

„Molekulární diagnostika hemokoagulačních faktorů“

13.12.2018

Ing. Pavla Vykydalová, MBA

Agenda:



- Základní informace o jednonukleotidovém polymorfismu (SNP)
- Faktor II (FII) – Prothrombin (PT)
- Faktor V – Leidenská mutace (FVL)
- Koagulační kaskáda
- Zdravotní komplikace spojené s FII a FV SNP
- MTHFR – C677T, A1298C
- Scorpions vs. HyBeacons
- HyBeacons – Křivka tání (Melt Analysis)
- Reakční podmínky

Koncept Alel a SNP – jednonukleotidový polymorfismus

Alela je alternativní forma genu (jedna část páru) – je umístěna na specifické pozici (lokusu) na specifickém chromosomu



Jednonukleotidový polymorfismus (SNP)

Alela se odlišuje jediným nukleotidem s občasným výsledkem změny enzymové funkce
SNP se objevuje s frekvencí nižší než 1%

Základní informace o SNP

Single Nucleotide Polymorphism (SNP)

Jediná změna báze na specifickém **locusu** DNA

A = Adenine
T = Thymine
C = Cytosine
G = Guanine



Amino Acid Change

No (e.g. intronic polymorphisms)

Yes

Alters protein function or
regulation of protein's synthesis

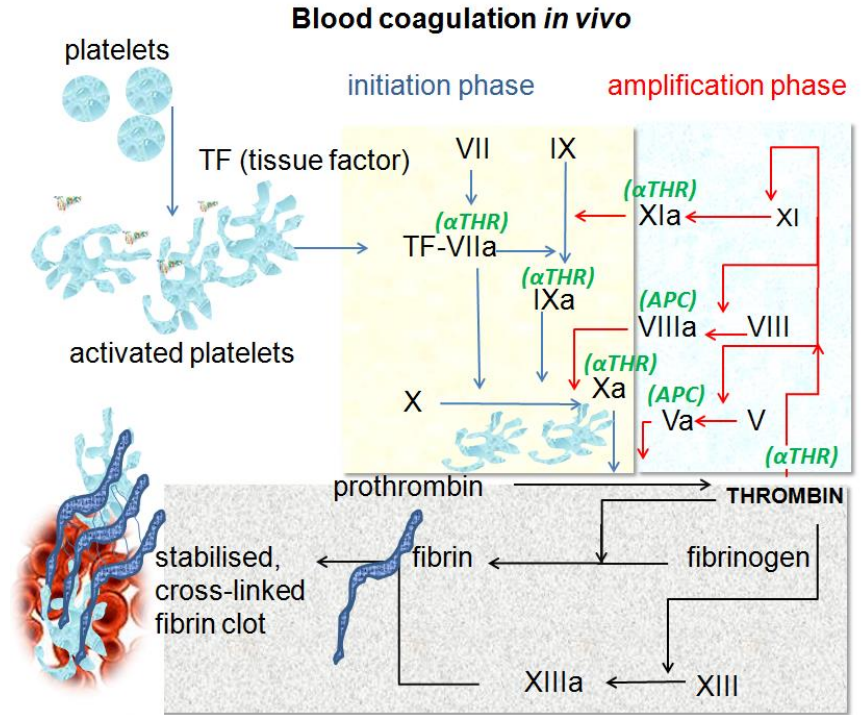
NO: no elevated health risk

Yes

Vyšší risk vrozené vady

Koagulace (Trombóza) SNP mutace

Prothrombin (Factor II)
Factor V Leiden



Factor II Background:

- **Factor II (Prothrombin) gene**

- Lokalizace na Chromosomu 11
- ~21 Kb

Kódování pro Prothrombin – inaktivní forma Thrombinu

- Faktor V a Faktor X katalyzuje syntézu Thrombinu štěpícím procesem

- Trombinová akce:

- Konverze Fibrinogenu na Fibrin ústící v krevní sraženinu
- Zařazení v procesu srážení
- Spojením na trombomodulin, trombin aktivuje Protein C, který naopak inaktivuje Faktor V – snížení srážení

- SNP Faktoru II (G20210A):

