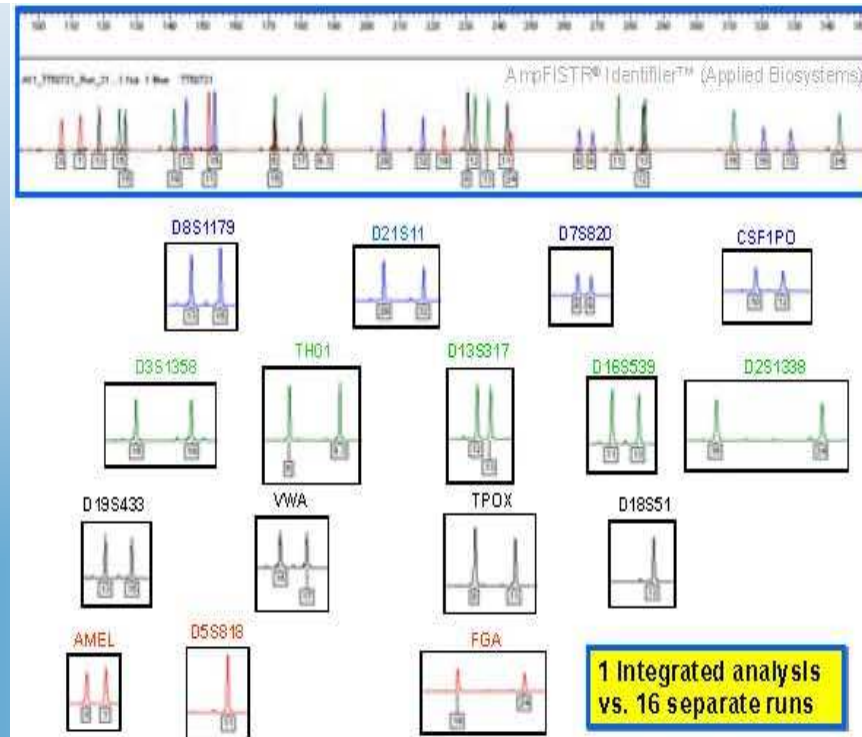
Scanned Gel Image



Capillary Electropherogram

QF-PCR

Multiplex PCR



QF-PCR

Multiplex PCR

- 7 markerů pro diagnostiku chromosomu 21
- 7 markerů pro diagnostiku chromosomu 18
- 7 markerů pro diagnostiku chromosomu 13
- 7 markerů pro diagnostiku chromosomů XY.

8. Výsledky a analýza (pokrač.)

Přehled markerů

Devyser™ Complete Mix 1

Název Markeru	Pozice	Velikost markeru (bp)* POP-4/POP-6	Velikost markeru (bp)* POP-7	Barva fluoroforu
13A	13q12	234 - 327	232 - 323	Zelená
13B	13q21	370 - 430	365 - 425	Modrá
13C	13q31	425 - 474	425 - 474	Žlutá
13D	13q13	420 - 490	413 - 479	Zelená
18A	18q11	190 - 230	190 - 230	Zelená
18B	18q12	180 - 228	180 - 228	Žlutá
18C	18q12	298 - 350	298 - 350	Modrá
18D	18q22	330 - 408	325 - 403	Zelená
18I	18q21	360 - 415	360 - 415	Žlutá
21A	21q21	160 - 205	160 - 207	Modrá
21B	21q21	220 - 283	220 - 285	Modrá
21C	21q22	256 - 350	256 - 353	Žlutá
21D	21q22	440 - 492	440 - 492	Modrá

*Na základě pozorovaných a kalkulovaných velikostí markerů. Píky markerů s velikostmi mimo dané rozpětí se mohou vyskytnout, ale nezahrnují se do analýzy v rámci Devyser™ Complete. Doporučujeme pro tyto případy použít Devyser™ Resolution soupravu.

