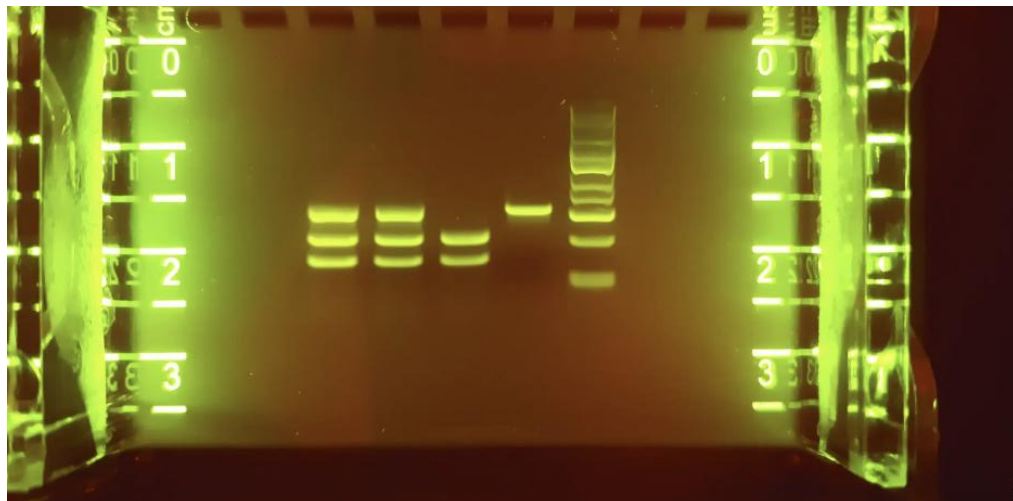




LabDidakt ApS

Hæmokromatose Kit

Genetik – DNA-elektroforese



Indhold

1. Introduktion	2
2. Det defekte HFE-"signal"-protein	3
3. PCR-RFLP screening.....	4
4. Forsøgets princip	6
5. Procedure - Forberedelse af opløsninger.....	7
6. Resultater.....	8

1. Introduktion

Hæmokromatose er en af de mest almindelige genetiske sygdomme hos mennesker. Den medfører en kronisk og progressiv jernophobning i kroppen. Symptomerne er uspecifikke og varierer fra patient til patient. Hvis jernet ikke elimineres, påvirker det de organer, hvor det ophobes (lever, bugspytkirtel, hjerte, knogler) og kan føre til cirrose, diabetes eller hjertesvigt.

I Vesten er det den genetiske sygdom med flest disponerede personer. I Frankrig er hæmokromatose i 80 % af tilfældene knyttet til p.Cys282Tyr-mutationen (C282Y) i HFE-genet (1 ud af 9 franskmænd er heterozygot H/h for dette gen).

Talrige og varierede symptomer

- Generel træthed eller asteni, enten fysisk eller psykisk. På et fremskredent stadium bliver trætheden permanent og kan føre til sygemelding, invaliditet eller depression.
- Led- og knogleskader er alvorlige hos 2 ud af 3 patienter og bliver meget smertefulde.
- Leverskader forekommer hos 95 % af patienterne.
- Seksuelle forstyrrelser observeres ofte.
- Hjertepåvirkning ses hos 15 % af patienterne.
- Melanodermi ses hos 90 % af patienterne: Den grønlig-grå hyperpigmentering skyldes øget melaninproduktion i epidermis' basale lag.

Der ses også negledeformiteter, nedsat hårvækst, hudens skrøbelighed og kutane tegn på leversvigt.

Nogle patienter har få komplikationer (træthed, ledsmerter), mens andre udvikler alvorlige symptomer. Den store variation skyldes miljøfaktorer, der fremmer jernoptagelse (såsom C-vitamin, alkohol, leverpåvirkende virus osv.).

2. Det defekte HFE-"signal"-protein

Den menneskelige krop indeholder omkring 4 g jern, som hovedsageligt findes i hæmoglobinet i de røde blodlegemer (75 %) eller lagres i andre væv, især leveren (0,5–1 g). Dette jern kommer fra kosten, og den daglige optagelse i enterocytterne (tarmcellerne) svarer til tabet (ca. 2 mg pr. dag).

Reguleringen af kroppens jernoptagelse afhænger af hormonet hepcidin, der produceres i leveren. Udskillelsen afhænger blandt andet af proteinet HFE. Mekanismen er illustreret i diagrammet på siden:

HFE-proteinet fungerer som et "signal" for, hvor meget jern kroppen rummer. Når HFE-proteinet binder til enterocytterne, fortæller det dem, at jernlageret er tilstrækkeligt.

Hos personer med hæmokromatose er HFE-proteinet ændret og kan ikke binde til enterocytterne. Tarmcellerne "tolker" denne manglende binding som jernmangel og begynder at producere flere DMT1-transportere, hvilket øger jernoptagelsen.

HFE-proteinet består af 348 aminosyrer. I 60–100 % af tilfældene (afhængigt af populationen) skyldes hæmokromatose C282Y-mutationen i HFE-genet.

