

CERPO

Centro de Referencia Perinatal Oriente
Facultad de Medicina, Universidad de Chile



Test Genéticos Moleculares

Dr. Guillermo Parrao Barrera

Residente Medicina Materno Fetal

Pontificia Universidad Católica de Chile

Test Genéticos Disponibles



- Analisis de gen único: secuenciación.
- Genotipificación: alelos.
- Panel genético: Grupo de genes implicados en una enfermedad
- Secuenciación genómica: exoma
- Array CGH, FISH / MLPA, Cariograma

PCR



- PCR: Polymerase Chain Reaction
- Descrito por Mullis en 1985 → proceso automatizado desde 1988 (Taq DNA Polimerasa)
- Requerimientos: DNA polimerasa, magnesio, nucleótidos, primers, el DNA molde que se desea amplificar y un termociclador.

PCR: Etapas

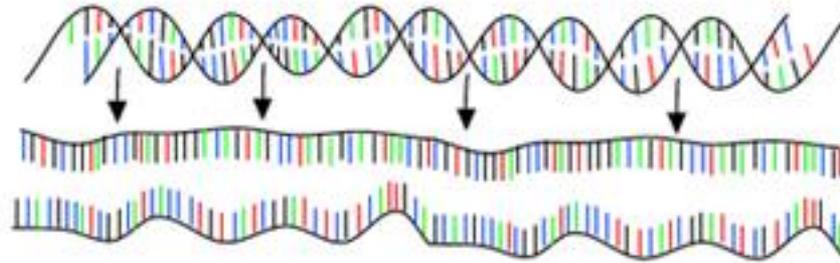


- 1) El DNA doble hebra es desnaturalizado (separado en cadenas sencillas) por calor
- 2) Los Primers (cebadores) se unen a las secuencias compatibles en el DNA de cadena sencilla
- 3) Los primers son extendidos por la DNA polimerasa (en dirección $5' \rightarrow 3'$), dando como resultado dos copias de la molécula original de DNA doble cadena



PCR: Etapas

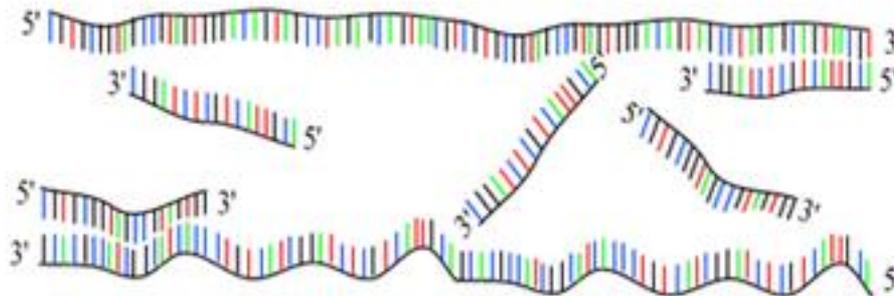
94°C



Etapa 1:

Separación del DNA
doble cadena por
calor

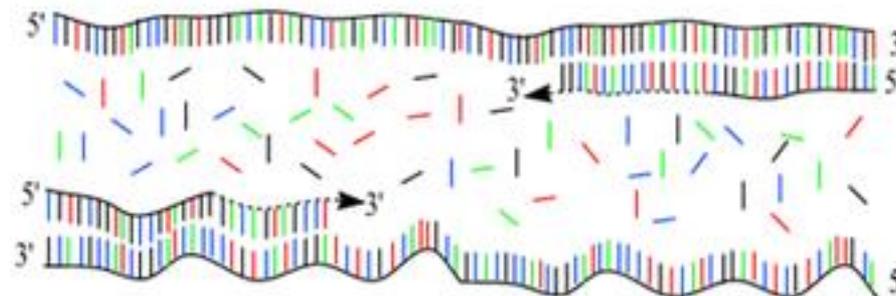
35-60°C



Etapa 2:

Unión de los primers
al DNA cadena
sencilla

72°C

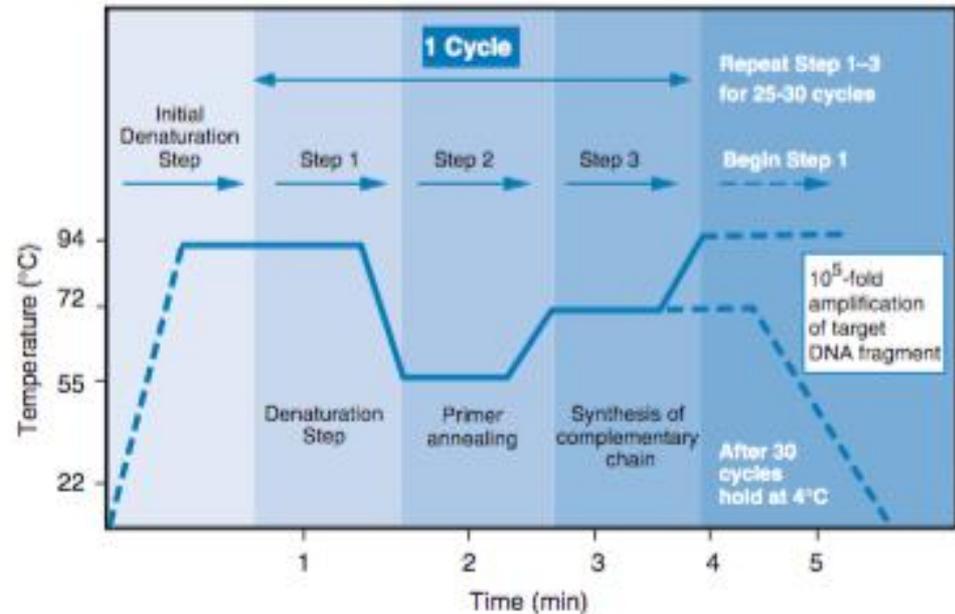


Etapa 3

La DNA polimesara
incorpora los
nucleotidos libres y
extiende los primers
en dirección 5' - 3'



Profile of Routine PCR Reaction



Step 1: Denaturation. Double-stranded DNA fragment is denatured in a reaction mixture containing primers, dNTP and polymerase.

Step 2: Annealing. Primers are annealed to denatured single-stranded DNA.

Step 3: Extension. Annealed primers are extended with DNA polymerase.

Cycling parameters must be empirically determined as optimum conditions for PCR vary depending on the DNA template and primers used.

PCR



- Este ciclo de amplificación se repite usualmente de 20 - 40 veces y el producto amplificado puede ser analizado
- Después de cada ciclo, la cantidad de DNA es dos veces la anterior (2^N)
- La PCR es muy utilizada para amplificar el DNA para su posterior uso en otros experimentos

PCR en tiempo real (Q-PCR)



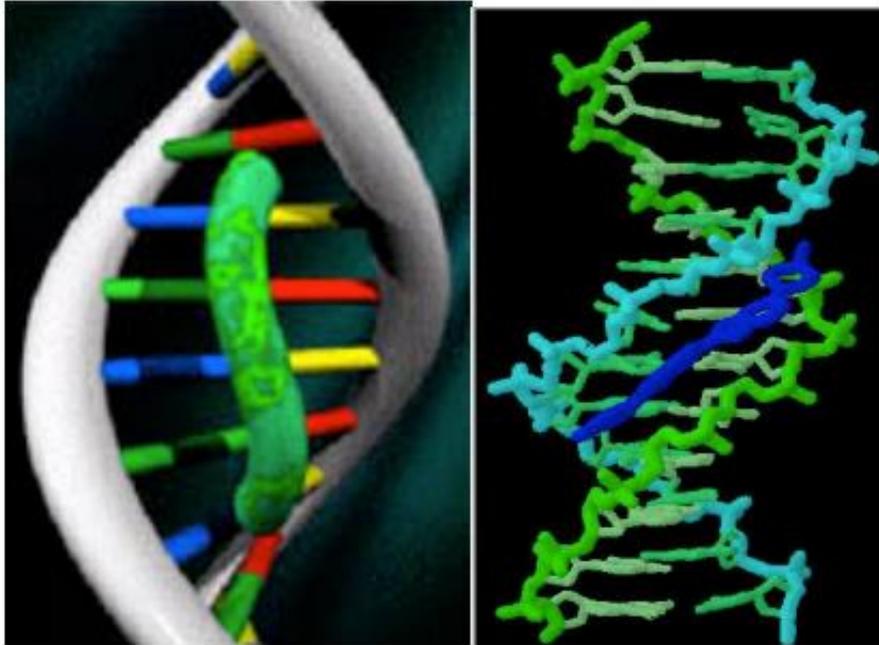
- Tiene la capacidad de monitorear el progreso de la reacción de PCR a medida que esta ocurre
- Esta técnica combina, los pasos de amplificación de DNA y la detección, en un único ensayo y evita tener que preparar geles de electroforesis para detectar los productos amplificados

PCR en tiempo real (Q-PCR)