8. Výsledky a analýza (pokrač.)

Přehled markerů

Devyser™ Complete Mix 2

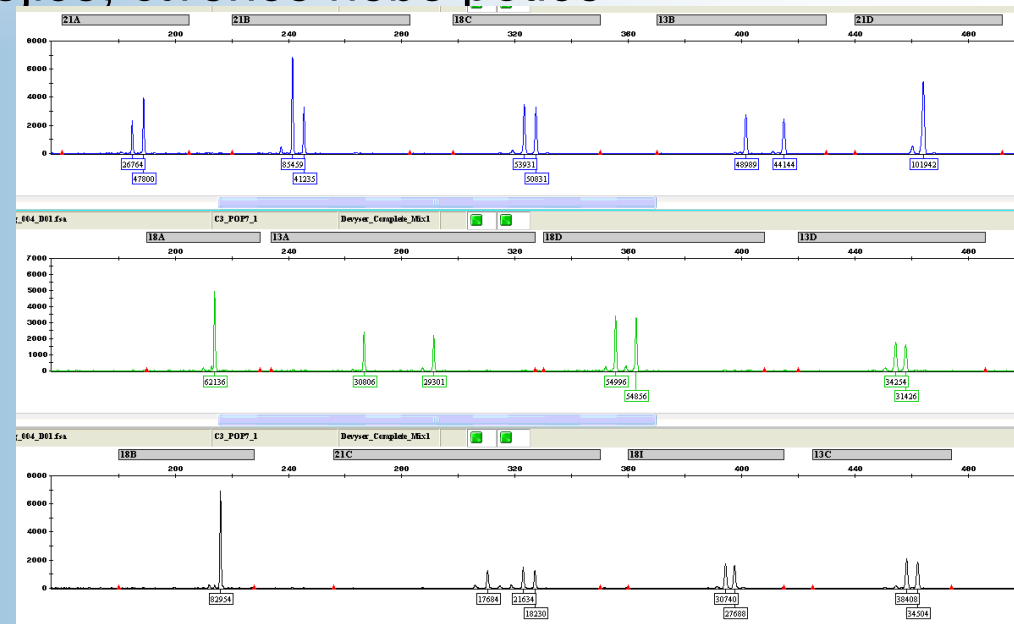
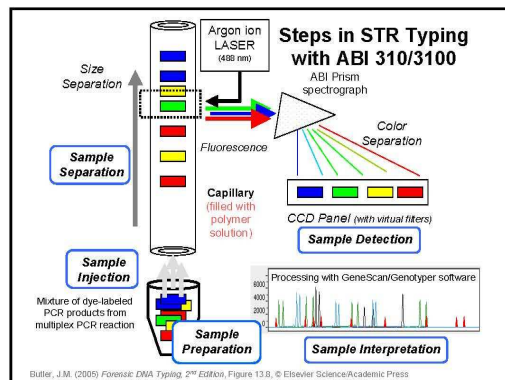
Název Markeru	Pozice	Velikost markeru (bp)* POP-4/POP-6	Velikost markeru (bp)* POP-7	Barva fluoroforu
13E	13q32	160 - 248	160 - 248	Žlutá
13F	13q12	260 - 320	260 - 320	Modrá
13G	13q14	314 - 415	314 - 415	Zelená
18G	18q11	326 - 380	326 - 380	Modrá
18J	18p11	430 - 487	430 - 487	Žlutá
21E	21q22	370 - 410	370 - 410	Žlutá
21F	21q22	386 - 445	388 - 449	Modrá
21G	21q22	430 - 490	430 - 490	Zelená
XY1	Xp22/Yp11	X = 105 Y = 110 (+/- 2bp)	X = 106 Y = 111 (+/- 2bp)	Zelená
XY2	Xp22/Yp11	180 - 220	182 - 222	Modrá
X1	Xq26	120 - 170	120 - 170	Zelená
X2	Xq13	230 - 260	230 - 260	Zelená
X3	Xq26	262 - 315	262 - 315	Žlutá
Y1	Yp11	235 (+/- 2bp)	236 (+/- 2bp)	Modrá
7X	7q34/Xq13	7 = 182 X = 202 (+/- 2bp)	7 = 182 X = 202 (+/- 2bp)	Zelená

*Na základě pozorovaných a kalkulovaných velikostí markerů. Píky markerů s velikostmi mimo dané rozpětí se mohou vyskytnout, ale nezahrnují se do analýzy v rámci Devyser™ Complete. Doporučujeme pro tyto případy použít Devyser™ Resolution soupravu.



