

# STANOVENÍ POLYMORFIZMŮ V *MTHFR* GENU

*cvičení 10*

E2050 Laboratorní cvičení z molekulární biologie a mikrobiologie

MUNI | RECETOX  
SCI

ENVIRONMENTAL  
GENOMICS

# KYSELINA LISTOVÁ (FOLÁT)

- folát, vitamín B9, vitamín M, folacin, acidum folicum
- vitamin skupiny B rozpustný ve vodě
- užívat před početím, velmi důležité je užívat aktivní folát v prvních třech měsících těhotenství
- vhodné jsou doplňky stravy s **aktivním folátem** - ve složení by mělo být uvedeno Quatrefolic, Metfolin, 5-methyltetrahydrofolát nebo 5-MTHF



Potraviny bohaté na foláty



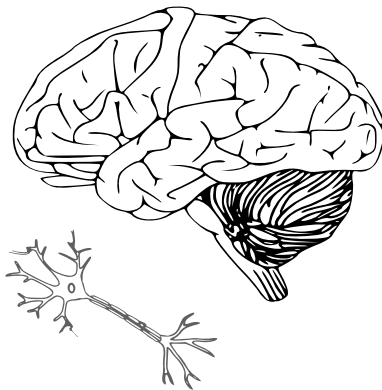