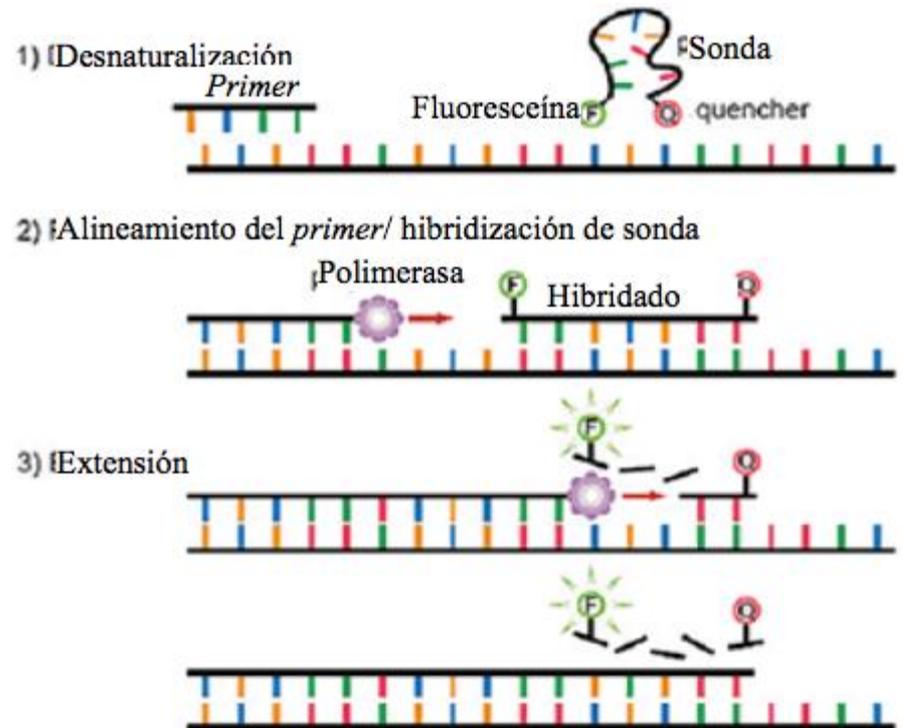
- La tecnología del Q-PCR está basada en la detección de una señal fluorescente producida proporcionalmente durante la amplificación del ADN blanco
- Se utilizan fluoróforos generales de unión no específica a DNA o primers marcados con fluoróforos

PCR en tiempo real (Q-PCR)



Fluoróforos NO
especificos

Primer Marcado



PCR: Ejemplo



PCR aneuploidia

- PCR COMERCIAL CUANTITATIVO FLUORECENTE QF-PCR
- Marcador de STR (Short tandem repeats)
- Cromosomas 13,18, 21 y XY
- Analisis en equipo de electroforesis
- Muestra: LA, Velloosidades coriales, tejido o sangre fetal o RN
- Rápido, no requiere cultivo
- No detecta niveles bajos de mosaicismo (<30%)

MLPA: Multiplex ligation dependent probe amplification



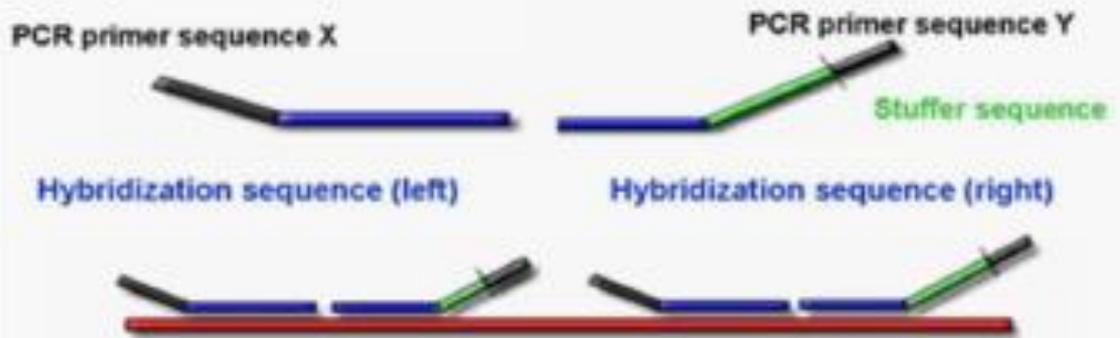
- Utilidad: Evaluación inserciones o deleciones
- Mezcla hibridación y amplificación
- Es rápido
- Requiere cantidad reducida de muestra
- Estudia regiones determinadas de DNA
- No sirve para mosaicos menores del 20 %

MLPA: Proceso



- Unión de sondas con la zona homóloga de interés
- Sólo las sondas que hibridan pueden ser ligadas y luego amplificadas por PCR
- Los productos amplificados generan fragmentos de longitud variable
- Electroforesis capilar
- Análisis en secuenciador
- El área de señal de los picos puede ser medido e inferir cantidad de secuencia presente
- Una disminución del área de señal indica delección y un aumento duplicación