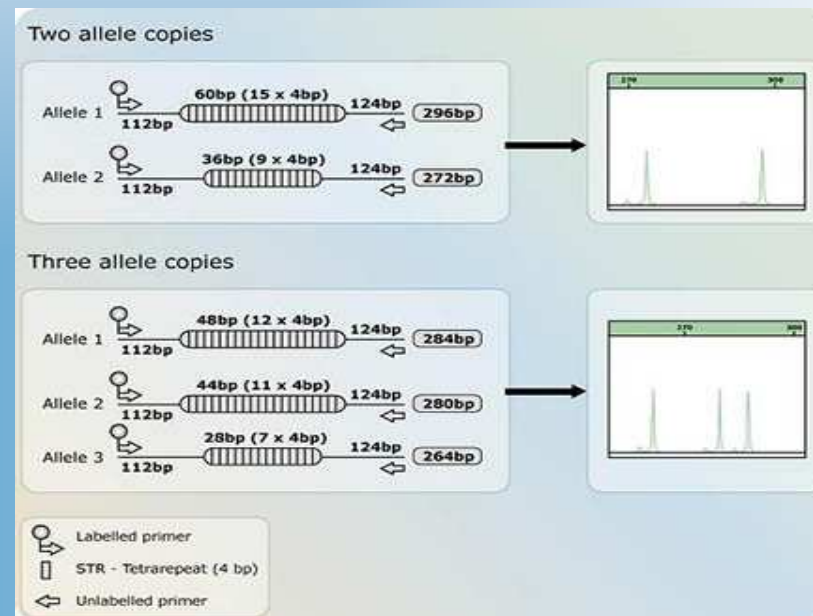
QF-PCR

- Vzniklé PCR produkty jsou separovány a analyzovány pomocí automatického genetického analyzátoru.
- Relativní množství každé STR alely je kvantifikováno pomocí výpočtu poměru obsahu píků, příp. jejich výšek.
- STR se liší mezi jedinci velikostí, podle toho, kolikrát se opakují trojice, čtveřice nebo pětice nukleotidů.



QF-PCR

- V případě diploidie, je signál dvou alel 1:1, když se jedná o homozygota, pak jeden peak s dvojitým signálem.
- Při trizomii dostaneme signál 2:1, 1:2, nebo 3 peaky 1:1:1.
- Chybějící chromozom X u Turnerova syndromu je detekován pomocí poměru X vs. 7. chromosom. U normální ženy je tento poměr 1:1, u postižené je 1:2.



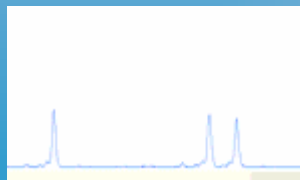
QF-PCR

- DNA amplifikovaná z normálního heterozygotního jedince (má alely s různou velikostí) pro specifickou STR sekvenci bude mít dva píky s odlišnou délkou v daném rozsahu

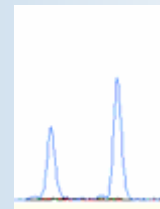
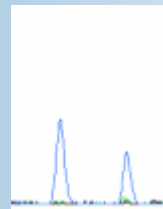


Heterozygotní marker (poměr ploch 1:1)

- DNA amplifikovaná z trinomických jedinců vykáže buď další pík (tři různé alely) se stejnou plochou nebo jen dva píky (dvě různé alely), z nichž jeden má dvojnásobnou plochu, než ten druhý



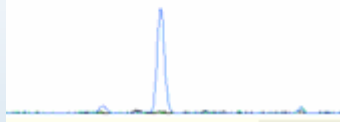
Trizomický troj-alelický marker (poměr ploch 1:1:1)



Trizomický dvoj-alelický marker (8.3: poměr ploch 2:1; 8.4: poměr ploch 1:2)

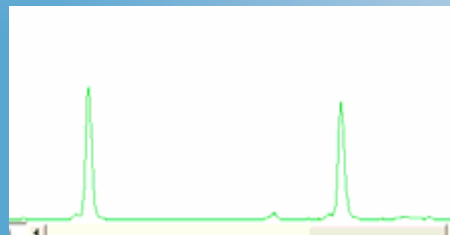
QF-PCR

- QF-PCR Homozygotní jedinci (mají alely se stejnou délkou) nebo monozomní vykážou pouze jeden pík

