

Úloha č. 6

Detekce trombofilních faktorů pomocí fragmentační analýzy

ÚVOD

Jednou ze základních funkcí krve v organismu je udržování stálého vnitřního prostředí tzv. homeostázy, což je základní podmínka pro jeho správné fungování resp. existenci. Vzhledem k této nezastupitelné roli krve v těle, musí existovat mechanismus zabraňující jejím nadměrným ztrátám v případě poranění. Schopnost krve srážet se v místě poranění je složitý mnohastupňový proces, který je na každé úrovni přísně regulován. Účinná regulace tohoto procesu je obzvláště důležitá, protože nekontrolované srážení krve by mělo pro organismus fatální následky.

Podnětem ke vzniku krevní sraženiny však nemusí být pouze vnější poranění, může jít i o souhrn endogenních prokoagulačních faktorů, jako je zpomalení krevního průtoku cévou, poranění krevní cévy či geneticky podmíněná zvýšená krevní srážlivost.

Vznik trombu (krevní sraženiny) v cévním řečišti je spojen s určitým rizikem jeho odtržení a zanesení do plic, kde může omezit či zcela znemožnit průtok krve plícemi. Tento život ohrožující stav se nazývá plicní embolie. Čím blíže k trupu se trombus vytvoří, tím vyšší je riziko jeho uvolnění.

Genetická dispozice ke zvýšené krevní srážlivosti představuje významný rizikový faktor. Jde o případy, kdy jsou v důsledku mutace v těle produkovány krevní faktory v pozměněné formě, což způsobuje např. jejich funkční změny či zvýšenou koncentraci. U osob s těmito dispozicemi ovšem ke spontánním trombózám obvykle nedochází, teprve až v součinnosti s dalšími rizikovými faktory se může, ale také nemusí, krevní sraženina vytvořit.

V rámci cvičení bude provedena analýza tří jednonukleotidových polymorfizmů (SNP) známých genů, které výrazně zvyšují riziko trombóz.

Polymorfismus 20210 G/A genu pro faktor II

Faktor II (protrombin) se vyskytuje na povrchu různých buněk ve formě dimeru. Jeho rozštěpením (v důsledku poškození cévní stěny) vzniká monomerní aktivní forma, která vytváří komplex s dalšími pěti krevními faktory za tvorby tzv. protrombinového komplexu. Tento komplex hydrolyzuje protrombin na proteázu trombin. Ten následně štěpí cirkulující fibrinogen na fibrinové monomery, které spolu rychle polymerují a vytváří síť tvořenou z nerozpustného fibrinu, která je základem pro tvorbu krevní sraženiny.

Mutace 20210 G/A způsobuje zvýšení produkce protrombinu. Jeho koncentrace v plazmě bývá zvýšena nad 130 %, čímž dochází ke zvýšení krevní srážlivosti. Heterozygotní nositel mutace má 2-3x zvýšené riziko žilní trombózy.

Polymorfismus 1691 G/A genu pro faktor V

Jde o plazmatický glykoprotein s klíčovou rolí v koagulaci. V koagulační kaskádě působí buď prokoagulačně (pokud byl natráven trombinem či aktivovaným faktorem X) nebo antikoagulačně (pokud byl natráven aktivovaným proteinem C).

Tzv. Leidenská mutace způsobuje rezistenci faktoru V k aktivovanému proteinu C, což vede k nedostatečné degradaci mutované varianty proteinem C. Tato mutace je nejznámější a nejrozšířenější, vyskytuje se cca u 5 % osob v populaci. Nositelům Leidenské mutace hrozí až 7x vyšší riziko žilní trombózy.

Polymorfismus 677 C/T genu pro MTHFR (5,10-metyltetrahydrofolátreduktáza)

MTHFR katalyzuje přeměnu homocysteinu na methionin. Mutace 677 C/T snižuje aktivitu tohoto enzymu, čímž dochází ke zvýšení hladiny homocysteinu v těle. Homocystein indukce expresi tkáňového faktoru, což zvyšuje trombofilii jak v žilním, tak v arteriálním řečišti. Dále snižuje fibrinolytickou aktivitu, ovlivňuje aktivaci proteinu C a jeho zvýšená hladina v krvi je provázána zvýšením aktivity krevního faktoru XII a V.

