



EVROPSKÁ UNIE
Evropské strukturální a investiční fondy
Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání



Reg. č. projektu: CZ.02.2.69/0.0/0.0/16_015/0002362

Autor: kolektiv autorů pod vedením prof. MUDr. Petra Zacha, CSc. z Ústavu Anatomie 3. LF UK



Toto dílo podléhá licenci Creative Commons licenci 4.0 Mezinárodní Licence

Vyhodnocení výsledků analýzy HFE genu

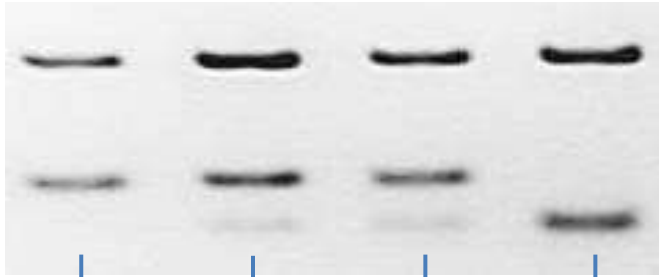
Detekce mutace C282Y

Analýza: Obecná PCR + následná analýza PCR produktu pomocí RFLP + gelové elektroforézy
PCR: primery v PCR reakci se váží do **blízkosti** sekvence, která nás zajímá (místo možné mutace),
nikdy však **přímo** do místa našeho zájmu ☐ je zapotřebí další (následné) analýzy RFLP:
štěpení PCR produktu restriktivní endonukleázou přímo ve zkoumané sekvenci

Restriktivní enzym RsaI – restriktivní místo (GTAC) vzniká mutací (mutace = štěpení)

– jedno další restriktivní místo (GTAC) je vždy přítomno v namnoženém úseku DNA = normální sekvence sloužící jako pozitivní kontrola štěpení

□ PCR produkt (390 bp) štěpen pouze v kontrolním místě (250 bp + 140 bp) = zdravý homozygot



(druhý fragment: 140 bp)

PCR produkt štěpen v místě mutace (první fragment: 111 bp)

□ PCR produkt (390 bp) štěpen v kontrolním místě a zároveň v místě mutace (250 bp + 111 bp + 39 bp) = homozygot s mutací

□ část PCR produktu štěpena pouze v kontrolním místě (zdravá alela 250 bp + 140 bp), druhá část PCR produktu štěpena v kontrolním místě a zároveň v místě mutace (mutovaná alela 250 bp + 111 bp + 39 bp) tzn. 250 bp + 140 bp + 111 bp + 39 bp = heterozygot

PCR produkt štěpen v kontrolním místě
(první fragment: 250 bp)

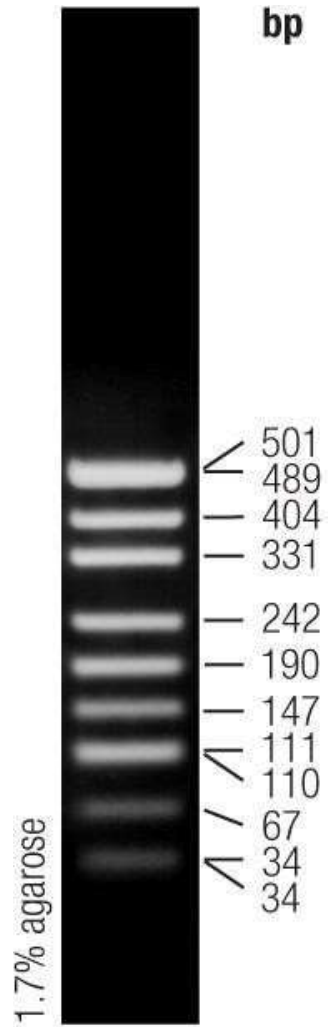
(druhý fragment (39 bp) je stěží viditelný, tudíž není ukázán)