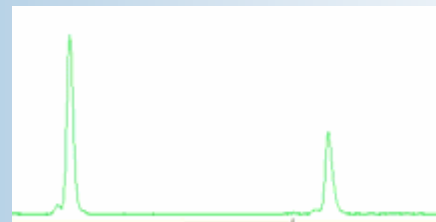


Homozygotní/monozomní marker

Jedinci homozygotní nebo monozomní jsou největším problémem pro testování abnormalit pohlavních chromozomů. Pokud použijeme STR specifické pro chromozom X, některé vzorky z normální ženy XX mohou vykazat homozygotní QF-PCR výsledek, který nelze odlišit od vzorků s jediným X, jako při Turnerově syndromu. Začleněním dalších STR markerů chromozomu X do analýzy redukuje pravděpodobnost homozygotnosti, ale neeliminuje ji zcela. Problém monosomie X řeší 7X marker pro relativní kvantifikaci chromozomů 7 a X. Pro normální ženu je poměr 7X 1:1 Pro normálního muže a ženu s monosomií X je typický poměr 2:1



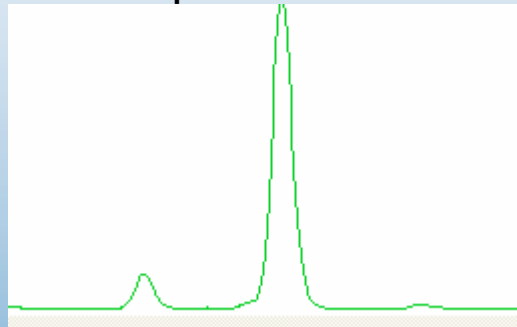
Normální žena s poměrem 7X 1:1. .



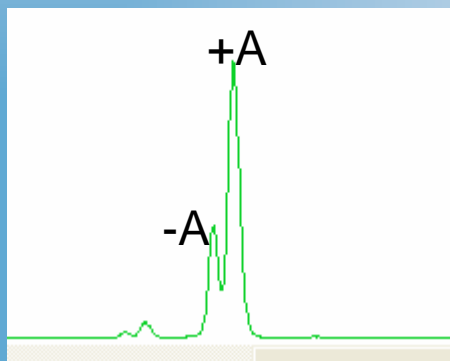
Normální muž s poměrem 7X 2:1. .

Artefakty QF-PCR

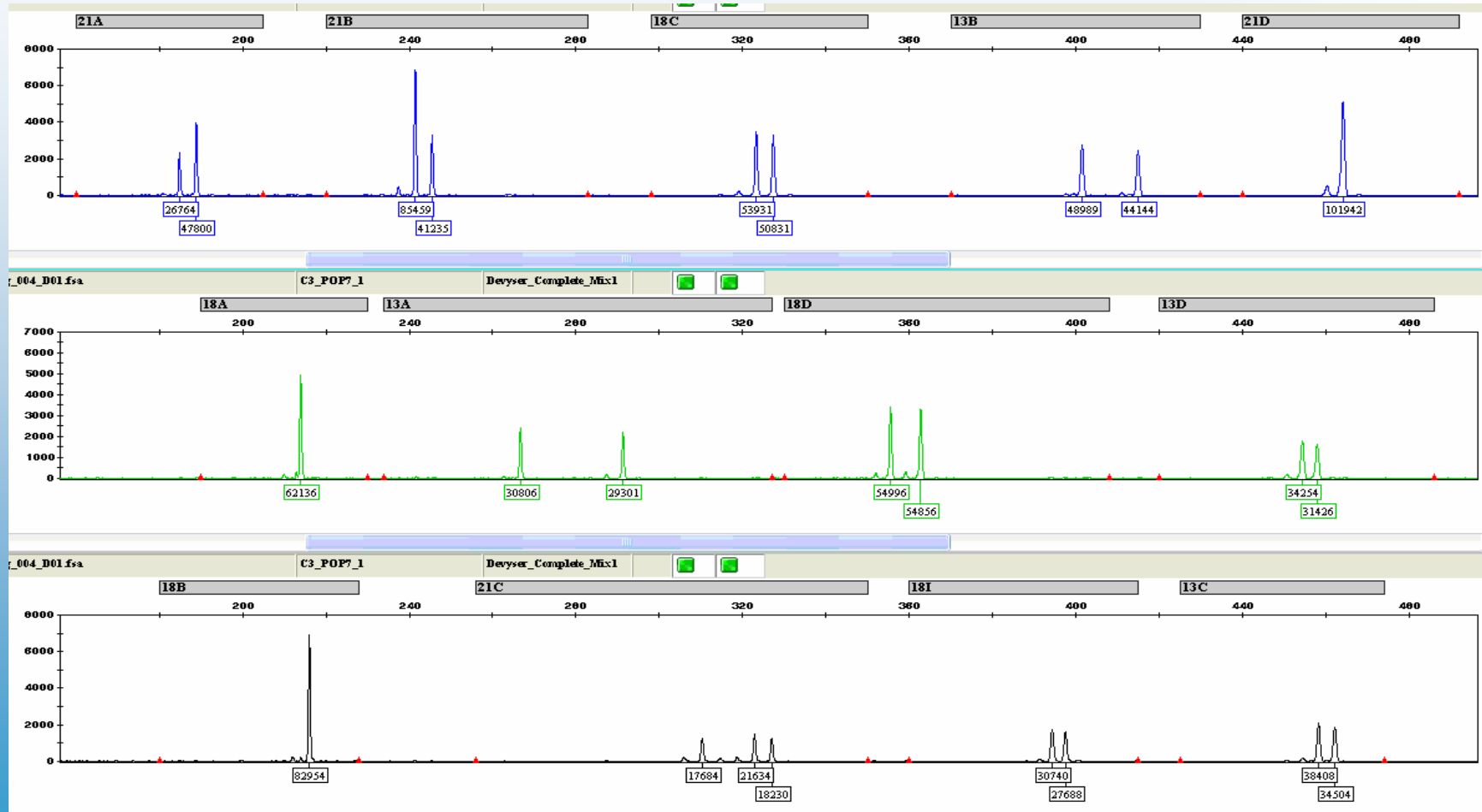
- Stutter píky jsou detekovány jako samostatné píky, které jsou o jednu nebo několik repetic menší, než aktuální STR alela. Typický stutter pík má obsah menší, než 15% vůči příslušnému STR píku.



