

Неинвазивна пренатална RHD генотипизација на фетус преку плазма од мајката

Назив на ЈЗУ

Институт за Трансфузиона медицина - Скопје
Република Македонија

Назив на институцијата каде е одржана обуката

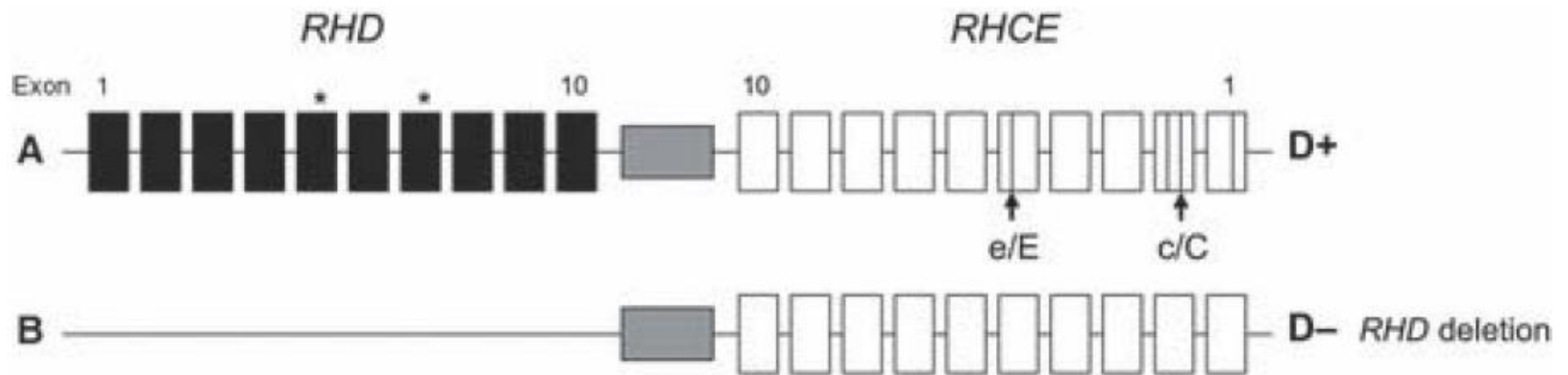
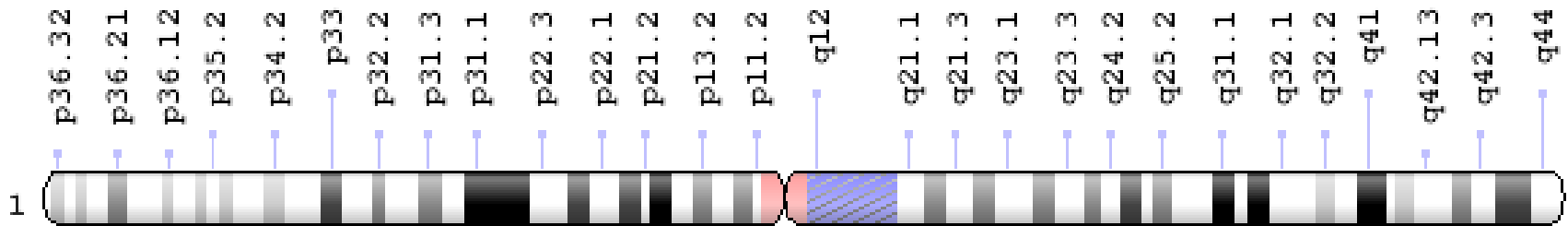
Завод за Трансфузиона медицина - Љубљана
Република Словенија