1. Denaturation and Hybridization

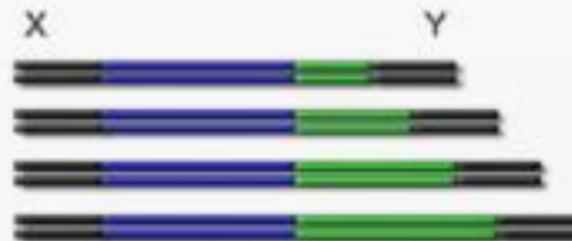


2. Ligation



3. PCR with universal primers X and Y

exponential amplification of ligated probes only

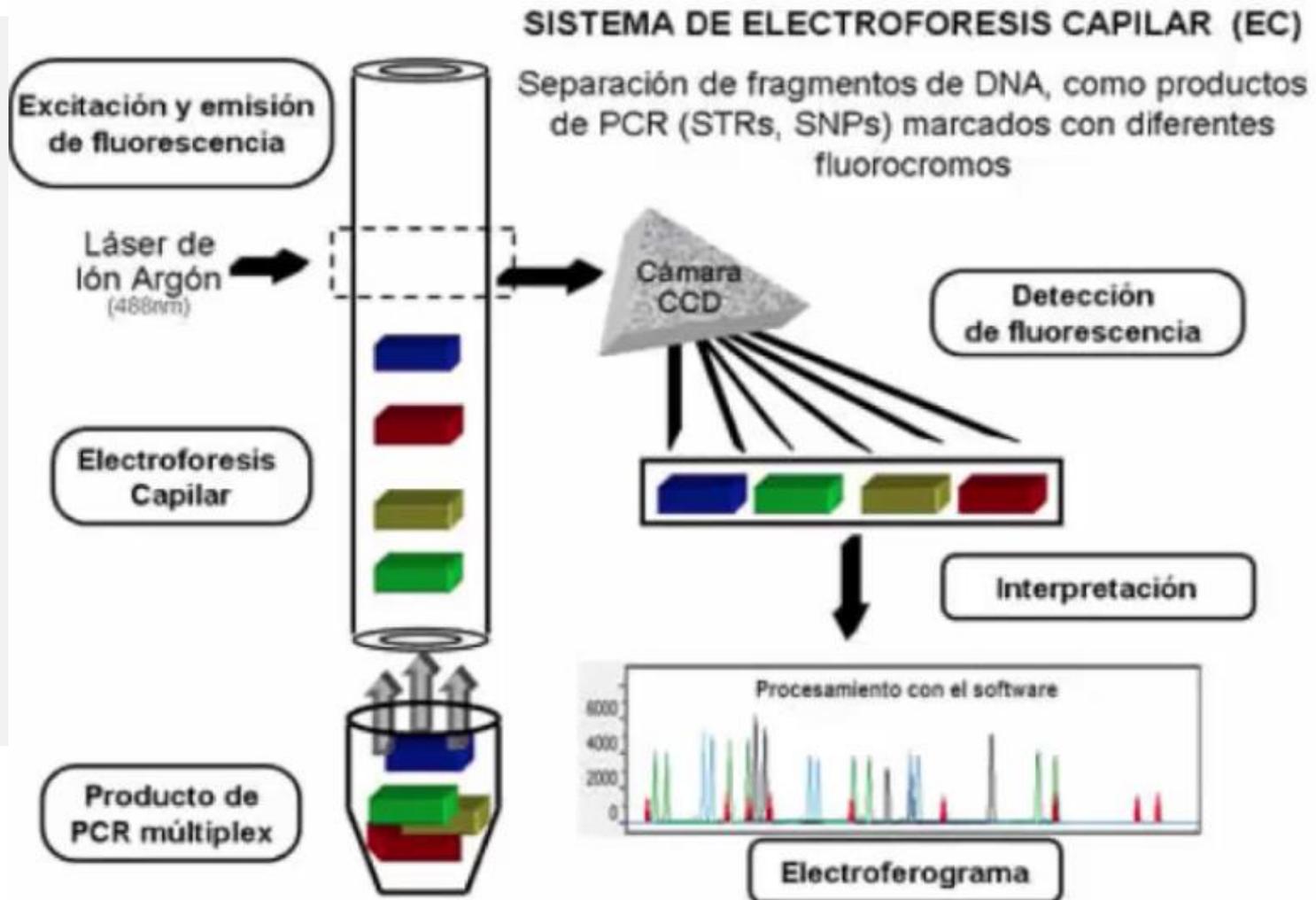


4. Fragment analysis





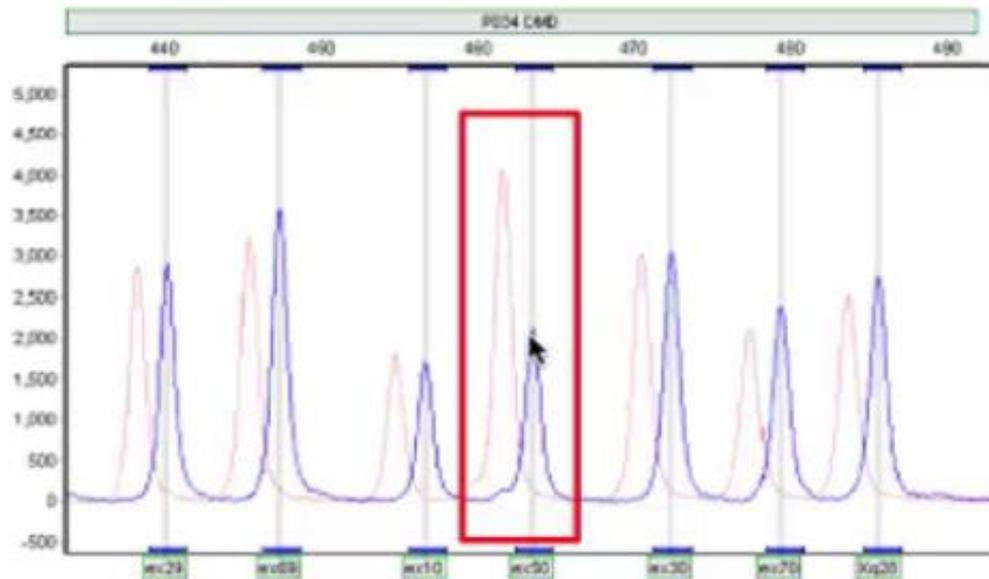
MLPA





MLPA: Análisis

MLPA Analysis Report		Analysis Type: MLPA
Software: Softgenetics GeneMarker 1.31		Compare Type: MLPA Ratio
Project: Untitled		Normalization By: Population Normalization
Technician:		Quantification By: Peak Height
Sample: P034_B11.Fxa		Classification: Loss < 0.75 == Equivalent == 1.25 * Gen
Panel: P034.DVD		Report Value Type: Peak Ratio



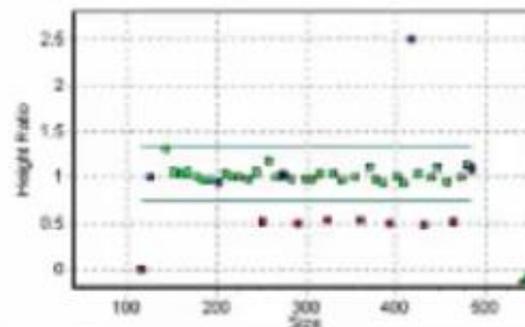
Probe Name	Bin Size	P034_B11	
1	CEB3osmctctc	114.6	0.000
2	ex16	456.8	0.940
3	ex2	160.2	1.063
4	ex21	152.7	1.057
5	ex22	185.0	0.981
6	ex23	225.0	1.000
7	ex24	250.0	1.178
8	ex25	290.3	0.990