- guanine → adenine má za následek (arginine → glutamine) aa #50
- SNP je v **3' nepřekládané oblasti** Prothrombin genu
 - Mutace nemění strukturu Protrombinu ale regulace Protrombinové syntézy je změněna s výsledkem elevace úrovně Protrombinu vedoucí ke zvýšené koagulaci
- **2%** bělochů v Severní Americe má F II (PT) SNP, méně častější pro Hispánce a Afričany, ještě více raritní u Asiatů

Factor V Leiden Background:

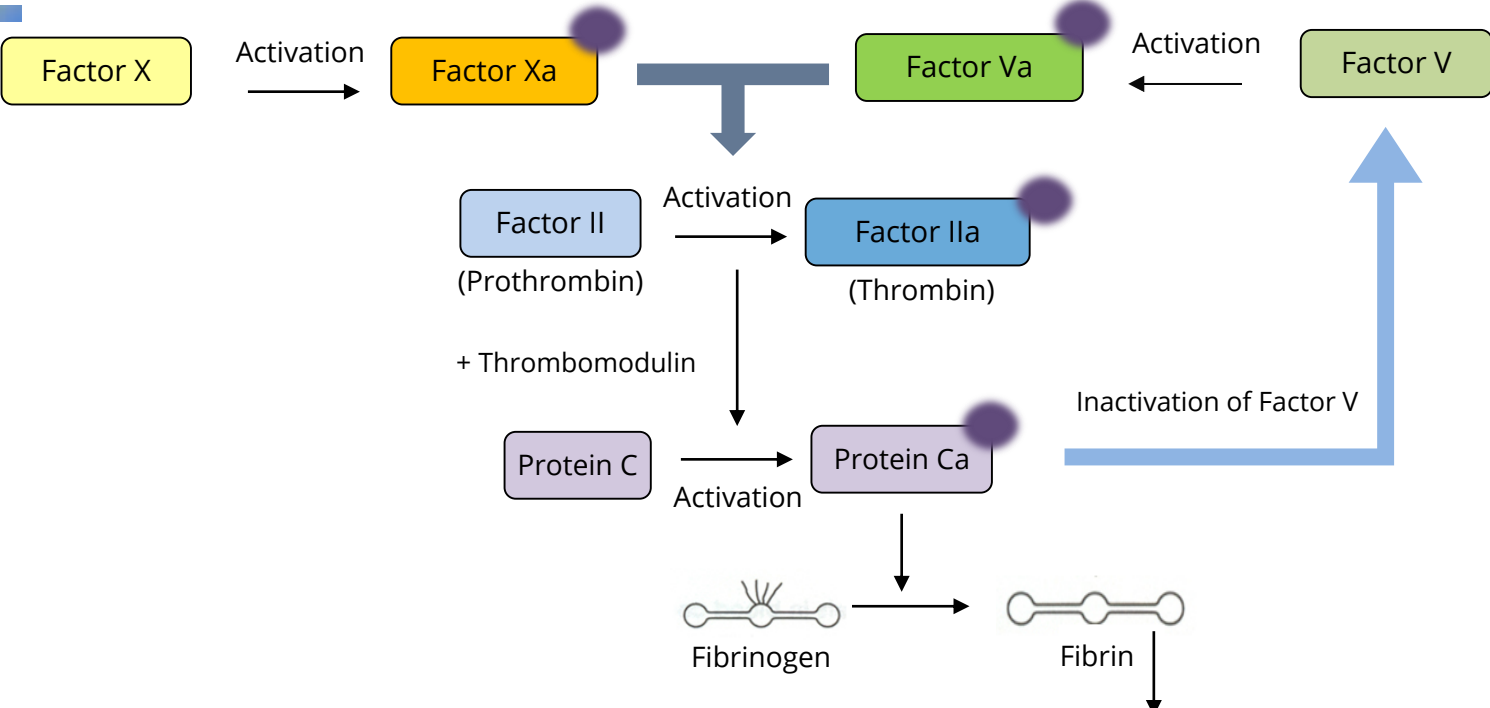
Factor V gen

- Lokalizace na Chromosomu 1
- ~70 Kb
- kóduje Factor V; a kofaktor který pomáhá Faktoru X aktivovat Trombin