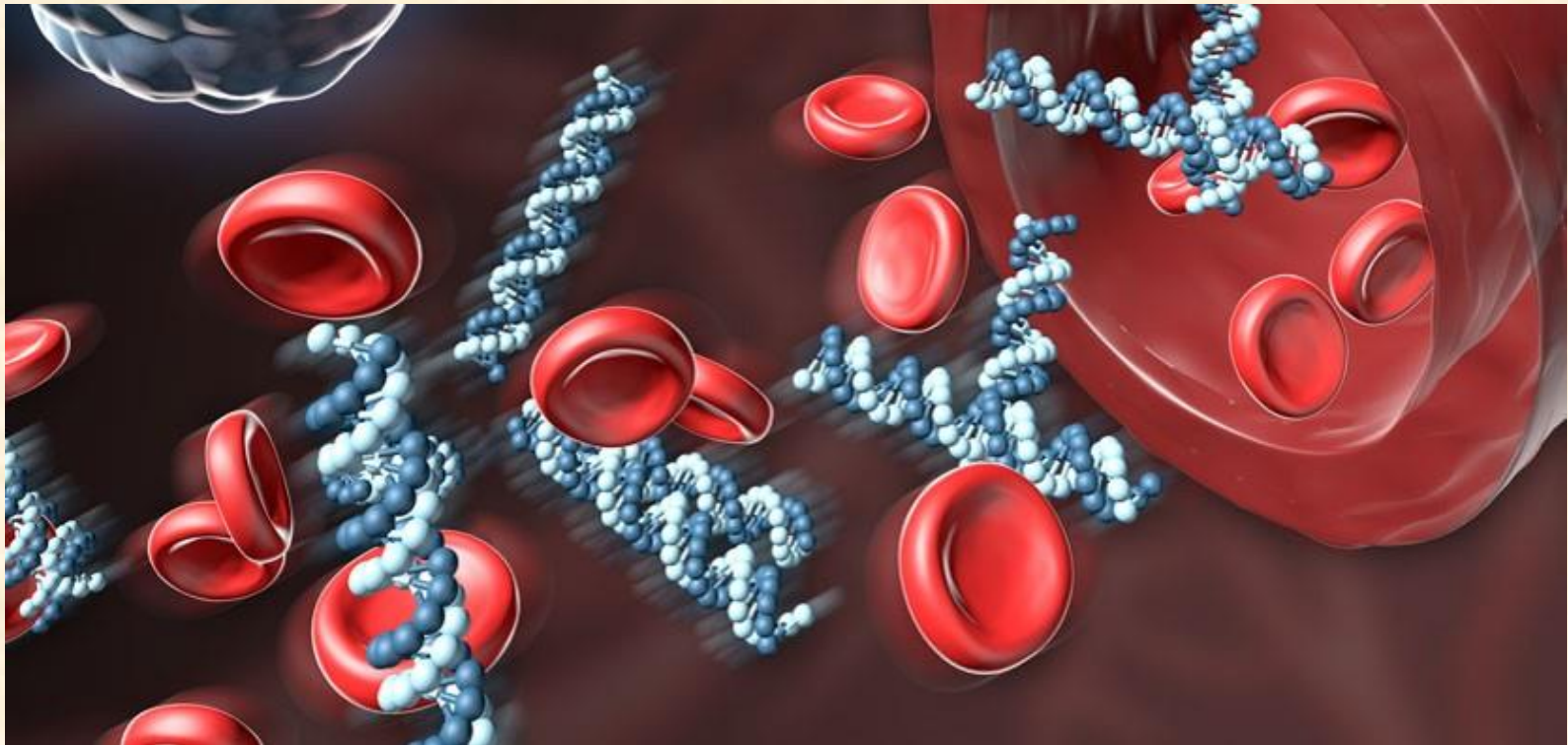
26.09 – 30.09.2016

Виолета Петковска
П. Кадиева

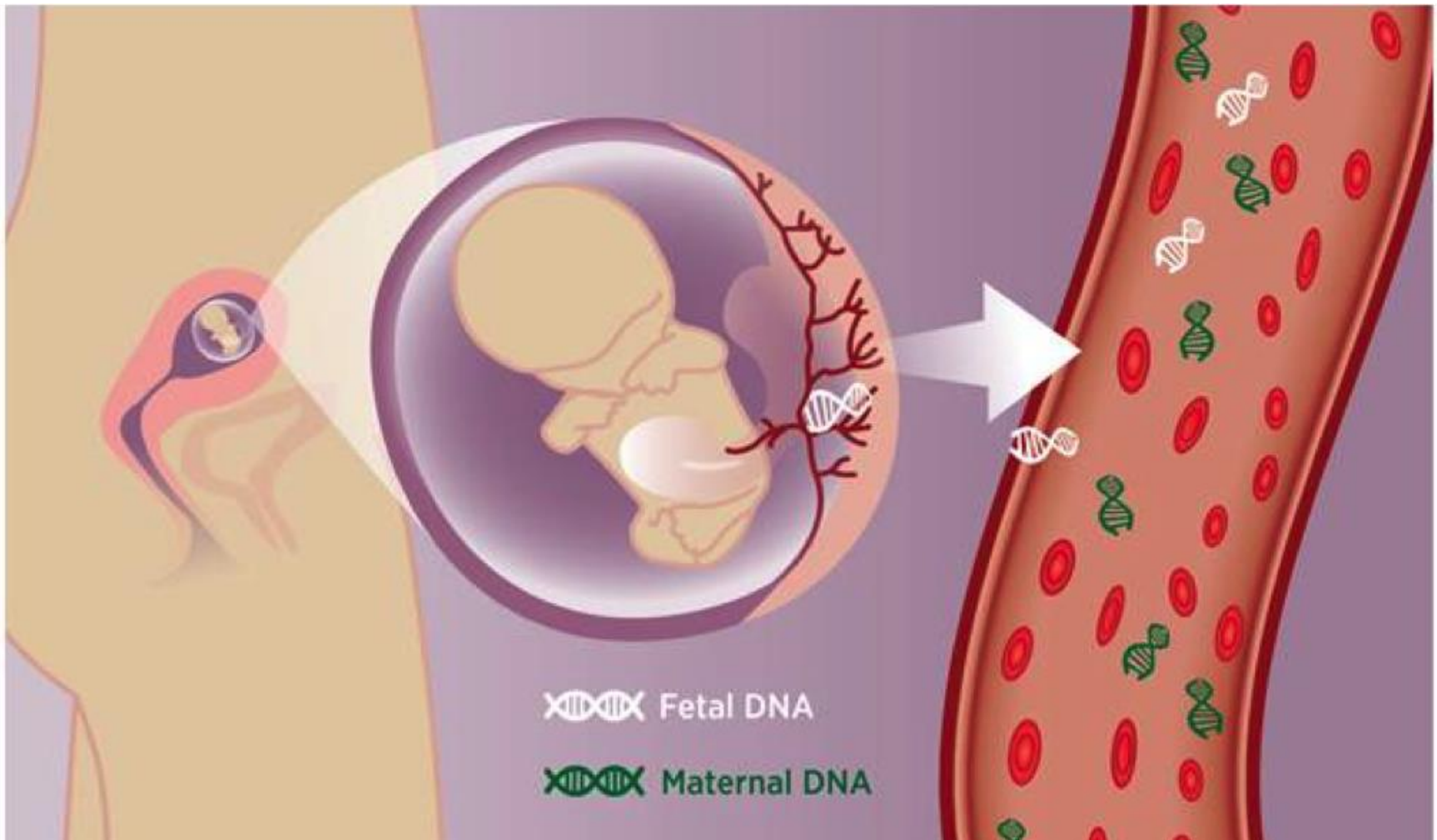
- Rhesus D (RhD) инкомпатибилијата помеѓу RhD-негативна мајка и RhD-позитивен фетус проследена со алосензибилизација и продукција на мајчини анти D антитела е причина за хемолитичка болест на новороденото.
- Со примена на антенаталната и постнаталната анти D профилакса се редуцира ризикот од RhD алоимунизација.
- Во нашата популација околу 85% се RhD позитивни и 15% се RhD негативни индивидуи.
- Притоа, се смета дека околу 40% од RhD негативни бремени жени примаат антенатална профилакса иако носат RhD негативен фетус.
- Откако во 1997 година е успешно изолирана cell-free fetal DNA (cff), неинвазивната детерминација на феталната RHD генотипизација од мајчината плазма почнува да се воведува во се повеќе лаборатории.
