Troubleshooting Guide for Analyzing and Interpretation of Results of:

KBC- AneuQuick™ (VII) QF PCR Kit

(For rapid detection of common chromosomal Anueploidies)

راهنمای تفسیر نتایج و حل مشکلات احتمالی برای:

کیت QF-PCR تشخیص اختلالات عددی کروموزومی (آنیوپلوییدی) شایع تولیدی شرکت زیست فناوری کوثر موسوم به AneuQuick™

جهت استفاده در تشخیص سریع اختلالات عددی شایع کروموزومی (آنیوپلوییدی) قبل از تولد

آدرس: خیابان ولیعصر ،بالاتر از فاطمی ،خیابان مجلسی ،مرکز ژنومیکس و بیوتکنولوژی کوثر، پلاک 41
تلفن:5-02188939150-02188930143

Website: www.kawsar.ir
Email: kawsar_biotech@yahoo.com

Kawsar Biotech Company ©- 2014, http://www.kawsar.ir

فهرست:

1) **تشخیص پیش از تولد در نمونه جنینی آلوده شده با نمونه مادر 3**

2) **Chromosome mosaicism (موزاییسم کروموزومی) 4**

3) **PCR artifacts during STR amplification: 5**

a) Stutter Bands: 5

b) Preferential Amplification (تکثیر رقابتی): 6

c) Final Extension ناقص: 7

4) **الل نادر و جهش در مارکرهای کیت KBC AneuQuick: 8**

a) Duplications of STR markers (داپلیکیشن مارکرهای STR) 8

b) جهش در محل اتصال پرایمرهای مارکر STR: 9

5) **Electrophoretic/Detection Artifacts 10**

a) Crosstalk peak (پیک‌های تداخلی): 10

b) Electrophoretic spike 10

6) **اطلاعات تماس: 11**

7) **منابع: 11**

Kawsar Biotech Company ©- 2014, http://www.kawsar.ir

تشخیص پیش از تولد در نمونه جنینی آلوده شده با نمونه مادر

از آنجایی که ممکن است نمونه‌های پیش از تولد (مایع آمنیوتیک یا پرزهای جفتی) با سلول‌های مادری آلوده شوند، بنابراین بررسی این مورد از اهمیت زیادی برخوردار است.

به عنوان مثال : در نمونه مایع آمنیوتیکِ به شدت خون آلود، احتمال این‌که نمونه مورد بررسی ترکیبی از سلول‌های مادری و جنینی باشد زیاد است. در این موارد ممکن است که حضور DNA مادر مانع تفسیر صحیح نمونه‌های QF-PCR شود.