Factor V Leiden (FVL)

- SNP poprvé popsán Prof. Bertinou ve městě Leiden (Holandsko; 1994)
- guanine → adenine s výsledkem (arginine → glutamine)
- Tento SNP v genu Faktoru V má za následek nižší citlivost k inaktivaci Proteinu C – nadměrné srážení krve
- **5% bělochů v Severní Americe** má FVL, , méně častější pro Hispánce a Afričany, ještě více raritní u Asiatů

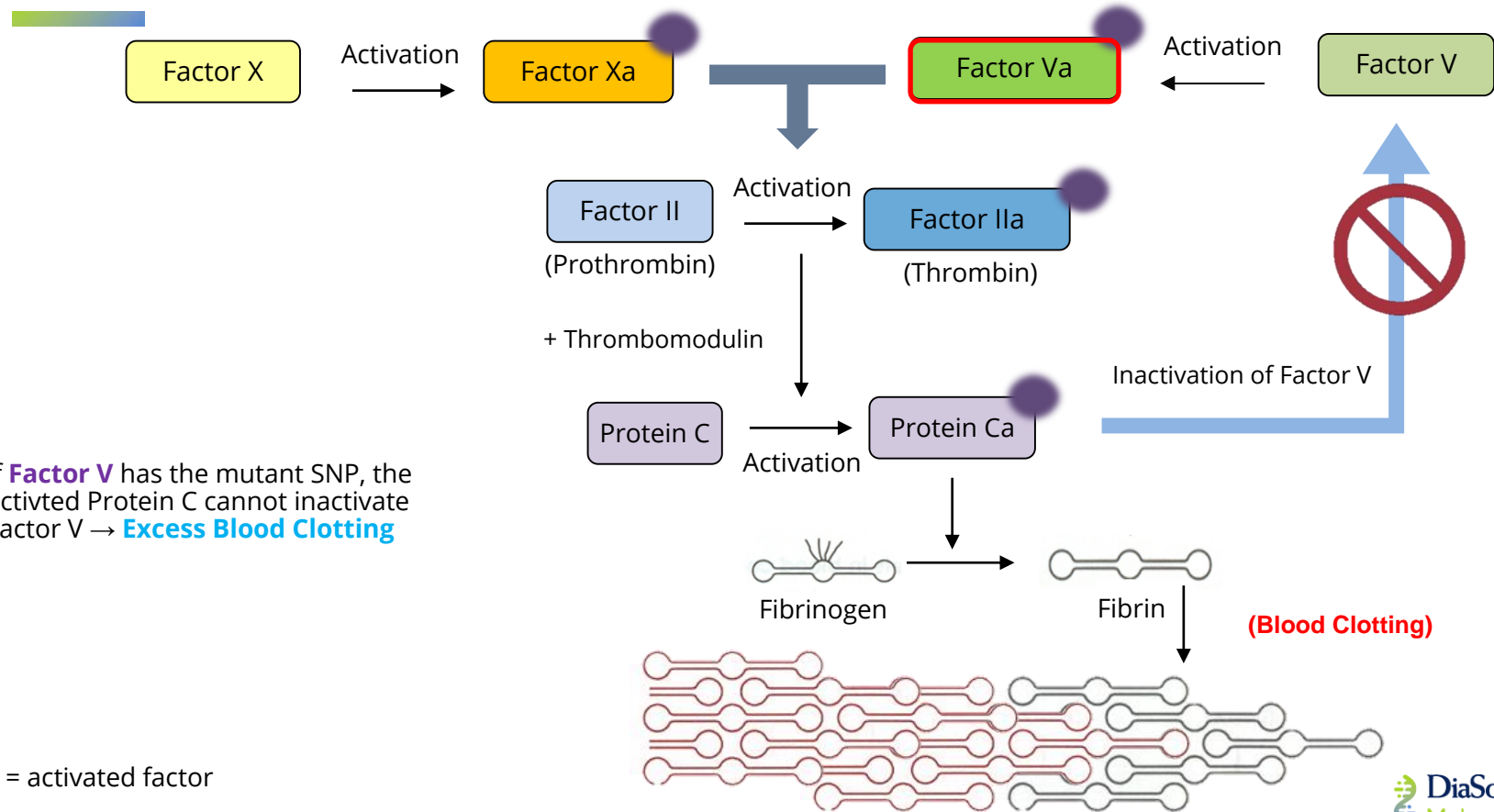
Coagulation Cascade (Truncated)