- Одредувањето на RhD крвнотипна генотипизација на фетус од мајчина плазма овозможува таргетирана профилакса со IgG anti D, наменета исклучиво на мајки кои носат RhD позитивен фетус.
- Real time - Q PCR е методологија која се користи за детекција на RHD генотипизација преку cell free fetal - cff DNA од плазма на мајката.
- Со цел да се усвојат методите на изолација на cff и Q PCR ја посетивме молекуларната лабораторија при Заводот за трансфузиона медицина во Љубљана – Словенија.

- Испитуван ген RHD
- Локација – првиот хромозом 1Р36.11





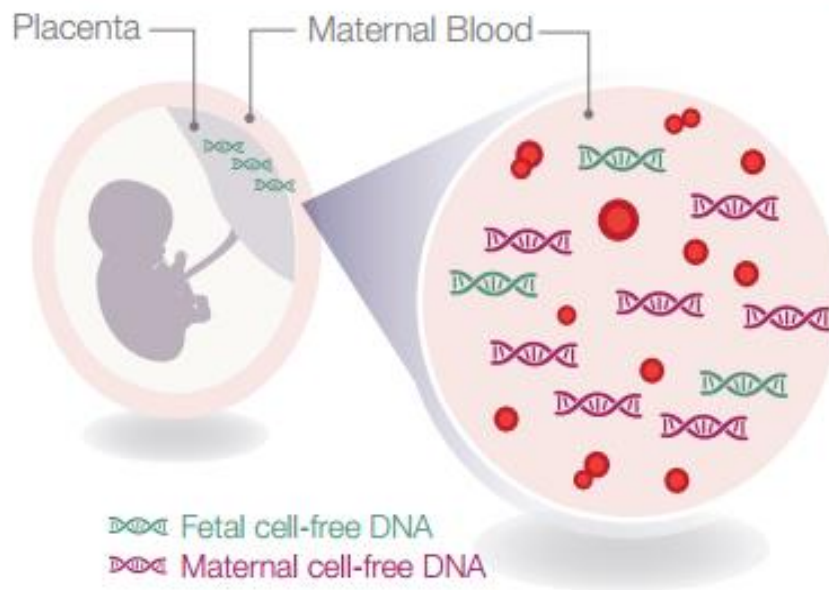
геномска DNA – високо молекуларна DNA
cell free DNA (cf) – кратки фрагменти