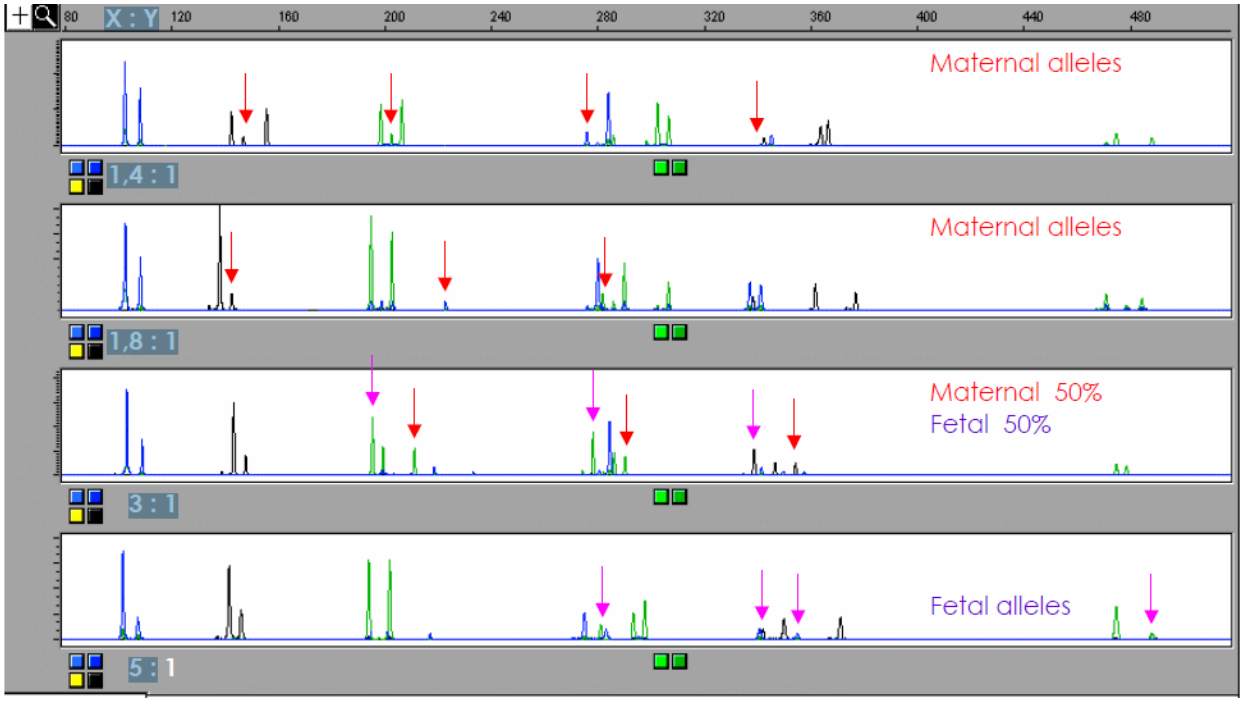
اگرچه امکان تشخیص صحیح و دقیق بر روی برخی از این نمونه‌ها امکان‌پذیر است، اما در صورت وجود آلودگی با نمونه مادری، پیک آلل اضافه برای مارکرهای STR بر روی کروموزوم‌ها در نتایج مشاهده می‌شود که با نمونه نرمال، موارد تریزومی، تریپلوییدی یا موزاییسم سازگاری ندارد .

مثال زیر (از بالا به پایین) افزایش سطح آلودگی سلول مادری در چهار نمونه مایع آمنیوتیک مختلف، در جنین XY نرمال نشان می‌دهد.

در نمونه‌های جنینی مذکر با بررسی نسبت بین محصول X و Y در محل AMXY می‌توان مشخص نمود که نمونه غالب مربوط به جنین است یا مادر و در نمونه‌های جنینی مونث نتیجه باید با پروفایل مادر مقایسه شود.

در مورد اول، تنها مقدار کمی آلودگی به نمونه مادر وجود دارد که به عنوان یک نسبت AMXY مورب و برخی آلل‌های STR بسیار کوچک مشخص هستند. در این مورد انجام تشخیص آنیوپلوییدی برای جنین ممکن است زیرا نسبت STRها به میزان قابل توجهی با حضور DNA مادر تغییر نکرده است.

اما در نمونه پایینی که نمونه مادری غالب می‌باشد، تشخیص آنیوپلوییدی جنین ممکن نیست.



Chromosome mosaicism (موزاییسم کروموزومی)

اگر چه کیت KBC Aneuquick QF-PCR برای تشخیص موزاییسم طراحی نشده است، اما در مواردی الگوهای غیر معمول کروموزوم‌های جنسی می‌تواند نشان دهنده الگوی موزاییسم باشد. تفسیر این الگوها معمولا بسیار دشوار بوده و به تفسیر و خطایابی نیاز دارد.

توجه: نتایج موارد مشکوک به موزاییسم باید با نتایج سیتوژنتیک تایید شوند (زیرا پروفایل‌های STR مشابه می‌توانند با بیماری‌های کروموزومی مختلف سازگاری داشته باشند).

لازم به ذکر است که در موارد موزاییسم، مقایسه بین نتایج QF-PCR و کاریوتایپ به دست آمده از نمونه‌های تازه کشت شده و درصد سلول‌های مختلف پس از کشت سلولی و تجزیه و تحلیل متافاز و یا تکنیک FISH، از ارزش تشخیصی بزرگی برخوردار است و می‌تواند در تعیین دقیق‌تر قوانین کلی کروموزوم‌ها به ما کمک کند.