Ke genotypizaci vyšetřovaných vzorků bude využita tzv. fragmentační analýza prováděná na genetickém analyzátoru ABI PRISM 3130. Princip metody spočívá v separaci směsi PCR (restrikčních) fragmentů dle své velikosti při kapilární elektroforéze. Každý amplifikát (po restrikci) nese jeden typ fluoroforu, který po ozáření světlem určité vlnové délky emituje světlo jiné vlnové délky, která je zachycována na detektoru. Díky různým typům navázaných fluoroforů excitují amplifikáty při průchodu kapilárou po ozáření laserem světlo různé barvy a intenzity, čímž vznikají tzv. píky. Poloha každého píku vůči známému standardu pak určuje konkrétní alelu daného polymorfizmu.

PRACOVNÍ POSTUP

I. PCR reakce

Materiál: pipety, špičky, popisovače, mikrozkušavky (0,2 ml), termocykler, reagentie pro PCR – KAPA mix, primery, PCR voda, DNA.

MixTromb pro 1 vzorek (5 μ M primery):

0,6 μ l FII (F)	↘	<i>Faktor II</i>
0,6 μ l FII (R*)	↗	
0,6 μ l FV (F)	↘	<i>Faktor V</i>
0,6 μ l FV (R*)	↗	
0,3 μ l MC677T (F*)	↘	<i>MTHFR</i>
0,3 μ l MC677T (R)	↗	
3,0 μ l PCR voda		

F – forward

R – reverse

* fluorescenčně značený primer

Reakční směs pro PCR (15 µl/1 vzorek):

*Kapa mix.....7,5 µl

MixTromb..... 6,0 µl

*DNA (10 ng/µl).....1,5 µl

*DNA – izolát z 1. cvičení

*KAPA2G Fast HotStart ReadyMix – obsahuje HotStart DNA polymerázu, PCR pufr, dNTPs (0,2mM), MgCl₂ (1,5mM), stabilizátory.

Amplifikace fragmentů:

- Mikrozkušavky vložte do termocykleru. Amplifikace bude probíhat dle následujícího programu:

95°C – 2,5 min

31 x | 95°C – 20 sec (denaturace)
55°C – 30 sec (annealing), (ramp 50 %)
72°C – 30 sec (extenze)

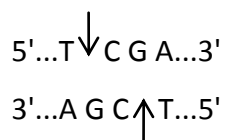
72°C – 30 min (extenze)

10°C – hold

II. Restrikční analýza

Materiál: pipety, špičky, popisovače, mikrozkušavky (0,2 ml), termocykler, reagentie pro restrikční analýzu – PCR produkt, restrikční enzym FastDigest TaqI, 10x FastDigest Buffer, PCR voda.

Restrikční místo enzymu:



Reakční směs:

10x FastDigest Buffer 1,0 µl

TaqI 0,5 µl

PCR voda..... 3,5 µl

PCR produkt 5,0 µl

Teplotní profil restrikce (termocykler Techne): 65°C – 15 min
95°C – 5 min

III. Fragmentační analýza (genetický analyzátor ABI PRISM 3130)

Příprava vzorku na analýzu (96 jamková destička):

1. Do příslušné pozice v destičce napipetujte 9,3 µl formamidu + 0,2 µl markeru LIZ 120 + 0,5 µl PCR produktu (po restrikci).
2. Po napipetování všech vzorků destičku důkladně promíchejte a stočte, vložte do termostatu a inkubujte 5 minut při 95°C.
3. Poté destičku prudce zchladte 1 minutu při -20°C.

Vzorky jsou připraveny k analýze.

Nastavení přístroje:

V programu „3130 DataCollection v3.0“ bude složce „Plate Manager“ zavedena nová destička, do které budou zapsány jednotlivé vzorky a vyplněny příslušné parametry nezbytné pro danou analýzu. Následně bude destička vložena do přístroje a ve složce „Run Scheduler“ spuštěna analýza.

Vyhodnocení výsledků bude provedeno v programu „GeneMapper ID v3.2“.