Во плазмата на трудниците има:

- Cf DNA
- Cff DNA - се детектира во 7-ма гестациска недела и количината расте во тек на бременоста

Baby's DNA in Mother's Blood



- Cff DNA потекнува од трофобласт - при апоптоза на клетки на трофобластот се ослободува cff DNA
- Cff DNA - кратки фрагменти од 143 б.п.
- Cff DNA опстанува само неколку минути (17) по раѓање и сосема исчезнува за 2 часа по раѓањето, додека феталните клетки преживуваат во циркулација на мајката со години

- 1997 - Ло и соработниците за прв пат откриваат cff DNA преку детекција на Y хромозомот.
- 1998- кратко време потоа биле адаптирани молекуларни анализи за RHD кај Rh D негативни трудници.
- На почеток фокусот бил ставен на откривање на фетален RHD кај имунизирани мајки но покасно се вклучуваат и неимунизирани Rh D негативни трудници.
- 2001 - Finning и соработниците го дизајнираат Q PCR.
- Развиени се есеи за детекција на cff DNA за RHD генотипизација, кои користат различни егзони или комбинација од егзони и интрони користејќи Q PCR.
- Досега многу студии се публикувани на оваа тема кои ја потвдуваат сигурноста на методата.

Земање на крв од трудница за RHD генотипизација

- Оптимално време за не инвазивна детекција на RHD статус на фетус од крв на мајка е 12 гестациска недела.
- Плазма е подобар избор во однос на серум.
- Крв се зема во стандардни епрувети со K_2 -EDTA.
- Крвта се центрифугира на 2500 rpm – 10 минути.
- Се одвојува плазмата 0,5 cm над buffy coat за да се избегне присуството на мајчини клетки.
- Плазмата се центрифугира на 14000 rpm - 10 минути.
- Супернатантот се користи за изолација на cff.
- Автоматски изолирана DNA е подобра од мануелна екстрација, се избегнува контаминација.
- Екстракцијата се изведува веднаш по добивањето на крвта (заради лизирање на мајчини крвни клетки и ослободување геномска DNA).
- Cff DNA се елуира во 60 μ l и се подесува конц од 40 μ g/ml.
- Поставување на Q PCR.

Real-time PCR- Q PCR

- Real time PCR е техника која се базира на конвенционалниот PCR вклучувајќи амплификација на таргет DNA секвенца.
- PCR започнува со денатурација на двојноверижната DNA на 94°C, следи анилирање на слободни нуклеотиди кон прајмерите со помош на Taq полимераза на 60°C и елонгација на DNA секвенцата на 72°C.
- Real-time PCR се разликува од конвенционалниот PCR по тоа што е овозможено симултано мерење на количината на произведените PCR фрагменти во секоја фаза од реакцијата.
- Реакцијата се изведува во машини - thermocycler, кои освен системот за брзо загревање и ладење на термоблокот имаат интегриран оптички систем кој го отчитува флуоресцентниот сигнал кој е право пропорционален со количината на добиените ампликони во тек на реакцијата.

- Q PCR освен прајмери вклучува и флуоресцентно обележани олигонуклеотидни проби кои специфично се врзуваат за одредено место во ДНК секвенцата. Обележувањето потекнува од флуоресцентна боја репортер која се наоѓа на едниот крај од пробата, додека на другиот постои еден вид на придушувач кој го оневозможува емитувањето на светлина од репортерот, сè додека интерно хибридризираната проба не се прекине долж нејзината секвенца. Прекинувањето е предизвикано од полимеризираната верига која со помош на *Taq* полимеразата започнува да се издолжува и полека почнува да ја одделува пробата хибридризирана за ДНК.
- Кога новата полимеризирана верига достигне некаде до половина од должината за флуоресцентната проба, репортерот се одделува од придушувачот (quencher) и почнува да емитува светлина која е регистрирана од страна на оптичкиот систем на апаратот.