توصیه می‌شود که آزمایش در دو قسمت جداگانه و توسط دو فرد مختلف به صورت همزمان انجام شود، این کار سبب کاهش خطر تفسیرهای نادرست می‌شود. به‌خصوص در مواردی که confined placental mosaicism (CPM) وجود دارد (یعنی در ساختار کروموزومی جفت و جنین تفاوت وجود دارد، مثلا نمونه خون جنینی و یا مایع امنیوتیک فاقد تریزومی ولی جفت واجد تریزومی باشد) لازم است که نمونه CVS (پرزهای جفتی) با دقت زیاد و توسط کارشناس آموزش دیده از نمونه‌های مادری تفکیک شود. البته CPM را به راحتی نمی‌توان مشخص کرد؛ مگر اینکه بررسی از نمونه جفت و مایع امنیوتیک برای تشخص و یا تایید نتیجه استفاده شود. (لازم به ذکر است که CPM در 1-2٪ بارداریها دیده می شود و در 10٪ موارد جنین نیز واجد موزایسم می باشد. در چنین شرایطی ممکن است جفت تریزومیک کامل باشد ولی جنین سالم و یا موزائیک باشد).

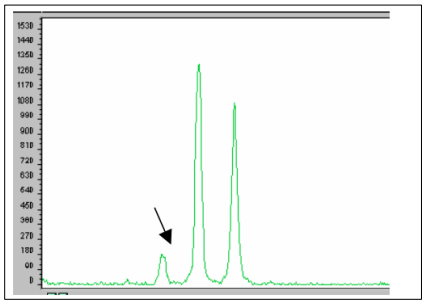
:PCR artifacts during STR amplification

شامل موارد زیر است :

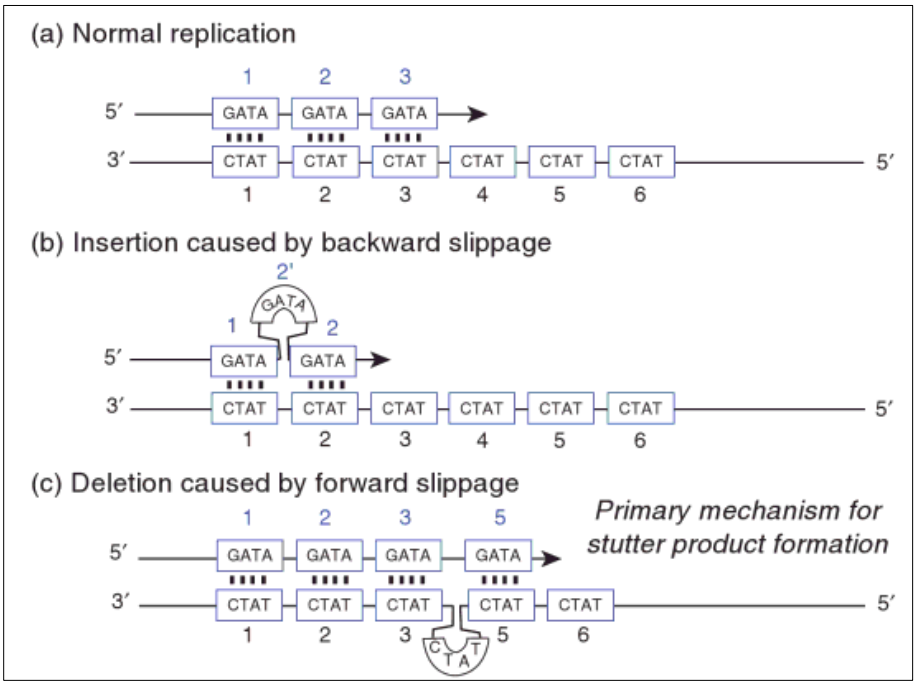
- Stutter Bands
- Preferential Amplification (تکثیر رقابتی)
- Final Extension ناقص