zdravý heterozygot homozygot

homozygot

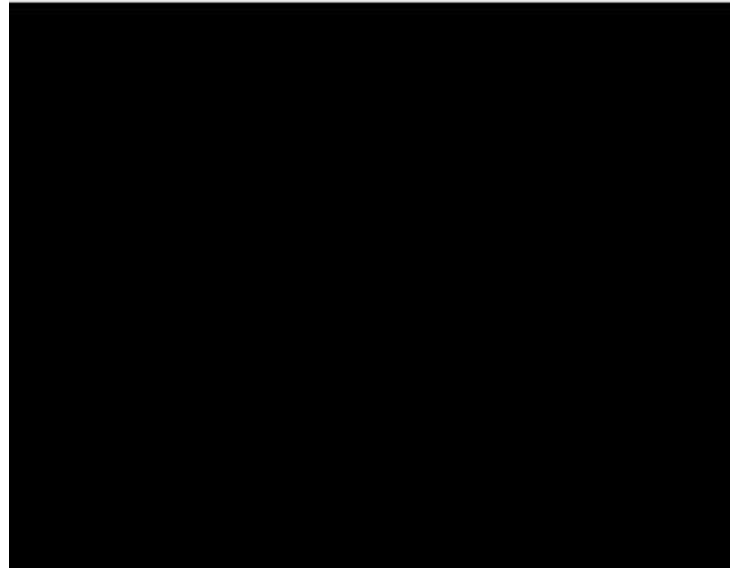
s mutací

Marker molekulových hmotností použitý při gelové elektroforéze



Thermo

SCIENTIFIC



A1 – Analýza mutace C282Y podmiňující hemochromatózu (HFE gen)

Analýza: PCR s obecnými primery následována RFLP analýzou + gelová elektroforéza

PCR: Amplifikace části HFE genu o délce 390 bp

RFLP: Restrikční enzym RsaI – místo štěpení mutací vzniká (mutace = štěpení)

+ dodatečné kontrolní místo štěpení

- Štěpení PCR produktu pouze v kontrolním místě (250 bp + 140 bp) = zdravý homozygot
- Dvojitý štěpení PCR produktu: v kontrolním místě a v místě mutace (250 bp + 111 bp + 39 bp) = homozygot s mutací
- Kombinace obou předchozích případů (250 bp + 140 bp + 111 bp + 39 bp) = heterozygot

A2 – Analýza mutace C282Y podmiňující hemochromatózu (HFE gen)

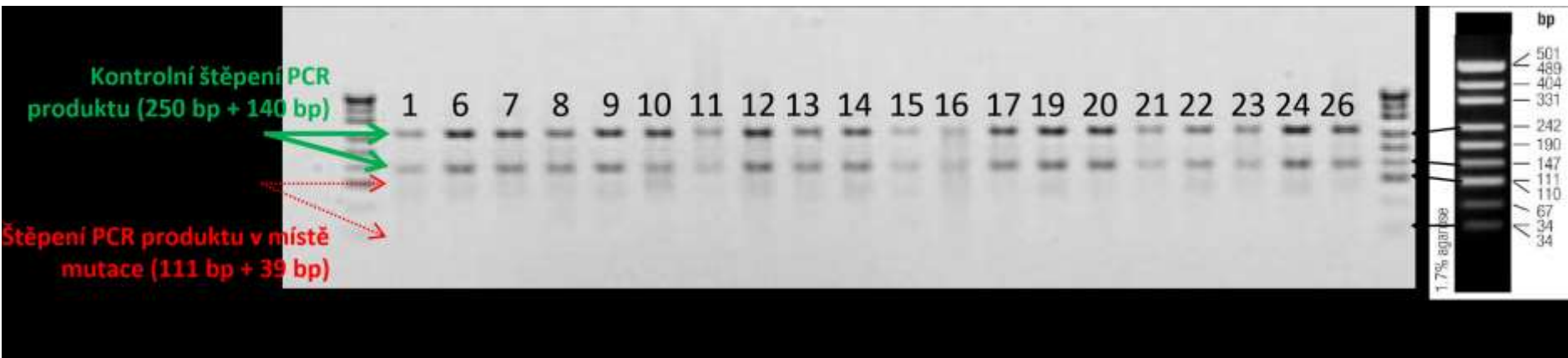
Analýza: PCR s obecnými primery následována RFLP analýzou + gelová elektroforéza