 = activated factor

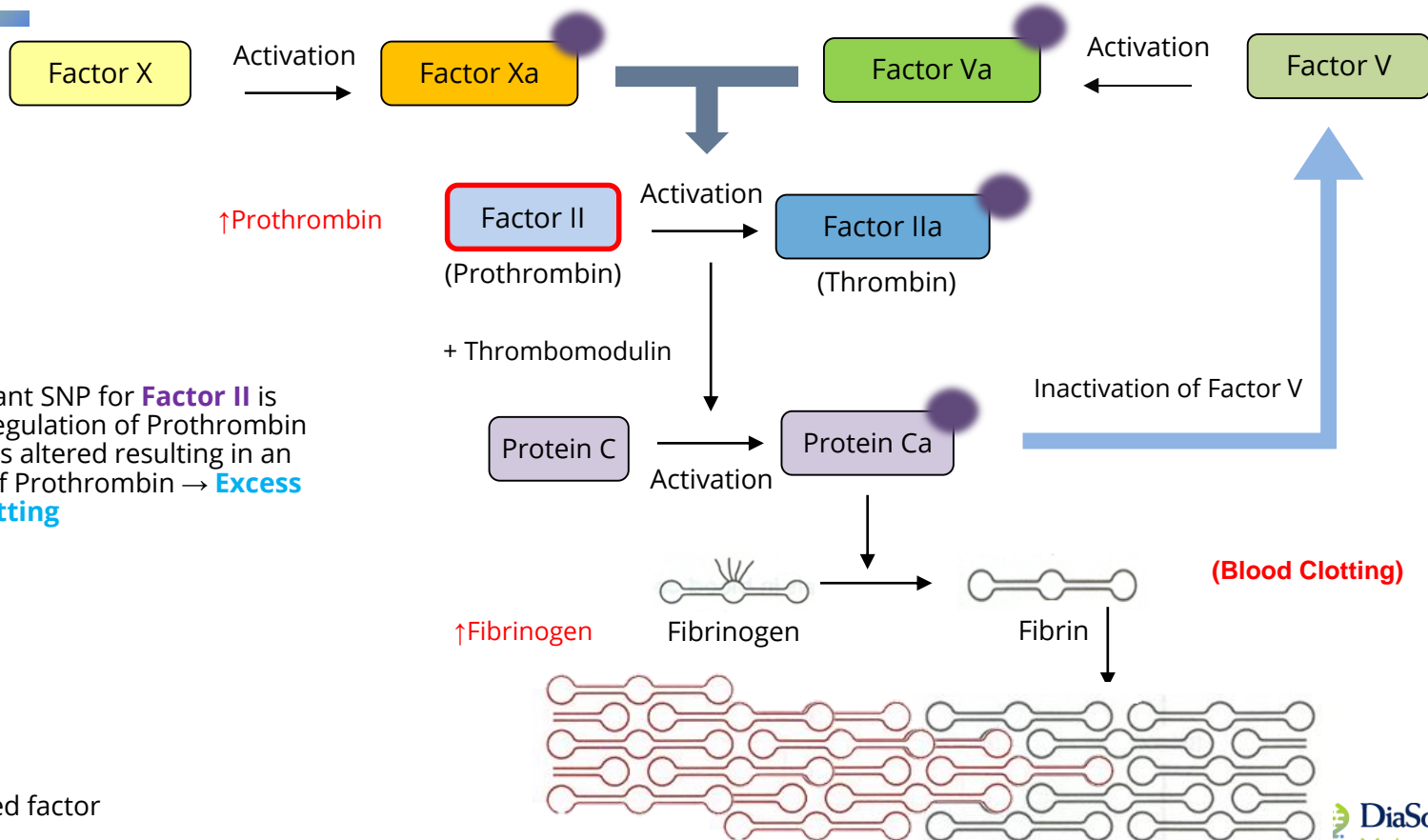
(Blood Clotting)