1. Полимеризација



2. Изместување на пробата



3. Расцепување на пробата



4. Завршена полимеризација



Мултиплекс QPCR есеј ги вклучува: интрон 4, егзон 5, егзон 7, егзон 10, SRY, ген за албумин

Specificity	Sequence (5'→3')	Concentration in qPCR, nM	Ref.
<i>RHD</i> intron 4			in-house
Forward	GCCCTTCCATCATGATTCATTT	800	
Reverse	ACAAGGAAACAAAAGGCCAAGAG	800	
MGB probe	FAM-AAGCACATTCACAGAGCA-MGB	300	
<i>RHD</i> exon 5			[11]
Forward	CGCCCTCTTCTTGTTGGATG	200	
Reverse	GAACACGGCATTCTTCCTTTC	200	
TaqMan probe	FAM-TCTGGCCAAGTTTCAACTCTGCTCTGCT-TAMRA	50	
<i>RHD</i> exon 7			[33]
Forward	GTAACCGAGTGCTGGGGATT	800	
Reverse	CTCCAAGCAGACCCAGCAA	800	
MGB probe	FAM-ACAGCTCCATCATGG-MGB	350	
<i>RHD</i> exon 10			[33]
Forward	TGCCTGCATTGTACGTGAGA	800	
Reverse	CCTGCGCGAACATTGGA	800	
MGB probe	FAM-ACGTCATGACAGCAA-MGB	300	
<i>SRY</i>			[33]
Forward	CGTGCATCCACCAGCAGTAA	600	
Reverse	TGGTTGCTAAGGACTGGATGAA	600	
MGB probe	FAM-TCCCCACAACCTC-MGB	200	
<i>ALB</i>			[33]
Forward	GCTGTCATCTTGTGGGCTGT	400	
Reverse	ACAACAATGCCAGGGAGAGATTT	400	
MGB probe	FAM-ACTCTTAAGCCTAGACGAT-MGB	150	

MGB = Minor groove binder.

Секвенци на прајмери, проби, финална
концентрација при Q PCR реакцијата

Komponenti vključeni vo ispituvanje na: intron 4; egzon 5,7,10; SRY; albumin

qPCR PLODOVA DNA RHD, SRY, ALB 29.09.2016

primerji sonde
 RHD int4 - F RHD int4 - FAM-NFQ
 RHD int4 - R RHD int4 - FAM-NFQ
 RHD ekson 5 - F RHD ekson 5 - FAM_TAMRA
 RHD ekson 5 - R RHD ekson 5 - FAM_TAMRA
 RHD ex7 - ABI RHD ex7 - FAM-NFQ
 RHD ex10 - ABI RHD ex10 - FAM-NFQ
 SRY - F SRY - FAM-NFQ
 SRY - R SRY - FAM-NFQ
 albumin - F albumin - FAM-NFQ
 albumin - R albumin - FAM-NFQ

1	RHD intron 4 delovna konc. 10 pmol/ul		št. reakcij (ul)
Reakcijska komponenta	Volumen (ul) na vzorec	Končna konc. (nM)	
TaqMan Gene Expression Master Mix (2X)	10	1X	130
DNA vzorec	5	/	/
Voda	1.2	/	15.6
Forward primer	1.6	800	20.8
Reverse primer	1.6	800	20.8
TaqMan probe (FAM-NFQ)	0.6	300	7.8
skupaj	20	/	195

Po 15 ul/reakcijo.

2	RHD ekson 5 delovna konc. 10 pmol/ul		št. reakcij (ul)
Reakcijska komponenta	Volumen (ul) na vzorec	Končna konc. (nM)	
TaqMan Gene Expression Master Mix (2X)	10	1X	130
DNA vzorec	5	/	/
Voda	4.1	/	53.3
Forward primer	0.4	200	5.2
Reverse primer	0.4	200	5.2
TaqMan probe (FAM-TAMRA)	0.1	50	1.3
skupaj	20	/	195

Po 15 ul/reakcijo.

3	RHD ex7 - ABI delovna konc. 10 pmol/ul		št. reakcij (uL)
Reakcijska komponenta	Volumen (uL) na vz.	Končna konc. (nM)	
TaqMan Gene Expression Master Mix (2X)	10.0	1X	130
DNA vzorec	5.0	/	/
Voda	4.0	/	52
Mix primerjev in sond (assay by design)	1.00	(900/250)	13
skupaj	20.00	/	260

Po 15 ul/reakcijo.