- **zdravý homozygot** – všichni, krom níže uvedených
- **heterozygot?** – 10 (u ostatních se jedná spíše o kontaminace)

Případné dodatečné bandy o nespécifické velikosti jsou kontaminace

PCR: Amplifikace části HFE genu o délce 390 bp

RFLP: Restriční enzym RsaI – místo štěpení mutací vzniká (mutace = štěpení)
+ dodatečné kontrolní místo štěpení

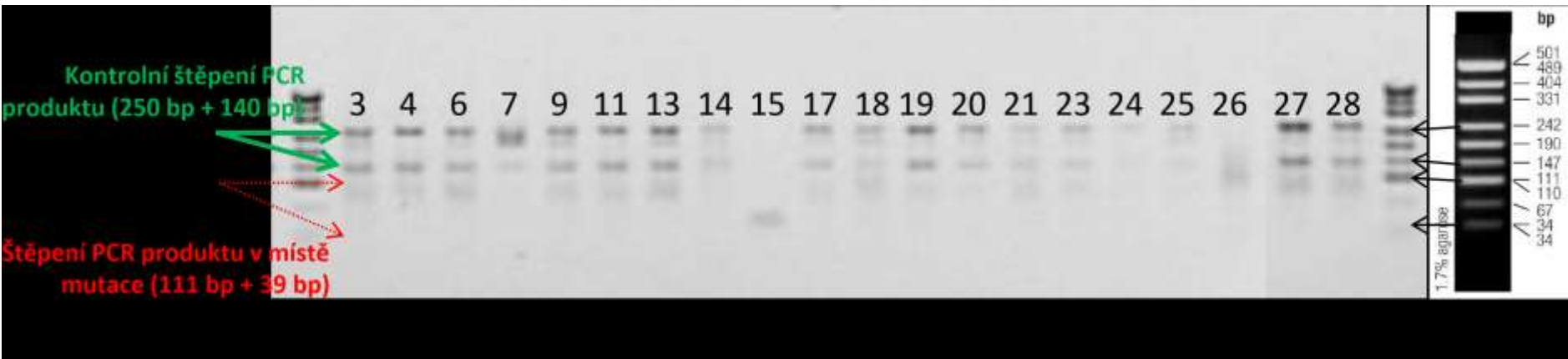


□ Štěpení PCR produktu pouze v kontrolním místě (250 bp + 140 bp) = zdravý homozygot

A3 – Analýza mutace C282Y podmiňující hemochromatózu (HFE gen)

Analýza: PCR s obecnými primery následována RFLP analýzou + gelová elektroforéza

- Dvojitý štěpení PCR produktu: v kontrolním místě a v místě mutace (250 bp + 111 bp + 39 bp) = homozygot s mutací
- Kombinace obou předchozích případů (250 bp + 140 bp + 111 bp + 39 bp) = heterozygot



Případné dodatečné bandy o nesespecifické velikosti jsou kontaminace

A4 – Analýza mutace C282Y podmiňující hemochromatózu (HFE gen)

Analýza: PCR s obecnými primery následována RFLP analýzou + gelová elektroforéza

- **zdravý homozygot** – všichni, krom níže uvedených
- **heterozygot?** – asi nikdo, dodatečné bandy jsou pravděpodobně u všech kontaminace
- ☹ – 15, 26

Případné dodatečné bandy o nespécifické velikosti jsou kontaminace

PCR: Amplifikace části HFE genu o délce 390 bp

RFLP: Restrikční enzym RsaI – místo štěpení mutací vzniká (mutace = štěpení)
+ dodatečné kontrolní místo štěpení

▮ Štěpení PCR produktu pouze v kontrolním místě (250 bp + 140 bp) = zdravý homozygot

▮ Dvojí štěpení PCR produktu: v kontrolním místě a v místě mutace (250 bp + 111 bp + 39 bp) = homozygot s mutací

▮ Kombinace obou předchozích případů (250 bp + 140 bp + 111 bp + 39 bp) = heterozygot

A5 – Analýza mutace C282Y podmiňující hemochromatózu (HFE gen)