- -A píky (obr. 8.9) jsou detekovány jako samostatné píky, které jsou o jeden pár bazí kratší, než PCR produkt s plnou délkou (+A pík)



QF-PCR



Typical electropherogram (Mix 1) showing the profile of a trisomic sample (47, XY +21)

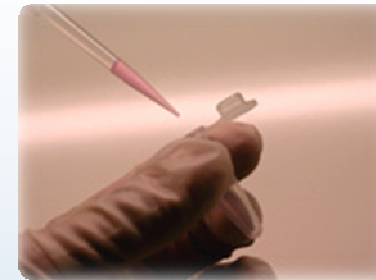
Hodnocení QF-PCR

Review Report

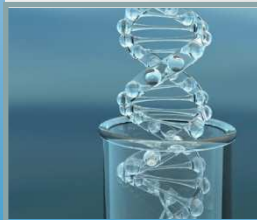
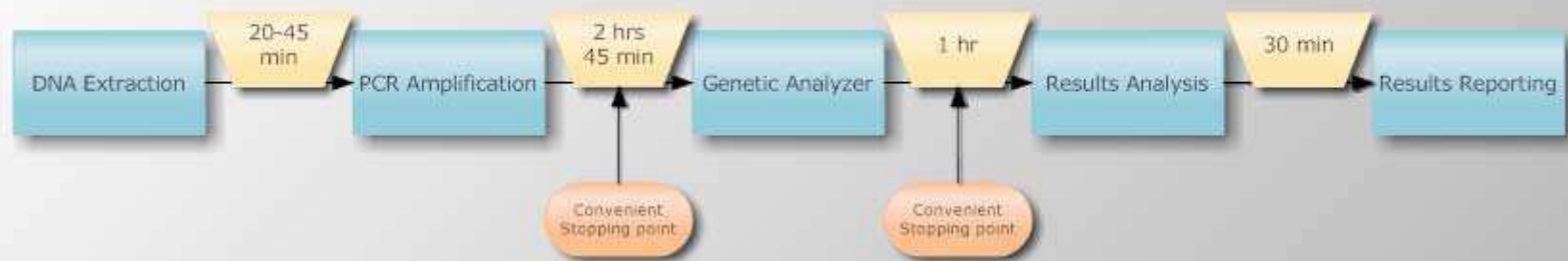
Chromosome T3 Chromosome 10 Chromosome 21 Chromosome XY