9	ex26	329.6	1.046
10	ex27	369.7	1.101
11	ex28	401.5	0.999
12	ex29	440.2	1.034
13	ex3	209.2	1.034
14	ex36	472.5	1.007
15	ex4	243.9	1.059
16	ex41	143.0	1.305
17	ex42	177.5	1.004
18	ex43	218.9	1.009
19	ex44	251.8	0.924
20	ex45	290.0	0.908
21	ex46	322.1	0.932
22	ex47	360.3	0.940
23	ex48	393.2	0.996
24	ex49	431.3	0.986
25	ex5	282.5	0.900
26	ex56	483.6	0.917
27	ex6	314.4	1.042
28	ex61	160.8	1.036
29	ex62	192.8	0.967
30	ex63	226.6	0.991
31	ex64	267.0	1.004
32	ex65	305.8	0.985
33	ex66	339.2	0.975
34	ex67	376.9	0.996
35	ex68	406.1	0.946
36	ex69	447.4	1.101
37	ex7	353.8	1.006
38	ex76	479.6	1.129
39	ex8	385.3	0.945
40	ex9	423.8	1.036
41	ig22	202.3	0.990
42	xig11.2	126.1	1.007
43	xig20	416.7	0.990
44	xig29	274.7	1.027
45	xig29	485.9	1.091

Sample Name: 030427_1M_F34

Machine: 3100

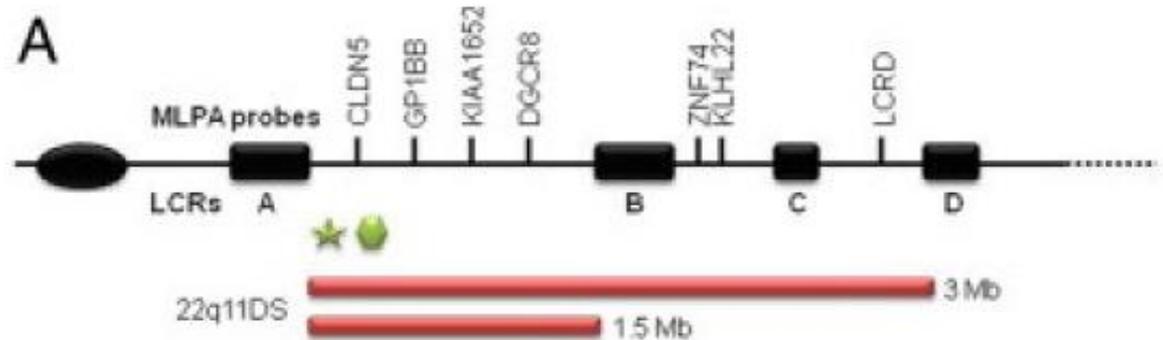
Run Time: 4/14/2005 - 13:27:40 -> 4/14/2005 - 14:17:43