Coagulation Cascade (Truncated): the role of Factor V SNP



- If **Factor V** has the mutant SNP, the activated Protein C cannot inactivate Factor V → **Excess Blood Clotting**

Coagulation Cascade (Truncated): the role of Factor II SNP



- If the mutant SNP for **Factor II** is present, regulation of Prothrombin synthesis is altered resulting in an increase of Prothrombin → **Excess Blood Clotting**

Zdravotní následky/risk spojený s FII and FV SNP mutace:





- Hluboká žilní trombóza → **pulmonární embolie**
- **Potrat & mrtvý plod**
- **Lidé s HET SNP mutace** mají 3 – 11x vyšší riziko
- **Lidé s HET obou SNP mutace** mají 20x vyšší riziko
- **HOM genotypy obou** SNP mají ještě vyšší riziko (~80x), ale prevalence je nízká (~1 ze 2,000,000 HOM FII a ~1 z 5,000 pro HOM FVL).
- Ženy, které užívají hormonální antikoncepci které mají HET pro FVL mají~20x vyšší riziko, ale dokonce 100 násobně vyšší riziko jestli jsou HOM FVL



DiaSorin Molecular

Technologické řešení

Scalable Simplexa™ Assays

Workflow Option	Direct	Universal Direct	Universal
Disc	 Direct Amplification Disc (DAD) 8-well, multi-use	 Universal Disc (UD) 96-well, single use	
Reagent Prep Needed	No	Yes	
Throughput / 8 hours	up to 56	up to 672	
Extraction Required?	No	No	Yes
Benefits	Sample-to-result Flexible	High throughput Convenient	High throughput Low cost

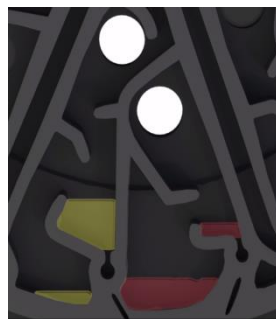
DAD Technologie

DAD with Sample and Reagent placed onto LIAISON® MDX



Instrument uses centrifugal force to meter correct amount of sample

(Underside of the Disc)



Sample metering capabilities ensures correct sample inputs, no precision pipetting

Laser opens Sample valve



Centrifugal force moves sample through channel to amplification chamber

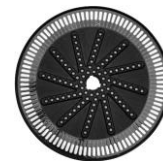
Fluid checks are performed to ensure sample addition and prevents false negatives if a sample is accidentally not loaded



Direct amplification of sample – no DNA/RNA extraction required



Současné řešení firmy DiaSorin



Primers and probes (Scorpion technology)



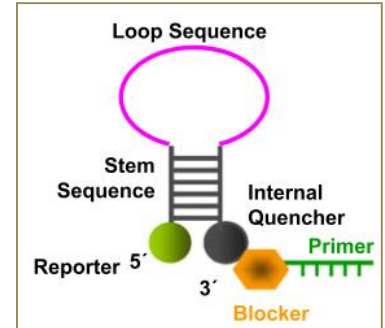
Primer Pairs* – Genetics

PRODUCT#	PRIMER PAIR NAME	GENE TARGET	FLUOR	VOLUME
MOL9052	Prothrombin (FII) Mutant	G20210A	Q 670	50µL
MOL9053	Prothrombin (FII) Wild Type	G20210WT	JOE (560)	50µL
MOL9050	Factor V Leiden Mutant	G1691A	CFR 610	50µL
MOL9051	Factor V Wild Type	G1691WT	FAM (520)	50µL
MOL9054	MTHFR 677 Mutant	C677T	CFR 610	50µL
MOL9055	MTHFR 677 Wild Type	Nucleotide 677	FAM (520)	50µL
MOL9056	MTHFR 1298 Mutant	A1298C	Q 670	50µL
MOL9057	MTHFR 1298 Wild Type	Nucleotide 1298	JOE (560)	50µL