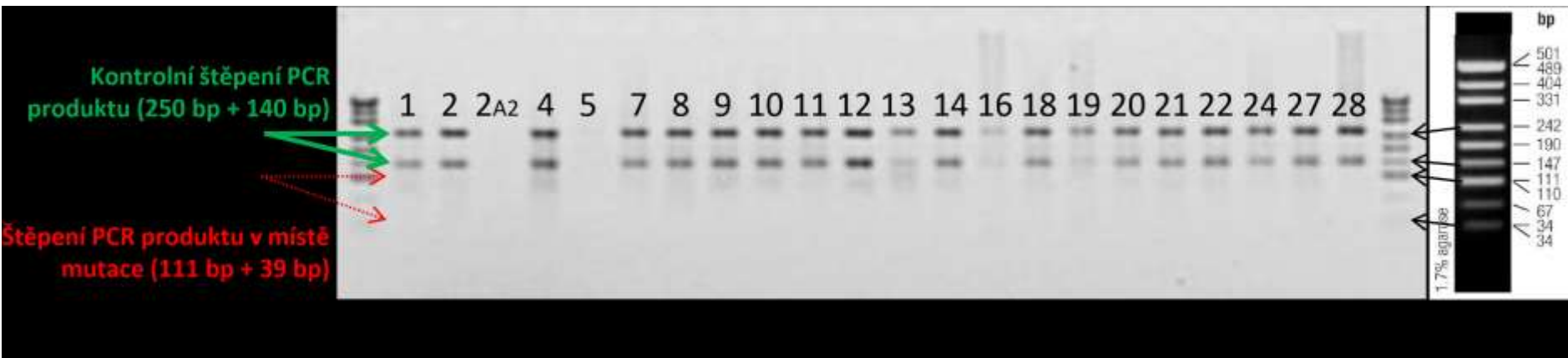
Analýza: PCR s obecnými primery následována RFLP analýzou + gelová elektroforéza

- **zdravý homozygot** – všichni, krom níže uvedených
- **heterozygot?** – 13 (u ostatních vzorků se jedná o kontaminaci – lehce jiná velikost signálu) • ☹ – 2A2, 5

PCR: Amplifikace části HFE genu o délce 390 bp

RFLP: Restrikční enzym RsaI – místo štěpení mutací vzniká (mutace = štěpení)
+ dodatečné kontrolní místo štěpení

▮ Štěpení PCR produktu pouze v kontrolním místě (250 bp + 140 bp) = zdravý homozygot

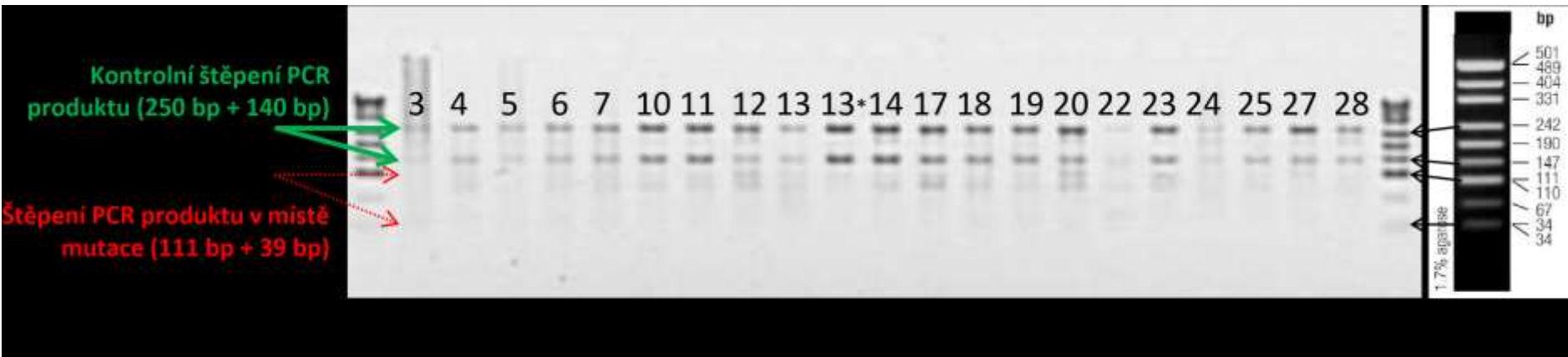


Případné dodatečné bandy o nespécifické velikosti jsou kontaminace

A6 – Analýza mutace C282Y podmiňující hemochromatózu (HFE gen)