Conclusion		
	Date	Initial
Authorization 1		
Authorization 2		





MLPA: Ejemplo



Delección 22q11

- Al no ocurrir hibridación, las sondas no quedan suficientemente juntas y por lo tanto las ligasas no las terminan de unir, finalmente como el partidor de la PCR esta destinado a reconocer el segmento que se forma cuando las dos sondas se hibridan y unen entre si, no existirá este target y por tanto no habrá producto de PCR → Delección

Secuenciación de Sanger

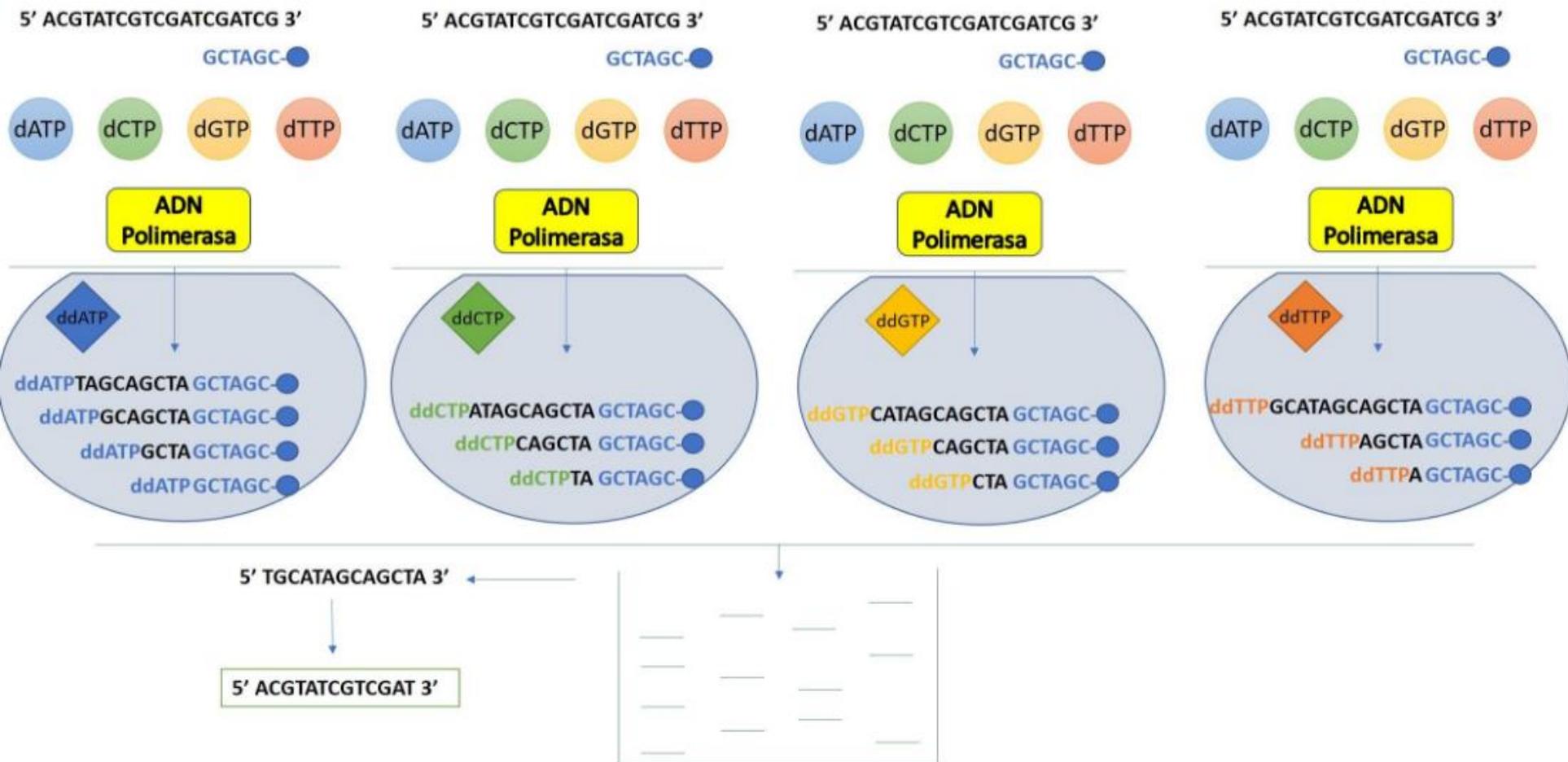


- Método de secuenciación por dideoxinucleótidos, se basa en el proceso biológico de la replicación del DNA
- Emplea dideoxinucleótidos que carecen del grupo hidroxilo del carbono 3' → Cuando se incorpora a una cadena de DNA esta no puede continuar elongándose