:Stutter Bands

در واکنش PCR، به علت Slippage آنزیم DNA پلی‌مراز (در قطعاتی که شامل توالی‌های تکراری می‌باشند) محصولات اضافی می‌توانند تولید شوند که دقیقا یک تکرار کوچکتر از آلل STR اصلی می‌باشند، این محصولات را stutter bands یا Shadow bands می‌نامند. نسبت باند stutter برای هر مارکر STR چهار تایی معمولا از 15 درصد مساحت آلل اصلی مربوطه بیشتر نمی‌شود (شکل زیر). این باندها معمولا در قطعاتی که دارای تکرارهای 4تایی و 5تایی می‌باشند، کمتر مشاهده می‌شوند.

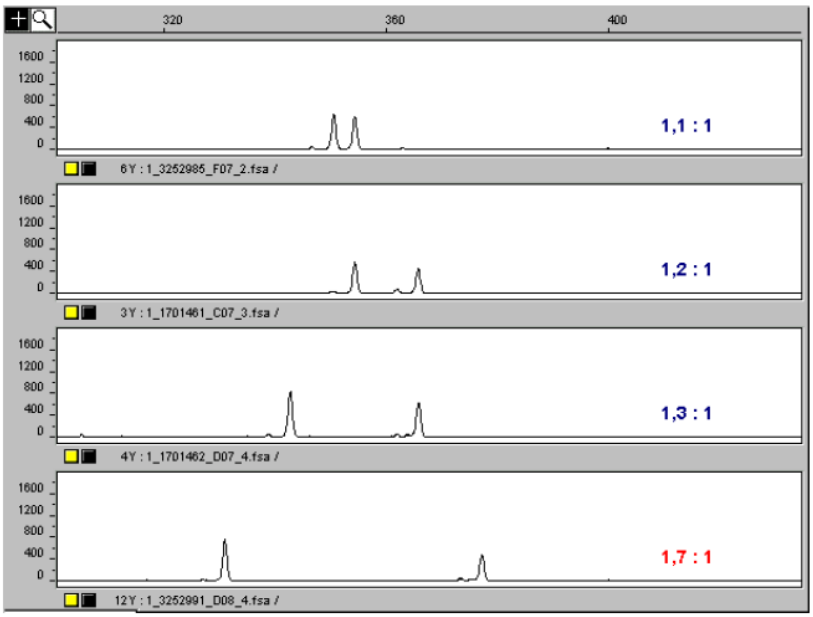


اگر قطعات تکرار شونده دوتایی باشند، ممکن است چندین باند stutter نیز مشاهده شود. در طراحی کیت KBC Aneuquick از تکرارهای دوتایی استفاده نشده است، چون وجود چندین stutter bands می‌تواند مانع تشخیص دقیق آلل‌های مورد نظر شود و حتی در برخی موارد ممکن است تشخیص آلل اصلی امکان پذیر نباشد.



Preferential Amplification (تکثیر رقابتی):

مارکرهای STR موجود در کیت KBC AneuQuick بسیار چندشکل (پلی‌مورف) هستند، بنابراین درمحدوده سایزهای متفاوتی دیده می‌شوند. در مواردی که تفاوت سایز دو آلل بیشتر از 20 جفت باز باشد، ممکن است قطعه کوتاه‌تر در واکنش PCR بیشتر تکثیر شود. این مورد ممکن است به خصوص برای مارکرهای D21S1411، D13S258 و D21S1414 که فراوانی آللی زیادی دارند رخ دهد. اگر چه بهینه سازی بافر کیت KBC AneuQuick و کاهش تعداد سیکل‌های PCR این مورد را برای نمونه diallelic نرمال و تریزومی محدود کرده است. علاوه بر این، تکثیر رقابتی ممکن است در مواردی که از DNA الگو بیش از حد لازم (در واکنش PCR) استفاده شده نیز مشاهده شود و ممکن است با کاهش تعداد سیکل‌های PCR این مورد نیز حل شود. لذا توصیه می شود استفاده کننده با نمونه های مشخص مانند فرد سالم و یا مبتلا این نوع مسائل را تمرین کند تا در تفسیر نتایج دچار خطای تفسیر نشود. البته این مسئله در مورد همه کیتهای QF PCR مطرح هست.