Analýza: PCR s obecnými primery následována RFLP analýzou + gelová elektroforéza

- Dvojitý štěpení PCR produktu: v kontrolním místě a v místě mutace (250 bp + 111 bp + 39 bp) = homozygot s mutací
- Kombinace obou předchozích případů (250 bp + 140 bp + 111 bp + 39 bp) = heterozygot



A7 – Analýza mutace C282Y podmiňující hemochromatózu (HFE gen)

Analýza: PCR s obecnými primery následována RFLP analýzou + gelová elektroforéza

- **zdravý homozygot** – všichni, krom níže uvedených
- **heterozygot?** – nelze říct, mnoho kontaminací, tudíž nelze přítomnosti štěpu důvěřovat (např. 12, 13, 17, 20, 23, 27)

Případné dodatečné bandy o nespécifické velikosti jsou kontaminace

PCR: Amplifikace části HFE genu o délce 390 bp

RFLP: Restrikční enzym RsaI – místo štěpení mutací vzniká (mutace = štěpení)
+ dodatečné kontrolní místo štěpení

- Štěpení PCR produktu pouze v kontrolním místě (250 bp + 140 bp) = zdravý homozygot
- Dvojí štěpení PCR produktu: v kontrolním místě a v místě mutace (250 bp + 111 bp + 39 bp) = homozygot s mutací
- Kombinace obou předchozích případů (250 bp + 140 bp + 111 bp + 39 bp) = heterozygot

Případné dodatečné bandy o nespécifické velikosti jsou kontaminace

A8 – Analýza mutace C282Y podmiňující hemochromatózu (HFE gen)

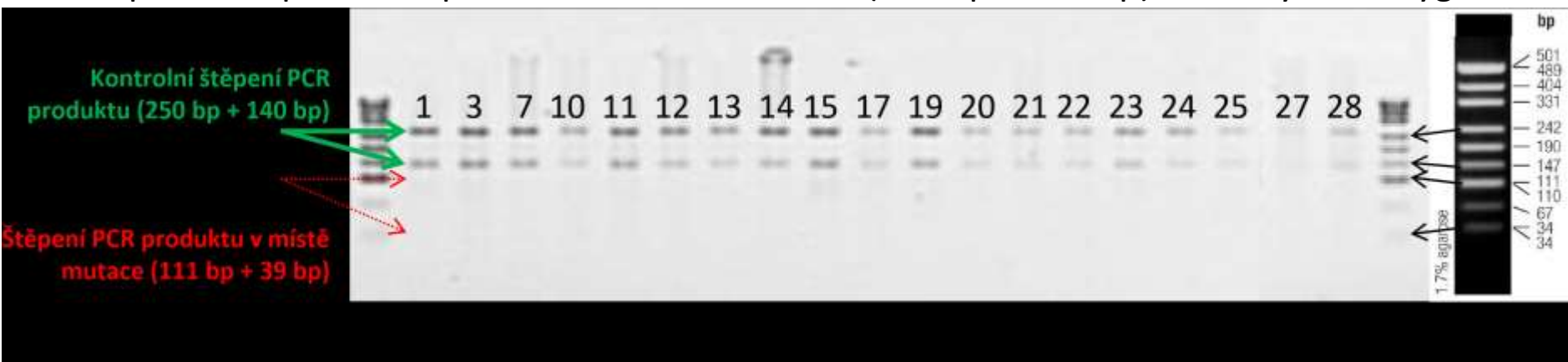
Analýza: PCR s obecnými primery následována RFLP analýzou + gelová elektroforéza

- **zdravý homozygot** – všichni, krom níže uvedených
- **heterozygot?** – 15 (možná jde o kontaminaci)
- **?** – 27 (velmi slabý signál, ale asi zdravý homozygot)