MarkerID	Include	Size	Height	Alle	Ratio	Relative peak area (%)	Content
21A	<input type="checkbox"/>						Informative
	<input checked="" type="checkbox"/>	185	731	7853	1:2		
	<input checked="" type="checkbox"/>	185	1210	12038			
21B	<input type="checkbox"/>						Informative
	<input checked="" type="checkbox"/>	242	823	8113	2:1		
	<input checked="" type="checkbox"/>	246	511	4441			
21C	<input type="checkbox"/>						Informative
	<input checked="" type="checkbox"/>	338	257	2554	1:1:1		
	<input checked="" type="checkbox"/>	323	287	3266			
	<input checked="" type="checkbox"/>	327	254	2650			
21D	<input type="checkbox"/>						Non-informative
	<input type="checkbox"/>	457	150	1790			<i>Suspected stutter or A peak</i>
	<input checked="" type="checkbox"/>	465	1733	20511			
21E	<input type="checkbox"/>						Informative
	<input checked="" type="checkbox"/>	387	954	10779	1:2		
	<input type="checkbox"/>	294	105	757			<i>Suspected stutter or A peak</i>
	<input checked="" type="checkbox"/>	395	1533	17246			
21F	<input type="checkbox"/>						Informative
	<input checked="" type="checkbox"/>	291	856	8711	1:1:1		
	<input checked="" type="checkbox"/>	415	778	8556			
	<input checked="" type="checkbox"/>	419	723	7947			
21G	<input type="checkbox"/>						Informative

Approve



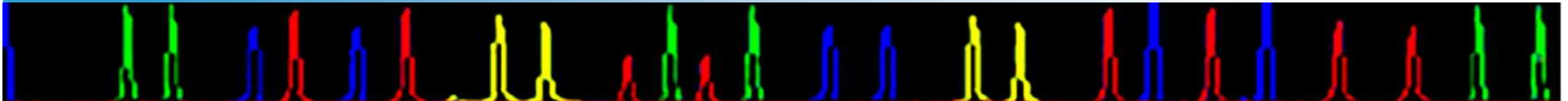
Flowchart Devyser® QF-PCR



Sample	Sex	Age	Ref	Reference	Case
124	M	20	100	1.0	Chromosomes
125	M	20	100	1.0	Chromosomes
126	M	20	100	1.0	Chromosomes
127	M	20	100	1.0	Chromosomes
128	M	20	100	1.0	Chromosomes
129	M	20	100	1.0	Chromosomes
130	M	20	100	1.0	Chromosomes
131	M	20	100	1.0	Chromosomes
132	M	20	100	1.0	Chromosomes
133	M	20	100	1.0	Chromosomes
134	M	20	100	1.0	Chromosomes
135	M	20	100	1.0	Chromosomes
136	M	20	100	1.0	Chromosomes
137	M	20	100	1.0	Chromosomes
138	M	20	100	1.0	Chromosomes
139	M	20	100	1.0	Chromosomes
140	M	20	100	1.0	Chromosomes

Výhody QF-PCR

- odstraňuje nutnost opakovat některé testy s nejasným výsledkem (jako u kayotypizace), protože je každý syndrom analyzován pomocí mnoha STR současně.
- pro každý chromozom jsou zahrnuty i velmi krátké STR úseky, díky nimž lze analyzovat i částečně degradovanou DNA.
- test odhalí kontaminaci mateřskými buňkami, není nutné analyzovat současně vzorky rodičů.
- test zjistí i případný mosaicismus
- detekce Turnerova syndromu
- reagentie v alikvotech zjednodušují použití a snižuje možnost kontaminace
- analýza trvá méně než 5 hodin, takže lze mít výsledky ještě týž den.
- Hands-on doba je cca 90 minut





Nové trendy v prenatální molekulární diagnostice aneuploidií

STR analýzy aneuploidií všech chromozomů
celegonomové sekvenování

Neinvazivní vyšetřovací techniky

Detekce sekvenováním volné fetální DNA izolované z mateřské plasmy

Detekce kvantifikací volné fetální RNA izolované z mateřské plasmy pomocí SNP





Každá dostatečně pokročilá technologie
je k nerozeznání od magie

Arthur C. Clark