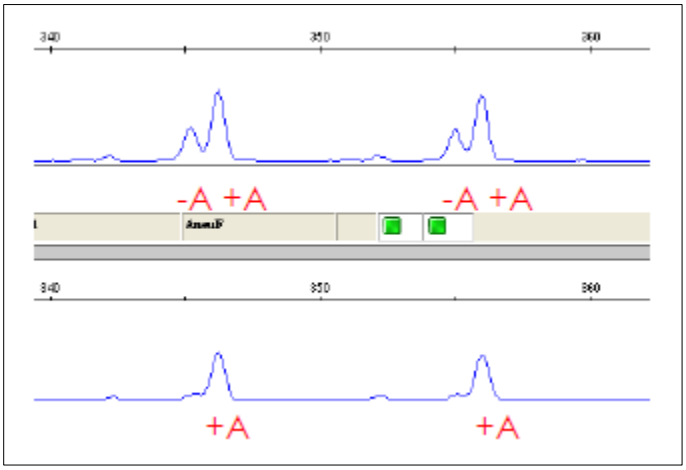


Final Extension ناقص:

یک پدیده شناخته شده در واکنش PCR، اضافه شدن نوکلئوتید A توسط آنزیم Taq پلی‌مراز در انتهای 3’ محصولات PCR است و جلوگیری نمودن از اضافه شدن A انتهایی امکان پذیر نمی‌باشد. بنابراین بهترین نتیجه را می‌توان با ایجاد شرایطی به دست آورد که A در انتهای همه محصولات اضافه شود (می‌توان با افزایش زمان final extension تا حد زیادی به این نتیجه دست یافت).

در مواردی نیز به علت استفاده بیش از اندازه از DNA الگوی در واکنش PCR، اضافه شدن A انتهایی در تمامی رشته ها صورت نمی‌گیرد و باعث می‌شود تا قله پیک به دو قسمت تقسیم شده و دو محصول مشابه که یکی از آنها دقیقا یک جفت باز از محصول اصلی کوچکتر است نیز در نتایج مشاهده شود. حتی با وجود نقص در اضافه شده A انتهایی می‌توان نتیایج دقیقی به دست آورد، البته لازم است که مجموع مساحت هر دو پیک آلل مورد نظر محاسبه شوند. اگر چه در شرایط مناسب این مورد در کیت KBC AneuQuick مشاهده نمی‌شود.

چنین موردی در افزایش تعداد سیکل‌های PCR نیز مشاهده می‌شود.



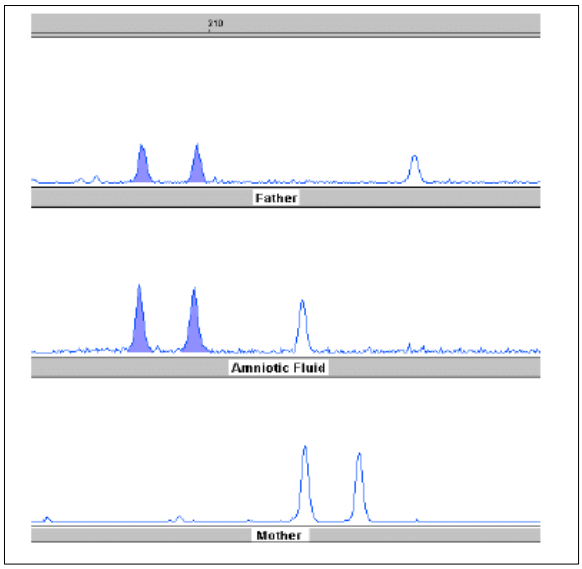
الل نادر و جهش در مارکرهای کیت KBC AneuQuick:

Duplications of STR markers (داپلیکیشن مارکرهای STR)

گاهی یکی از مارکرهای STR ممکن است الگوهای تریزومی Triallelic یا Diallelic را در افراد سالم نشان دهند. این مورد نادر است ولی ممکن است به دلیل داپلییکیشن مناطق پلی‌مورف در توالی STRها اتفاق بیافتد. این مورد معمولا به صورت الگوی تریزومی برای یک مارکر و الگوی طبیعی برای سایرمارکرهای گویای همان کروموزوم دیده می‌شود. لذا می بایست دقت شود که partial trisomy در یک لوکوس نشانه تریزومی در فرد نمی باشد و معمولا در بررسی انوپلوئیدی در جنین ما به دنبال تریزومی ناقص نمی گردیم و اگر چنین اتفاقی بیافتد انتظار داریم فرد از محل تریزومی در کروموزوم تا انتهای آن بازوی کروموزوم تریزومی یا مونوزومی باشد و فقط در یک محل ممکن است اهمیت کلینیکی نداشته باشد.

توصیه می‌شود که در این موارد نمونه DNA والدین نیز بررسی شوند تا مشخص شود که آیا این پلی‌مورفیسم از والدین به ارث رسیده یا جهش جدید (de novo) می‌باشد. جهش جدید گاهی به علت partial chromosome imbalance اتفاق می‌افتد، اگر جهش جدید بود، لازم است تا مطالعات سیتوژنتیکی بر روی آن انجام شود و بسیار مهم است که ثابت شود پلی‌مورفیسم مشاهده شده اهمیت بالینی ندارد، زیرا گاهی داپلیکیشنها با اختلال یادگیری یا فیزیکی همراه هستند.

مثال: نمونه ای که به صورت تریزومی سه آللی در نمونه آمنیون مشاهده می‌شود، که علت آن به ارث رسیدن دو آلل مشابه از آلل‌های والدی می‌باشد (آلل‌های والدی با رنگ بنفش مشخص شده‌اند). اگر این اتفاق فقط در یک جایگاه یا محل اتفاق افتاده باشد به احتمال زیاد اهمیت بالینی ندارد و به موارد گفته شده در بالا توجه شود.



جهش در محل اتصال پرایمرهای مارکر STR:

جهش در محل اتصال پرایمرهای کیت KBC AneuQuick به ندرت مشاهده شده است و این توضیحات فقط برای تکمیل خطایابی آنالیز روش QF-PCR ارائه می‌شود.

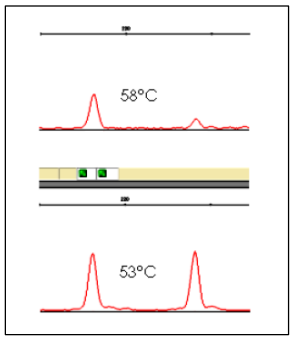
وجود جهش در محل اتصال پرایمر باعث می‌شود تا دمای annealing تغییر کند. بسته به محلی که جهش در آن اتفاق افتاده باشد (معمولا به دلیل وجود SNP و یا در موارد نادرتری وقوع جهش تازه)، می‌تواند سبب ایجاد خطا در تشخیص آلل‌ها شود، هر چه جهش به انتهای 3′ پرایمر (هم پرایمر forward و هم پرایمر reverse) نزدیک‌تر باشد امکان ایجاد خطا بالاتر می‌رود (باعث ایجاد حالتی باعنوان allele dropout می شود). تشخیص چنین جهش‌هایی در مارکرهای STRها امکان پذیر نیست و فرد برای آن محل به طور غلط هوموزیگوت تشخیص داده می‌شود. البته در صورت اهمیت با انجام آزمایش برروی والدین این نوع احتمال قابل پیگیری می باشد.