Scorpion technologie

Scorpion technologie je založena na užití primerové oligonukleotidov sondy, která emituje fluorescenci, pokud dojde k inkorporaci do úseku DNA během amplifikace

- **Jedna molekula**
- **Není enzymatické štěpení**
- **Kratší sonda**
- **Okamžitý fluorescenční signál**
- **Nezapojené sondy primeru jsou vypnuté**
- **Napojení a detekce v jedné molekule**



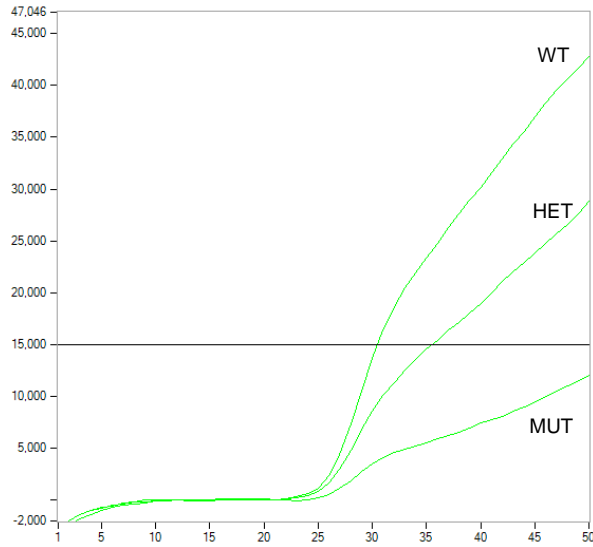
Nižší background

Rychlejší amplifikace

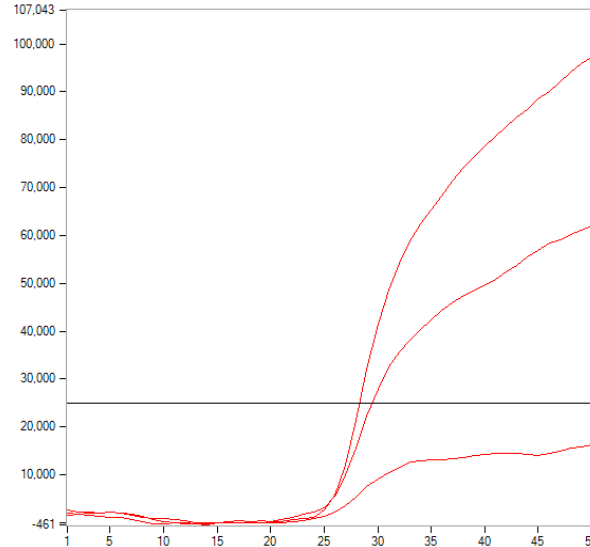
Vyšší signál

Příklad amplifikace pomocí Scorpion technologie

WT Channel



MUT Channel



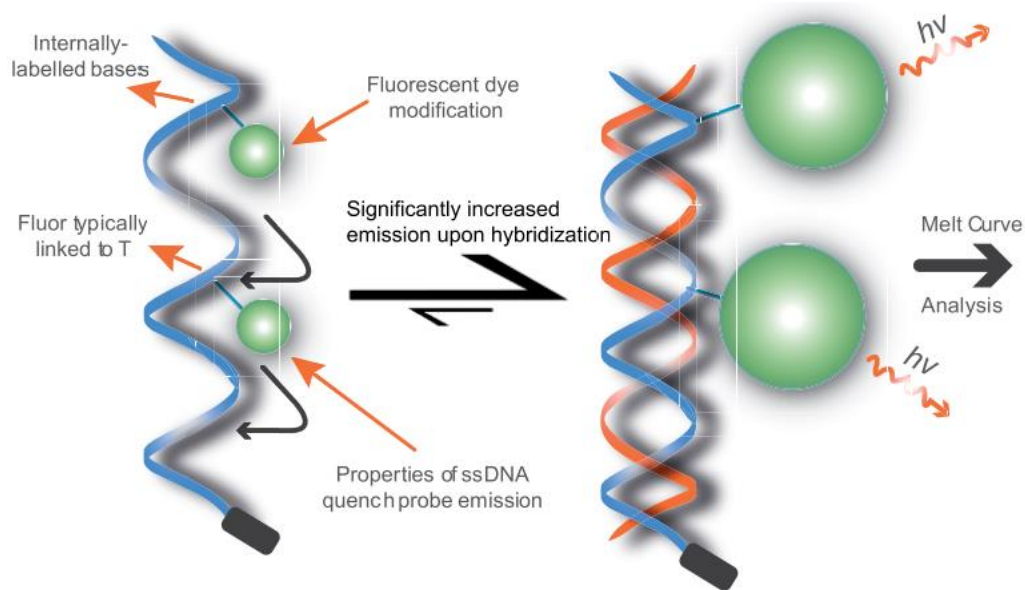
Typical reaction set-up based on literature