4	RHD ex10 - ABI delovna konc. 10 pmol/ul		št. reakcij (uL)
Reakcijska komponenta	Volumen (uL) na vz.	Končna konc. (nM)	
TaqMan Gene Expression Master Mix (2X)	10.0	1X	130
DNA vzorec	5.0	/	/
Voda	4.0	/	52
Mix primerjev in sond (assay by design)	1.00	(900/250)	13
skupaj	20.00	/	260

Po 15 ul/reakcijo.

5	SRY delovna konc. 10 pmol/ul		št. reakcij (ul)
Reakcijska komponenta	Volumen (ul) na vzorec	Končna konc. (nM)	
TaqMan Gene Expression Master Mix (2X)	10	1X	130
DNA vzorec	5	/	/
Voda	2.2	/	28.6
Forward primer	1.2	600	15.6
Reverse primer	1.2	600	15.6
TaqMan probe (FAM-NFQ)	0.4	200	5.2
skupaj	20	/	195

Po 15 ul/reakcijo.

6	albumin delovna konc. 10 pmol/ul		št. reakcij (ul)
Reakcijska komponenta	Volumen (ul) na vzorec	Končna konc. (nM)	
TaqMan Gene Expression Master Mix (2X)	10	1X	200
DNA vzorec	5	/	/
Voda	3.1	/	62
Forward primer	0.8	400	16
Reverse primer	0.8	400	16
TaqMan probe (FAM-NFQ)	0.3	150	6
skupaj	20	/	300

Po 15 ul/reakcijo.

Prosta (fetal) DNA - 5 uL/reakcijo.
 gDNA - 2uL gDNA + 3uL H2O na reakcijo

Во Real time инструментите примероците се ставаат во специјални оптички плочи на кои може истовремено да се одвиваат 96 или 384 реакции. Подготвувањето на инструментот за работа е преку користење на компатибилно креиран софтвер.

ViiA™ 7 Software v1.2.4

File Edit Instrument Analysis Tools Help

New Experiment Open Save Close Import Create Slide Print Report

Experiment: 2016-09-29 132035 fetaln... Type: Standard Curve Reagents: TaqMan® Reagents

Define and Set Up Standards

Targets

Name	Task	Quantity
<input type="checkbox"/> RHD intron 4		
<input type="checkbox"/> RHD ekson 5		
<input type="checkbox"/> RHD ekson 7		
<input type="checkbox"/> RHD ekson 10		
<input type="checkbox"/> SRY		
<input checked="" type="checkbox"/> ALBUMIN	S	

Samples

Name
<input type="checkbox"/> AL - F, g19t
<input type="checkbox"/> DE - F, g28t
<input type="checkbox"/> H2O
<input type="checkbox"/> NK 845608
<input type="checkbox"/> NK S5-F
<input type="checkbox"/> PK S5-M
<input type="checkbox"/> S2-M
<input type="checkbox"/> S3-M
<input type="checkbox"/> S4-M

Biological Groups

- Biological Group

Plate Layout Well Table

Show in Wells Select Wells View Legend

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PK S5-M U RHD in...	NK 845608 U RHD in...	H2O N RHD in...	PK S5-M U RHD in...	NK 845608 U RHD in...	H2O N RHD in...	PK S5-M U RHD in...	NK 845608 U RHD in...	H2O N RHD in...	PK S5-M U RHD in...	NK 845608 U RHD in...	H2O N RHD in...
B	PK S5-M U RHD in...	NK 845608 U RHD in...	H2O N RHD in...	PK S5-M U RHD in...	NK 845608 U RHD in...	H2O N RHD in...	PK S5-M U RHD in...	NK 845608 U RHD in...	H2O N RHD in...	PK S5-M U RHD in...	NK 845608 U RHD in...	H2O N RHD in...
C	DE - F, g... U RHD in...	DE - F, g... U RHD in...	DE - F, g... U RHD in...	DE - F, g... U RHD in...	DE - F, g... U RHD in...	DE - F, g... U RHD in...	DE - F, g... U RHD in...	DE - F, g... U RHD in...	DE - F, g... U RHD in...	DE - F, g... U RHD in...	DE - F, g... U RHD in...	DE - F, g... U RHD in...
D	AL - F, g... U RHD in...	AL - F, g... U RHD in...	AL - F, g... U RHD in...	AL - F, g... U RHD in...	AL - F, g... U RHD in...	AL - F, g... U RHD in...	AL - F, g... U RHD in...	AL - F, g... U RHD in...	AL - F, g... U RHD in...	AL - F, g... U RHD in...	AL - F, g... U RHD in...	AL - F, g... U RHD in...
E												
F	PK S5-M U SRY	PK S5-M U SRY	NK S5-F U SRY	NK S5-F U SRY	H2O N SRY	H2O N SRY	DE - F, g... U SRY	DE - F, g... U SRY	DE - F, g... U SRY	AL - F, g... U SRY	AL - F, g... U SRY	AL - F, g... U SRY
G	NK S5-F U ALBUM...	NK S5-F U ALBUM...	NK 845608 U ALBUM...	NK 845608 U ALBUM...	DE - F, g... U ALBUM...	DE - F, g... U ALBUM...	AL - F, g... U ALBUM...	AL - F, g... U ALBUM...				
H	S2-M S ALBUM...	S2-M S ALBUM...	S3-M S ALBUM...	S3-M S ALBUM...	S4-M S ALBUM...	S4-M S ALBUM...	PK S5-M S ALBUM...	PK S5-M S ALBUM...	H2O N ALBUM...	H2O N ALBUM...		