در صورتی‌که آزمایشگاهی برای بررسی تک جایگاه پرایمرهای یک یا چند محل را مجزا نیاز داشته باشد، **شرکت زیست فناوری کوثر** آنها را به صورت جداگانه نیز آماده تحویل دارد.

در ضمن یاداوری می شود که عملکرد این مارکر ها در بیش از 200 نمونه بررسی شده و بررسی ادامه دارد تا هرگونه خطای عملکردی احتمالی برای هر محل شناسایی و رفع گردد. در موارد تریزومی، حذف یک آلل می‌تواند سبب شود که فرد به صورت کاذب هتروزیگوت نرمال تشخیص داده شود. به همین دلیل است که توصیه می‌شود که هرگز تشخیص نباید بر اساس تنها یک مارکرِ نرمال باشد و باید همه محل‌ها با دقت بررسی شوند. البته احتمال اینکه همه مارکرها به صورت هوموزیگوت بوده و تنها یک مارکر هتروزیگوت مشاهده شود تقریبا صفر است.

چنانچه جهشی در محل اتصال پرایمر باشد بسته به محل جهش می‌تواند سبب تغییر در درمای annealing یا extension شود. در این صورت با تغییر دما می‌توان نتایج متفاوتی را مشاهده نمود. ما درخواست می کنیم هر گونه یافته غیر عادی برای هر مارکری را با کارشناسان این شرکت به صورت کتبی، تماس تلفنی و یا ای میل در میان بگذارید.

مثال: به علت وجود جهش در محل اتصال پرایمر، کاهش دمای annealing سبب شده که تکثیر دو آلل به اندازه مساوی صورت بگیرد و هر دو آلل مشخص شوند. هنگامی که دمای annealing، 5 درجه سانتی گراد بالاتر بوده سبب شده که یکی از آلل‌های بیشتر تکثیر شود.

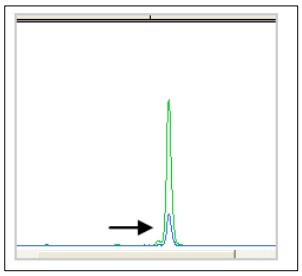


Electrophoretic/Detection Artifacts

Crosstalk peak (پیک‌های تداخلی):

گاهی در هنگام تشخیص در Dye-Channelها تداخل دیده می‌شود. پیک‌های تداخلی باید در هنگام آنالیز حذف شوند.

به عنوان مثال در شکل زیر رنگ سبز باعث تداخل در رنگ آبی شده که با فلش نشان داده شده است.