En genetisk oprindelse

C282Y-mutationen definerer HFE1-hæmokromatose.

For at sygdommen opstår, skal begge kromosomer bære det muterede allel (h) med C282Y-mutationen — altså en homozygot mutation. Ét allel arves fra faren og ét fra moderen. HFE-genet ligger på kromosom 6. Det muterede h-allel er recessivt i forhold til det normale H-allel.

I Frankrig bærer næsten 1 ud af 300 personer to C282Y-alleler og har risiko for jernophobning.

Selv hos genetisk disponerede personer kan sygdommens sværhedsgrad variere betydeligt pga. faktorer som kost, individuel fysiologi og miljø. Nogle homozygoter udvikler aldrig unormale jernværdier. Undersøgelser viser, at kun ca. 50 % af mænd med mutationen udvikler forhøjet transferrinmætning eller ferritin.

3. PCR-RFLP screening

Princip for genetisk screening via PCR-RFLP

- PCR: Polymerasekædereaktion
- RFLP: Restriktionsfragment-længde-polymorfi
-

Symptomer samt forhøjet transferrinmætning (>45 %) fører ofte til test for C282Y-mutationen ved hjælp af PCR-RFLP-metoden i 3 trin:

Trin 1 (PCR): Amplificering af et specifikt område af HFE-genet

Trin 2 (RFLP): Fordøjelse med enzymet Rsa I, der genkender sekvensen GTAC og skærer mellem T og A

Trin 3 (elektroforese): Adskillelse af DNA-fragmenter i agarosegel

Princippet for DNA-gelelektroforese

I et let basisk miljø opfører DNA sig som en polyanion. Når DNA placeres i agarose og udsættes for et elektrisk felt, migrerer fragmenter med forskellig hastighed afhængigt af størrelse (bp eller kb).

Store fragmenter bevæger sig langsommere end små fragmenter.

Kit-indhold og anvendelse

Kittet leveres som færdige DNA-opløsninger (klar til gel).

Format for 40 elever (20 par):

Ét forsøg =

1 prøverør "Forælder 1" (8 µl)

1 prøverør "Forælder 2" (8 µl)

1 prøverør "Barn 1" (8 µl)

1 prøverør "Barn 2" (8 µl)

10 størrelsesmarkører (til op til 10 geler)

Total sessionstid: 30–40 minutter, heraf 15–20 min migration.

Kitindhold

Forælder 1 (H/h) – 175 µL

Forælder 2 (H/h) – 175 µL

Barn 1 (H/H) – 175 µL

Barn 2 (h/h) – 175 µL

Størrelsesmarkør – 90 µL

Yderligere forbrugsstoffer (ikke inkluderet)

Agarose

TAE-buffer

Fluorescensfarve

(Alt samlet i ref. 107646 til 10 minigeler)

Yderligere udstyr

Elektroforesetank

Mikropipette (2–20 µl)

4. Forsøgets princip

De 4 DNA-rør svarer til 4 personer fra en fiktiv familie. DNA'et stammer fra PCR-amplificering af HFE-genet og efterfølgende Rsa I-fordøjelse.

Trin 1: PCR-amplificering af 387 bp-region

Sekvensuddrag fra H (normal) og h (muteret) allel:

H-allel: TACGTGCCAG...

h-allel: TACGTACCAG...

Trin 2: Enzymatisk fordøjelse

- H-allel $\rightarrow$ 1 kløvning
- h-allel $\rightarrow$ 2 kløvninger

Frag-ment-længder:

- H/H $\rightarrow$ 247 + 140 bp
- h/h $\rightarrow$ 247 + 111 bp
- H/h $\rightarrow$ alle tre: 247 + 140 + 111 bp

29 bp-fragmentet forsvinder hurtigt ud af gelen.

5. Procedure - Forberedelse af opløsninger

TAE 1X-buffer

- 150 mL pr. elektroforesesystem
- Hæld 10X TAE-buffer i 900 mL destilleret vand og bland

Fremstilling af 2,5 % agarosegel

1. 15 mL TAE 1X i en 50 mL kolbe
2. 0,37 g agarose tilsættes
3. Opvarmes i mikrobølgeovn til opløst
4. 2 μ L GelGreen tilsættes
5. Afkøles 2–3 minutter
6. Hældes i form med kam

(Alternativ: 2 % gel = 0,30 g agarose)

DNA-præparation

- Læreren laver aliquoter før session
- Prøver optøs kortvarigt i varmt vand, derefter afkøles i isvand (undgår sammenklustring)
- Produktet tåler flere fryse-optø-cykler

DNA-deponering

- Pipetter 8 μ L DNA i hver brønd
- 8 μ L størrelsesmarkør
- Migrationstid ca. 20 min

6. Resultater

Forventede profiler

Forælder 1 og 2: H/h (heterozygot, rask bærer)

Barn 1: H/H (homozygot normal, rask)

Barn 2: h/h (homozygot muteret, syg)