PCR: Amplifikace části HFE genu o délce 390 bp

RFLP: Restriční enzym RsaI – místo štěpení mutací vzniká (mutace = štěpení)
+ dodatečné kontrolní místo štěpení

□ Štěpení PCR produktu pouze v kontrolním místě (250 bp + 140 bp) = zdravý homozygot

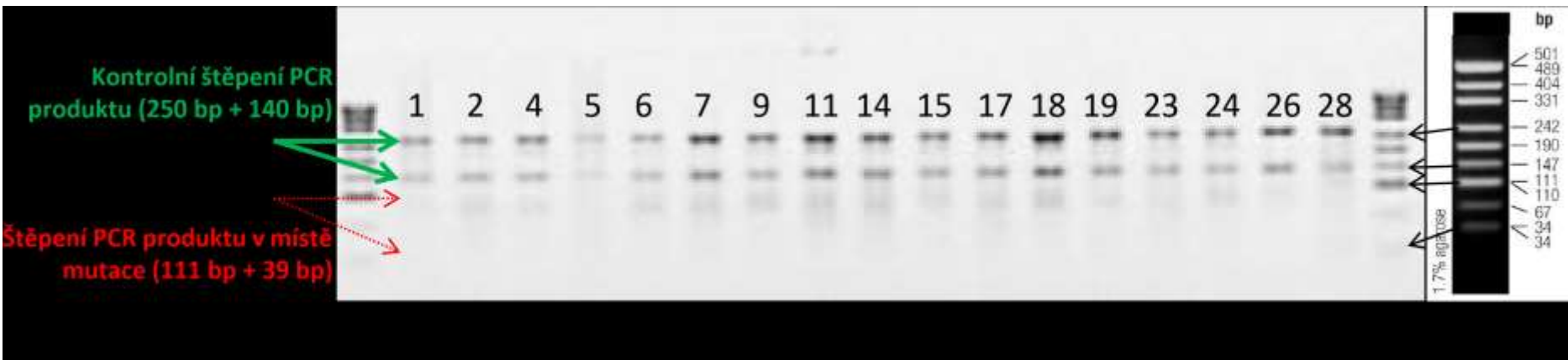


A9 – Analýza mutace C282Y podmiňující hemochromatózu (HFE gen)

Analýza: PCR s obecnými primery následována RFLP analýzou + gelová elektroforéza

□ Dvojitý štěpení PCR produktu: v kontrolním místě a v místě mutace (250 bp + 111 bp + 39 bp) = homozygot s mutací

□ Kombinace obou předchozích případů (250 bp + 140 bp + 111 bp + 39 bp) = heterozygot



- **zdravý homozygot** – všichni, krom níže uvedených
- **heterozygot?** – 28 (signály u ostatních vzorků mají jinou velikost = kontaminace)

Případné dodatečné bandy o nespécifické velikosti jsou kontaminace

PCR: Amplifikace části HFE genu o délce 390 bp

Případné dodatečné bandy o nespécifické velikosti jsou kontaminace

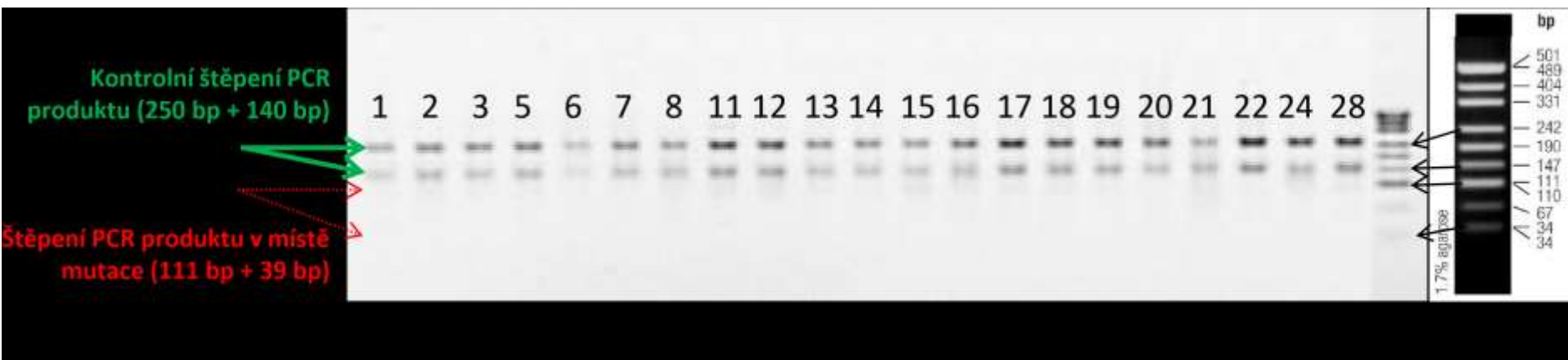
A10 – Analýza mutace C282Y podmiňující hemochromatózu (HFE gen)