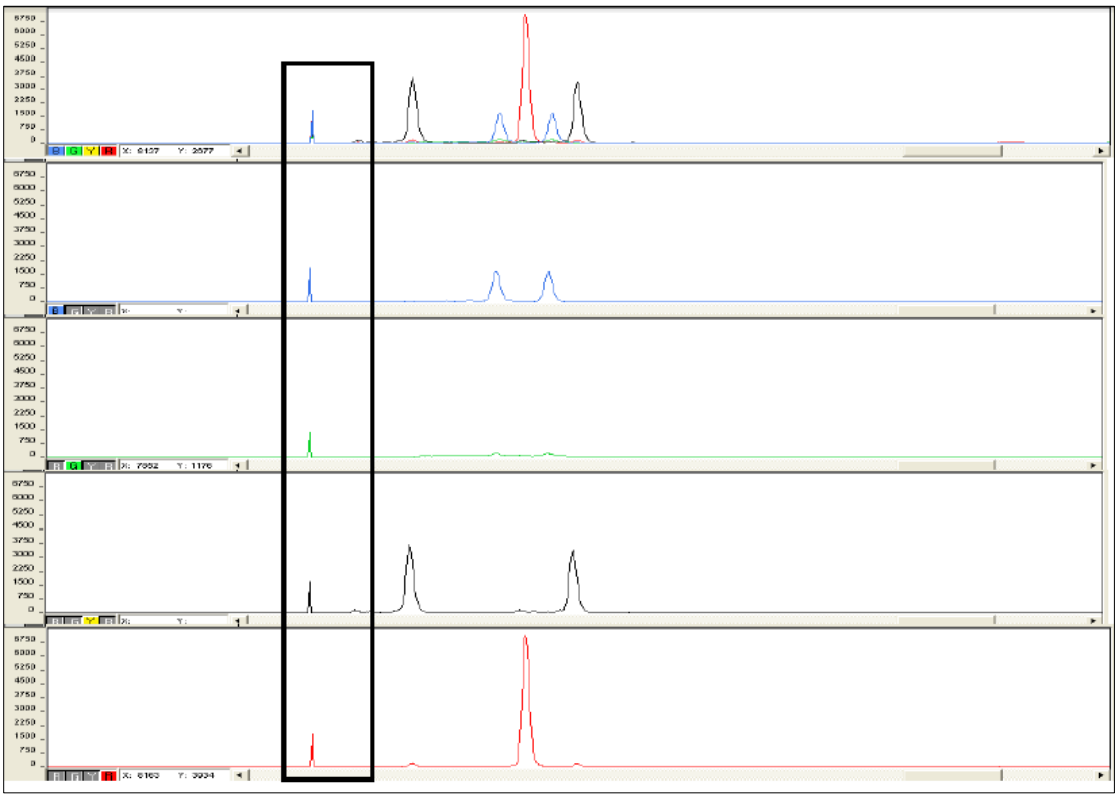


Electrophoretic spike

Electrophoretic spikeها نیز ممکن است به صورت پیک‌های نوک تیز (sharp) در چندین Dye-channel مشاهده شوند.

پیک‌های مربوط به Electrophoretic spike نیز باید در هنگام آنالیز حذف شوند.

در این شکل Electrophoretic spikeها با مستطیل از بقیه پیک‌ها جدا شده‌اند.



در پایان از کلیه همکاران و کاربران این کیت درخواست می شود نظرات و انتقادات خود را به اطلاع این شرکت برسانند. ما اعتقاد داریم که کیت AneuQuick با توجه به داشتن مارکرهای بیشتر از کیتهای خارجی، عدم نیاز به کیت اختصاصی اضافی، امکان بررسی نتایج PCR قبل از الکتروفورز برای مواردیکه آزمایشگاه در یک پروژه تحقیقاتی قصد بهینه کردن تکثیر را در شرایط خاص دارد (مانند Amniotic Fluid Cell Free DNA) و نیز امکان بررسی هر جایگاه به طور تک (در صورت درخواست مشتری و ارائه پرایمرهای یک یا چند جایگاه به صورت تک)، نیز پراکندگی مناسب پرایمرها در طول کروموزوم و نیز قرار دادن جایگاه های بیشتر از کروموزوم 21 در منطقه حساس این کروموزوم یک کیت با عملکرد بسیار بالا می باشد و تلاش داریم تا در آینده به قابلیتهای این کیت و کیتهای مشابه بیفزاییم.

اطلاعات تماس:

آدرس: خیابان ولیعصر ،بالاتر از فاطمی ،خیابان مجلسی ،مرکز ژنومیکس و بیوتکنولوژی کوثر، پلاک 41
تلفن:5-02188939150-02188930143

Website: www.kawsar.ir
Email: kawsar_biotech@yahoo.com

منابع:

1. “PROFESSIONAL GUIDELINES FOR CLINICAL CYTOGENETICS AND CLINICAL MOLECULAR GENETICS QF-PCR FOR THE DIAGNOSIS OF ANEUPLOIDY,” no. 200, pp. 1–16, 2012.
2. “AneufastTM Analysis Troubleshooting Guide 1.1.1”.
3. “Devyser Extend,” no. 8, pp. 1–24, 2012.
4. User and M. R. Aug, Multiplex QF-PCR Kit For Rapid Detection of Sex Chromosomes Aneuploidies User’s Manual. 2011, pp. 1–38.
5. J. M. Butler, Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers (Google eBook). Academic Press, 2005, p. 688.