Secuenciación de Sanger



DNA polimerasa, un cebador marcado radiactivamente, los cuatro nucleótidos normales (dNTP) y uno de los cuatro dideoxynucleótidos (ddNTP)



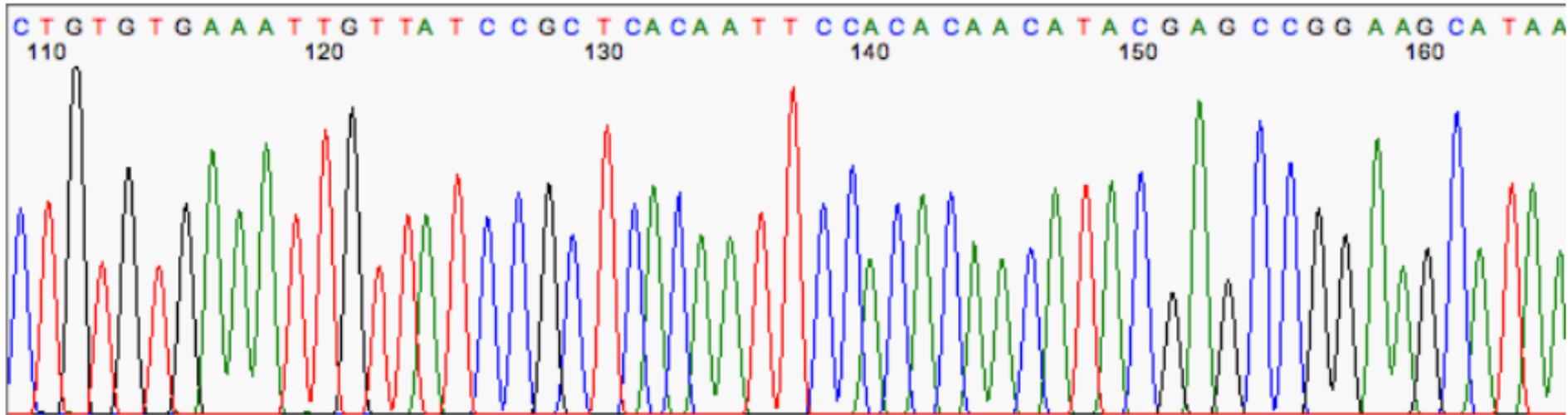
Secuenciación de Sanger



- Los productos de las 4 reacciones, se pueden cargar en un gel de agarosa y se someter a electroforesis
- Así obtendremos un patrón de bandas en orden, del cual es posible deducir la secuencia del DNA en estudio



Sanger automatizado: Resultado



Analisis de gen Único



- Mutación conocida: PCR del segmento del gen comprometido. Ej: Factor V Leyden
- Panel de variantes patogénicas: Ej: BRCA 1, CFTR
- Secuenciación completa del gen (regiones reguladoras, no codificantes) Ej: Hemofilia B

Panel Genético



- Secuenciación y/o PCR para mutaciones específicas
- Utilidad: Sospecha de etiología genética con más de 1 o 2 genes posiblemente comprometidos
- Existen cientos de paneles
- Ej: Miocardiopatías, Enf. Metabólicas, Alteraciones del Neurodesarrollo

Panel Genético: Uso prenatal



Next-Generation Sequencing Using a Cardiac Gene Panel in Prenatally Diagnosed Cardiac Anomalies



R.E. Lamont

Ryan E. Lamont, PhD;^{1,2} Yanwei Xi, PhD;¹ Claire Popko;³ Joanna Lazier, MD;⁴ Francois P. Bernier, MD;^{1,2} Julie L. Lauzon, MD, MHSc;¹ A. Micheil Innes, MD;^{1,2} Jillian S. Parboosingh, PhD;^{1,2} Mary Ann Thomas, MD^{1,2}

¹Department of Medical Genetics, Cumming School of Medicine, University of Calgary, Calgary, AB

²Alberta Children's Hospital Research Institute, Calgary, AB

³Bachelor of Health Sciences Program, University of Calgary, Calgary, AB

⁴Department of Medical Genetics, University of Alberta, Edmonton, AB

- ADN extraído de amniocitos

Panel Genético: Uso prenatal



ORIGINAL ARTICLE

WILEY PRENATAL DIAGNOSIS

Prenatal diagnosis of skeletal dysplasias using a targeted skeletal gene panel

Xinyao Zhou¹  | Natalie Chandler² | Linbei Deng¹ | Jia Zhou¹ | Meizhen Yuan¹ |
Luming Sun¹ 