Wells: U 58 S 8 N 12

18 Empty

Home 2016-09-29 13...

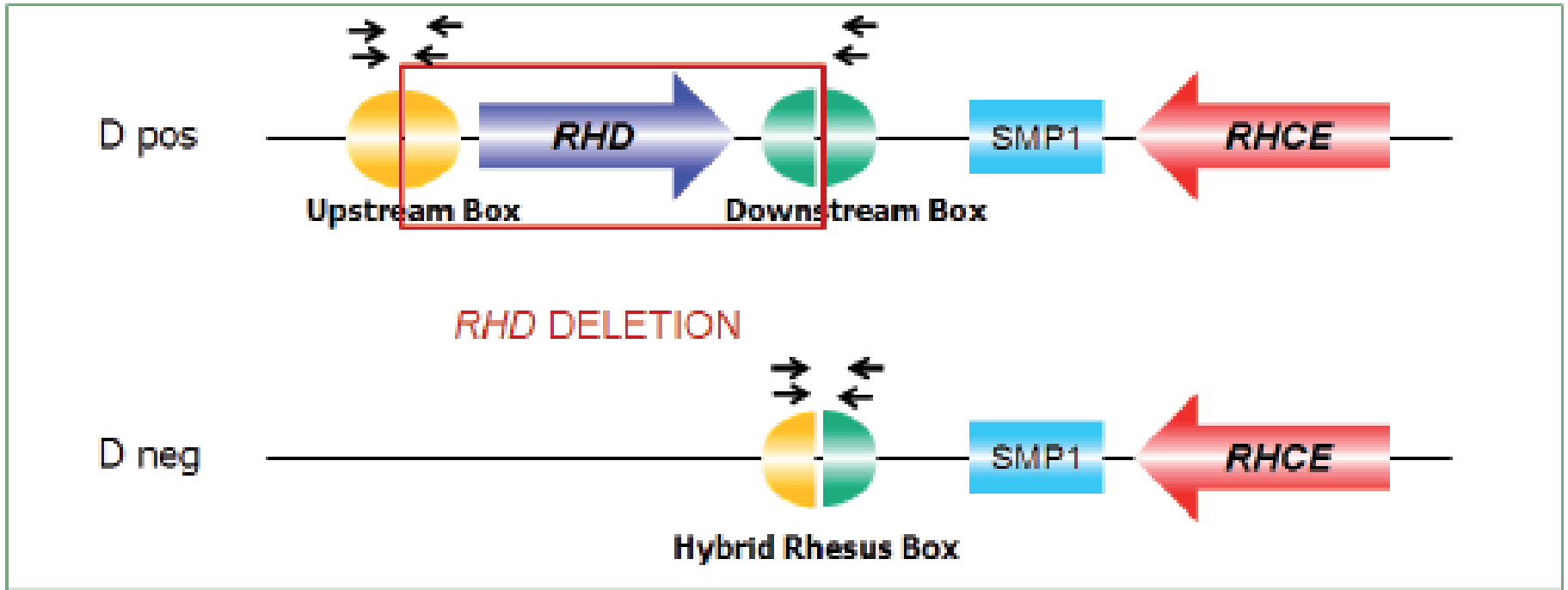
Rezultati:

TAQMAN – ViiA7

reakcija: RHD int4, ex7, ex10, ex5, SRY, albumin - ZTM, KF
sonde imajo TAMRO (KF) in NFQ (ZTM)

datum: 29.09.2016 izvajalec: Violeta, Persida, Tadeja

	RHD int 4 (FAM-NFQ) 800-p 300-s	RHD int 4 (FAM-NFQ) 800-p 300-s	RHD int 4 (FAM-NFQ) 800-p 300-s	RHD ex5 (FAM) 200-p 50-s	RHD ex5 (FAM) 200-p 50-s	RHD ex5 (FAM) 200-p 50-s	RHD ex7 ABI (FAM-NFQ)	RHD ex7 ABI (FAM-NFQ)	RHD ex7 ABI (FAM-NFQ)	RHD ex10 ABI (FAM-NFQ)	RHD ex10 ABI (FAM-NFQ)	RHD ex10 ABI (FAM-NFQ)	
	PK Stand. S5 (Promega, moški RhD poz).- 1.0e+01	NK 845608, RhD-neg 1:10000	H2O	PK Stand. S5 (Promega, moški RhD poz).- 1.0e+01	NK 845608, RhD-neg 1:10000	H2O	PK Stand. S5 (Promega, moški RhD poz).- 1.0e+01	NK 845608, RhD-neg 1:10000	H2O	PK Stand. S5 (Promega, moški RhD poz).- 1.0e+01	NK 845608, RhD-neg 1:10000	H2O	A 1-12
	PK Stand. S5 (Promega, moški RhD poz)	NK 845608, RhD-neg 1:10000	H2O	PK Stand. S5 (Promega, moški RhD poz)	NK 845608, RhD-neg 1:10000	H2O	PK Stand. S5 (Promega, moški RhD poz)	NK 845608, RhD-neg 1:10000	H2O	PK Stand. S5 (Promega, moški RhD poz)	NK 845608, RhD-neg 1:10000	H2O	B 13-24
DE, roj. xx.xx.19xx, vz. 26.07.2016, g 28 t, plazma sh.27.07.2016, izol. 28.09.2016, EZ1 Virus 2.0	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	C 25-36
AL, roj.xx.xx.19xx, F, vz.14.09.2016, anti-D, g 19 t, plazma sh. 14.09.2016, izol. 28.09.2016, EZ1 Virus 2.0	poz	poz	poz	poz	poz	poz	poz	poz	poz	poz	poz	poz	D 37-48
													E 49-60
SRY (FAM-NFQ) 600-p 200-s	PK Stand. S5 (Promega, moški RhD poz)	PK Stand. S5 (Promega, moški RhD poz)	NK Stand. S5 (Promega, ženska) 1.0e+01	NK Stand. S5 (Promega, ženska) 1.0e+01	H2O	H2O	DE poz	DE poz	DE poz	AL neg	AL neg	AL neg	F 61-72
Albumin (FAM-NFQ) 400-p 150-s	NK Stand. S5 (Promega, ženska) 1.0e+01	NK Stand. S5 (Promega, ženska) 1.0e+01	NK 845608, RhD-neg 1:10000	NK 845608, RhD-neg 1:10000	DE poz	DE poz	AL poz	AL poz					G 73-84
Albumin (FAM-NFQ) 400-p 150-s	Stand. S2 (Promega, moški RhD poz).- 1.0e+04	Stand. S2 (Promega, moški RhD poz).- 1.0e+04	Stand. S3 (Promega, moški RhD poz).- 1.0e+03	Stand. S3 (Promega, moški RhD poz).- 1.0e+03	Stand. S4 (Promega, moški RhD poz).- 1.0e+02	Stand. S4 (Promega, moški RhD poz).- 1.0e+02	Stand. S5 (Promega, moški RhD poz).- 1.0e+01	Stand. S5 (Promega, moški RhD poz).- 1.0e+01	H2O	H2O			H 85-96
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	



DD - хомозигот

dd - хомозигот

Dd - хетерозигот

Заклучок/научени лекции

Во тек на едукацијата во Заводот за Трансфузиона медицина во Љубљана во лабораторијата за молекуларна биологија бевме запознати теоретски и практично со неколку нови методи:

- автоматска екстракција на cff DNA со Biorobot EZ1 Qiagen
- Q PCR при неинвазивна пренатална детекција на RHD на фетус преку плазма од мајка.
- RHD генотипизацијата на фетус би овозможила таргетирана имунопрофилакса само на трудници кои носат RHD + плод
- Истовремено изведувавме и PCR - SSP техники за генотипизација на MNS крвногрупниот систем, Kell, Kidd, Duffy, како и т.н. тест Zygo fast RHD за одредување на зиготност на RHD генот како хомозигот DD и dd или хетерозигот Dd .