Analýza: PCR s obecnými primery následována RFLP analýzou + gelová elektroforéza

RFLP: Restrikční enzym RsaI – místo štěpení mutací vzniká (mutace = štěpení)

+ dodatečné kontrolní místo štěpení

- Štěpení PCR produktu pouze v kontrolním místě (250 bp + 140 bp) = zdravý homozygot
- Dvojitý štěpení PCR produktu: v kontrolním místě a v místě mutace (250 bp + 111 bp + 39 bp) = homozygot s mutací
- Kombinace obou předchozích případů (250 bp + 140 bp + 111 bp + 39 bp) = heterozygot



- zdravý homozygot – všichni, krom níže uvedených

A11 – Analýza mutace C282Y podmiňující hemochromatózu (HFE gen)

Analýza: PCR s obecnými primery následována RFLP analýzou + gelová elektroforéza

- **heterozygot?** – některé vzorky vypadají, že mají ve velikosti 111 bp štěp (např. 11, 12, 15), ale vzhledem k nízké intenzitě signálu usuzují spíše na kontaminaci

PCR: Amplifikace části HFE genu o délce 390 bp

RFLP: Restrikční enzym RsaI – místo štěpení mutací vzniká (mutace = štěpení)
+ dodatečné kontrolní místo štěpení

- Štěpení PCR produktu pouze v kontrolním místě (250 bp + 140 bp) = zdravý homozygot
- Dvojitý štěpení PCR produktu: v kontrolním místě a v místě mutace (250 bp + 111 bp + 39 bp) = homozygot s mutací
- Kombinace obou předchozích případů (250 bp + 140 bp + 111 bp + 39 bp) = heterozygot

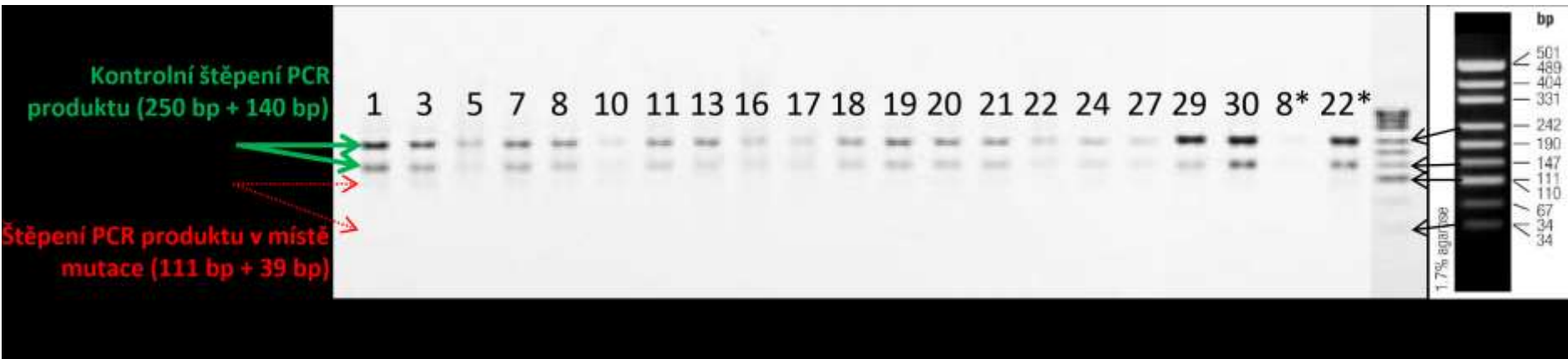
Případné dodatečné bandy o nesespecifické velikosti jsou kontaminace