- ADN extraído de sangre fetal o amniocitos

Panel Genético



CARDIOLOGÍA



CÁNCER HEREDITARIO



GENÉTICA PEDIÁTRICA



NEUROLOGÍA



Panel Genético



CARDIOLOGY



IMMUNOLOGY



DERMATOLOGY



METABOLIC DISORDERS AND NEWBORN SCREENING



EXOME



NEUROLOGY



HEMATOLOGY



OPHTHALMOLOGY



HEREDITARY CANCER



PEDIATRIC GENETICS



Panel Genético

CLINICAL AREA: NEUROLOGY

▶ MOVEMENT DISORDERS

▶ NEURODEGENERATIVE DISORDERS

▶ NEUROMUSCULAR DISORDERS

▶ NEUROPATHIES AND RELATED DISORDERS

▶ CARDIOMYOPATHY AND SKELETAL MUSCLE DISEASE

CLINICAL AREA: PEDIATRIC AND RARE DISEASE

▶ EPILEPSY SEIZURES AND DEVELOPMENTAL BRAIN ABNORMALITIES

- ▶ Invitae Epilepsy Panel up to 187 genes

- ▶ Invitae Alternating Hemiplegia of Childhood Panel up to 5 genes

- ▶ Invitae Baraitser-Winter Cerebrofrontofacial Syndrome Panel 2 genes

- ▶ Invitae Cerebral Cavernous Malformations Panel 3 genes

- ▶ Invitae CHARGE Syndrome Test 1 gene

- ▶ Invitae Early Infantile Epileptic Encephalopathy Panel up to 69 genes

- ▶ Invitae Holoprosencephaly Panel up to 10 genes

- ▶ Invitae Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation Panel up to 14 genes

- ▶ Invitae Rett and Angelman Syndromes and Related Disorders Panel up to 28 genes

- ▶ Invitae Tuberous Sclerosis Complex Panel 2 genes

▼ Invitae Holoprosencephaly Panel

up to 10 genes

Genetic testing for up to 10 genes that are associated with holoprosencephaly (HPE), a spectrum of brain malformations ranging from a single central upper incisor to complete failed separation of the cerebral hemispheres.

ORDER

GENES TESTED:

Primary Panel:

FGFR1

GLI2

SHH

SIX3

TGIF1

ZIC2

[Panel details and technical assay limitations](#)

Add-on Preliminary-evidence Genes for Holoprosencephaly:

CDON

FOXH1

NODAL

PTCH1

[Panel details and technical assay limitations](#)

Preliminary-evidence genes currently have early evidence of a clinical association with the specific disease covered by this test. Some clinicians may wish to include genes which do not currently have a definitive clinical association, but which may prove to be clinically significant in the future. These genes can be added at no additional charge. Visit our [Preliminary-evidence genes](#) page to learn more.

Panel Genético



- Muestras:
 - Sangre: entera, congelada o parcialmente congelada.
 - Saliva
 - ADNg
 - Post mortem

Panel Genético



- Sangre:
 - No acepta:
 - Muestras de sangre hemolizada o coagulada.
 - Muestras de pacientes que han sido sometidos a un trasplante de médula ósea.
 - Muestras de pacientes que tienen malignidades hematológicas activas.
 - Volumen: Requerimos un mínimo de 3 mililitros (ml) de sangre entera. La muestra debe enviarse en un tubo EDTA de tapa morada. Etiquetado.

Panel Genético: En Chile



genometrics

Laboratorios proveedores



Logística de muestras



- Retiro de muestras desde clínica o domicilio.
- Toma de muestras en Genometrics (sólo muestras de saliva a mayores de 3 años).
- Toma de muestras a domicilio (se envía a enfermera externa capacitada).
- Recopilación de información y llenado de formularios de solicitud a laboratorios.
- Envío de muestras a laboratorios en EE.UU. y Europa.
- Facturación institucional local y pago en pesos.
- Cotizaciones para estudios genéticos especiales con laboratorios extranjeros



REQUISITOS DE MUESTRA PARA ESTUDIO GENÉTICO

- 1) Tomar muestra sangre normal en tubo EDTA (tapa morada), mínimo 4 ml.
- 2) Etiquetar la muestra con sólo el primer nombre y primer apellido, fecha de nacimiento y fecha de toma de muestra **(ambas en formato mes/día/año)**.
- 3) Adjuntar orden médica que indique claramente el panel o gen a estudiar, y el laboratorio a usar.
 - Nombre completo del paciente y padres del paciente, en caso de tratarse de la muestra de un niño.
 - Fecha de nacimiento del paciente.
 - Rut del paciente
 - E-mail del paciente (o de uno de los padres si se trata de un menor)
 - Teléfono del paciente(o de uno de los padres si se trata de un menor)
 - Breve diagnóstico clínico provisto por el médico tratante
 - Orden médica indicando el laboratorio y el panel o genes solicitados.
 - Breve historial familiar, en caso de haberlo o de ser relevante.
- 4) Contactar a muestras@genometrics.cl o al 56 22 400 3886 para solicitar el retiro de la muestra, indicando lugar de retiro y persona de contacto.