Duplex Reaction	
Component	Volume (uL)
Simplexa Master Mix	4
20X WT Primer Pair	0.5
20X MUT Primer Pair	0.5
Nuclease-Free Water	3
Reaction Mix Total Volume	8
Sample Volume*	2
Total Reaction Volume	10

*Extracted DNA or 1:4 diluted WB

HYBRIDIZAČNÍ BEACON SONDY

Jako interkalační barvy.....



Během PCR:

- napojení sondy
- fluorescence vysoce narůstá

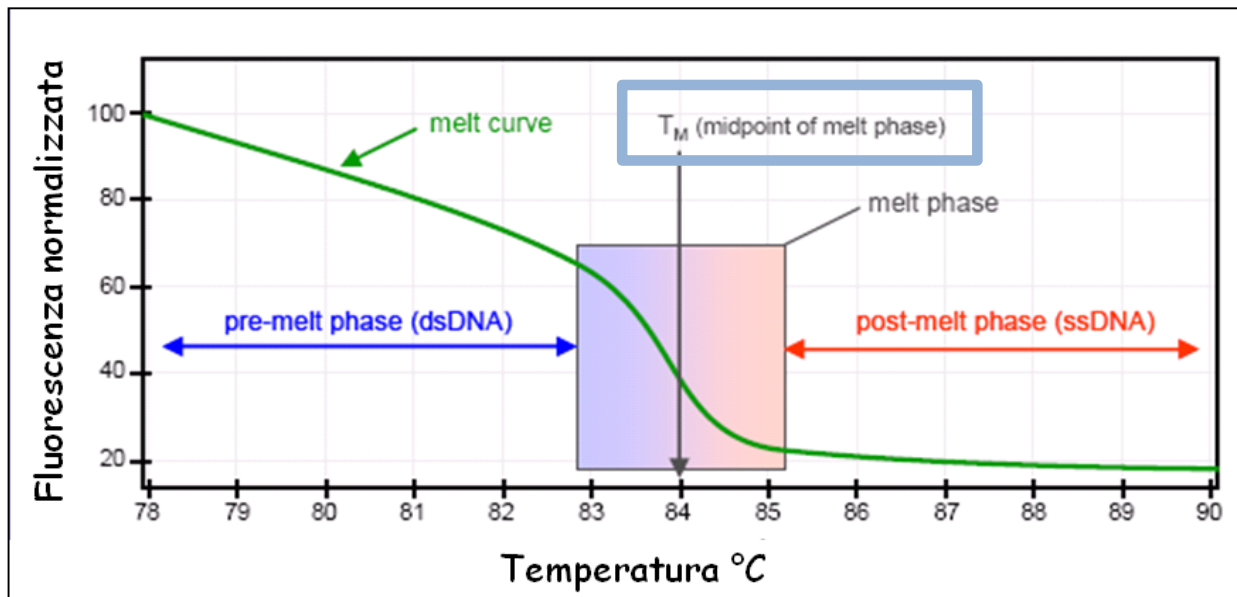
Po amplifikaci:

Analýza křivky tání

- Přítomnost targetu a specifita
- Opakovatelné křivky tání

Základy analýzy křivky tání:

Uvolnění barvy

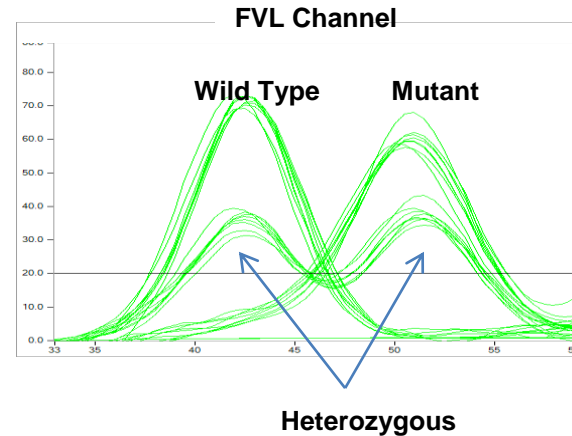
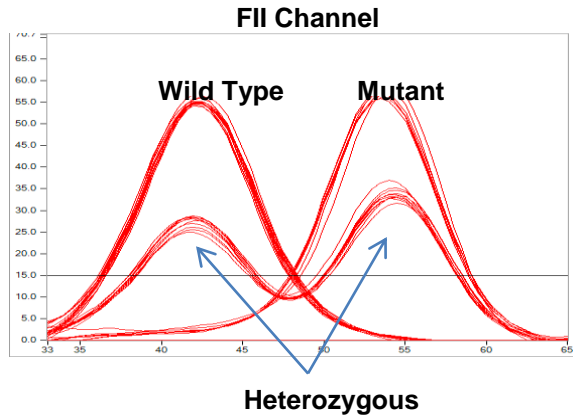
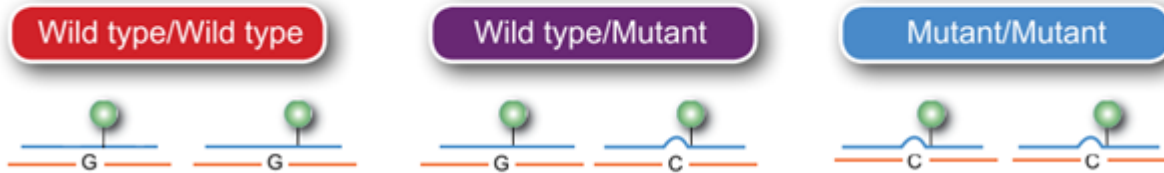


Růst teploty = Fluorescenční signál

Teplota, kde 50% dsDNA je ssDNA se označuje jako bod tání

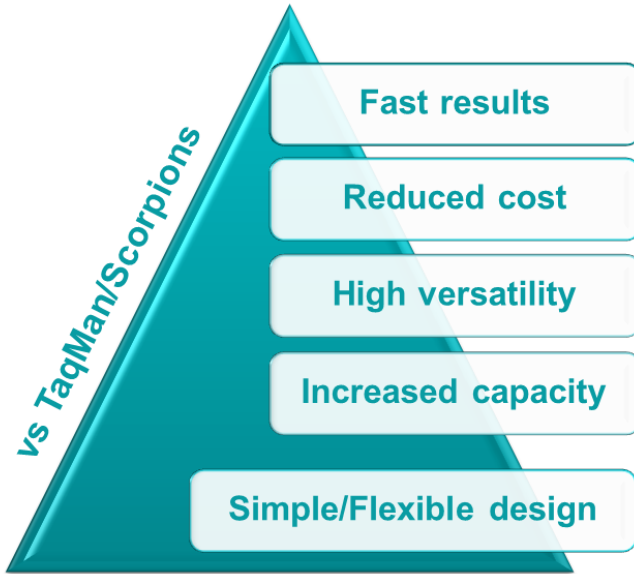
Hybeacon probes

Different sequences (1bp) → ≠ T_m → ≠ melting peaks



Hybeacon sondy výhody

ADVANTGES and APPLICATIONS



- **Melt curve** after a rapid PCR step (**45 min**)
- **One** molecule for at least **2 different variants**
- **Broad range** of **fluorophores**
- **Differentially-labelled** HyB for **multiple targets**
- **No internal** sequence **requirements**
- Discriminatory improv. by **dye number/place**



DiaSorin

Molecular