A12 – Analýza mutace C282Y podmiňující hemochromatózu (HFE gen)

Analýza: PCR s obecnými primery následována RFLP analýzou + gelová elektroforéza

- **zdravý homozygot** – všichni, krom níže uvedených
- **heterozygot?** – některé vzorky vypadají, že mají ve velikosti 111 bp štěp (např. 3), ale vzhledem k nízké intenzitě signálu usuzují spíše na kontaminaci
- **? – 8*** (velmi slabý signál, ale asi zdravý homozygot)

Případné dodatečné bandy o nespécifické velikosti jsou kontaminace



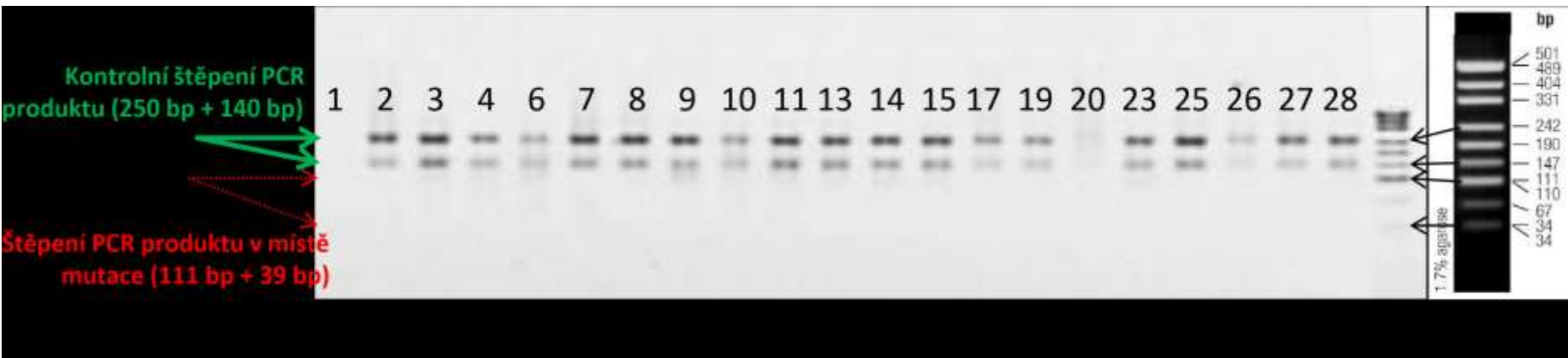
A13 – Analýza mutace C282Y podmiňující hemochromatózu (HFE gen)

Analýza: PCR s obecnými primery následována RFLP analýzou + gelová elektroforéza

PCR: Amplifikace části HFE genu o délce 390 bp

RFLP: Restriční enzym RsaI – místo štěpení mutací vzniká (mutace = štěpení)
+ dodatečné kontrolní místo štěpení

- Štěpení PCR produktu pouze v kontrolním místě (250 bp + 140 bp) = zdravý homozygot
- Dvojitý štěpení PCR produktu: v kontrolním místě a v místě mutace (250 bp + 111 bp + 39 bp) = homozygot s mutací
- Kombinace obou předchozích případů (250 bp + 140 bp + 111 bp + 39 bp) = heterozygot



A14 – Analýza mutace C282Y podmiňující hemochromatózu (HFE gen)

Analýza: PCR s obecnými primery následována RFLP analýzou + gelová elektroforéza

- **zdravý homozygot** – všichni, krom níže uvedených
- **heterozygot?** – 9 (možná i další, ale těžko říci, zda se jedná o štěp či kontaminaci; nicméně, vzhledem k velmi slabé intenzitě a pravděpodobně trochu jiné velikosti bych spíše usuzovala na kontaminaci)
- ☹ – 20

Případné dodatečné bandy o nesespecifické velikosti jsou kontaminace