## ÚLOHA FOLÁTU



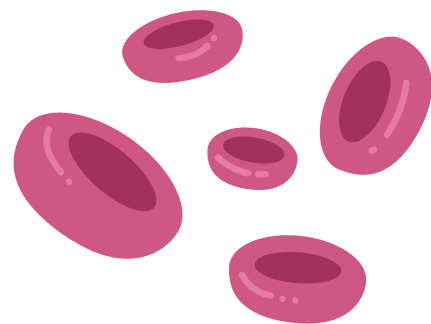
**RŮST  
BUNĚK**



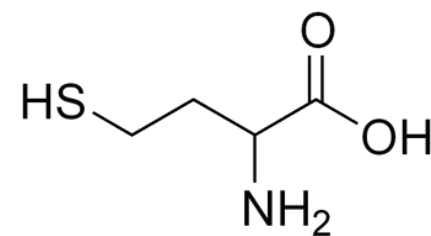
**SYNTÉZA  
DNA**



**PODPORUJE FUNKCI  
NERVOVÉHO SYSTÉMU**

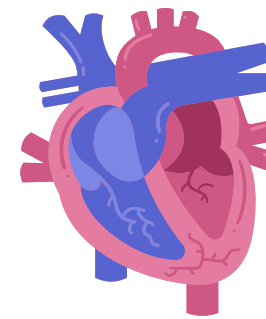


**TVORBA  
ERYTROCYTŮ**



**SNIŽUJE HLADINU  
HOMOCYSTEINU**

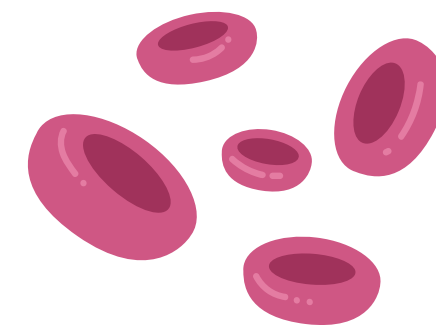
## NÍZKÁ HLADINA FOLÁTU



**VYSOKÁ HLADINA  
HOMOCYSTEINU → SRDEČNÍ  
ONEMOCNĚNÍ**



**VÝVOJOVÉ VADY PLODU (CNS)**



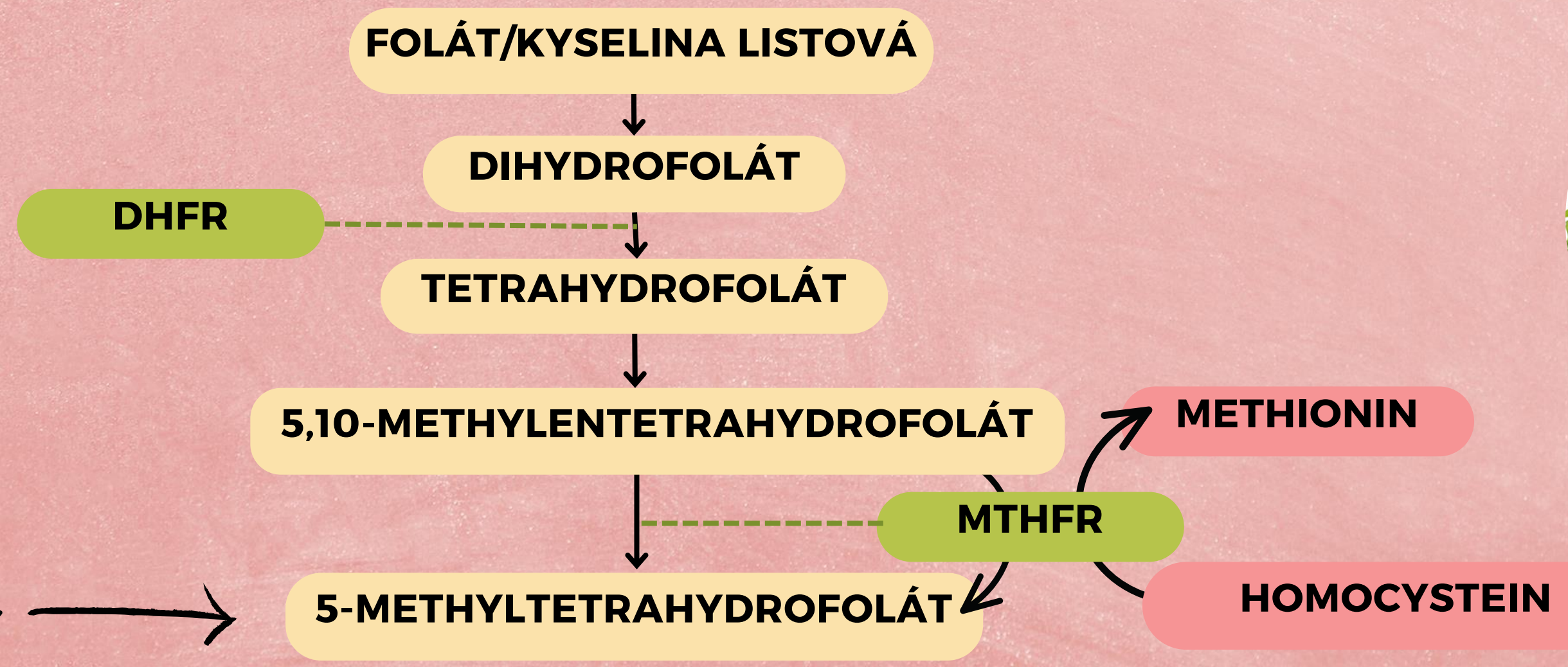
**ANÉMIE**



**CIVILIZAČNÍ ONEMOCNĚNÍ  
(KOMORBIDITY)**

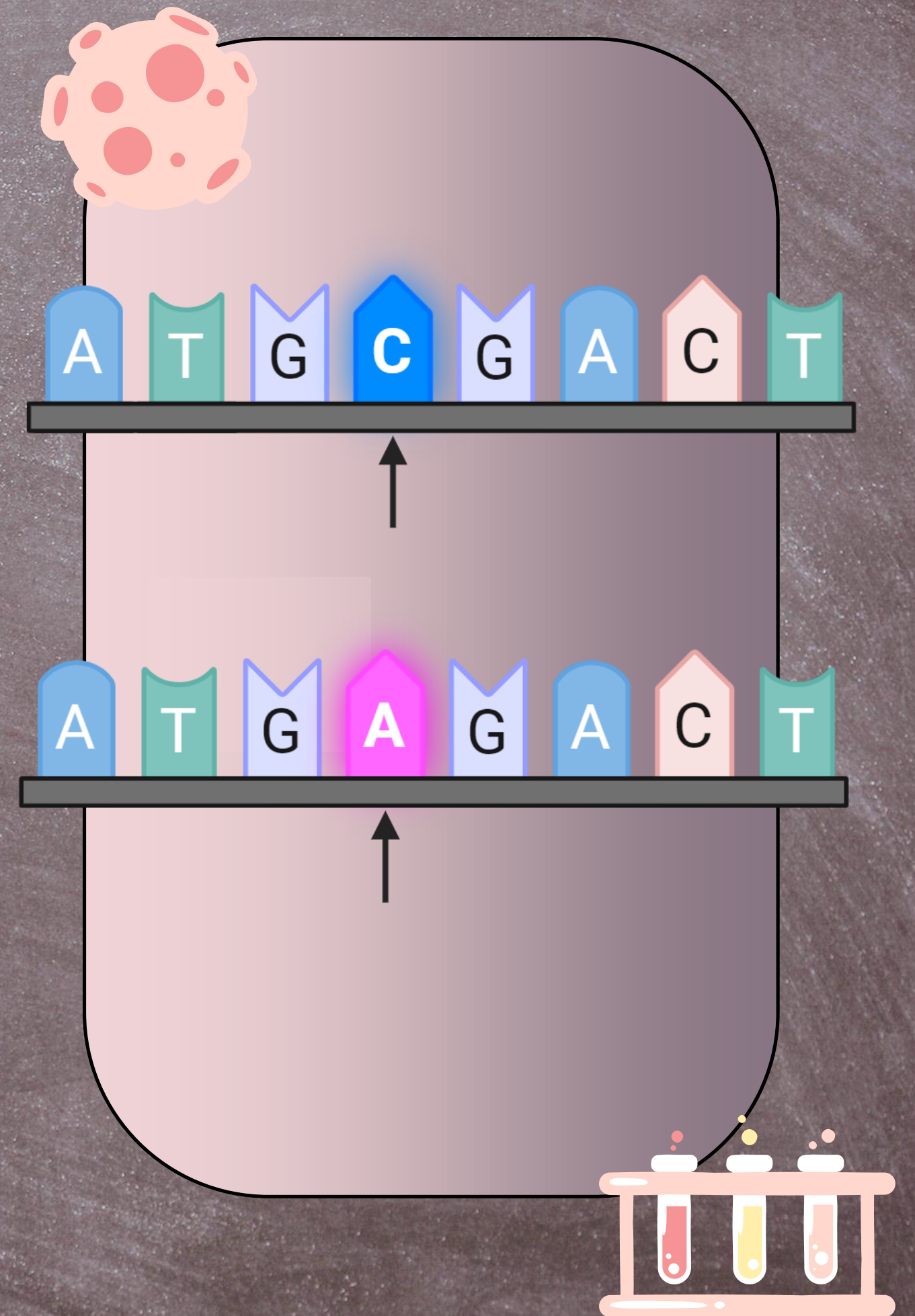
# METHYLENTETRAHYDROFOLÁT REDUKTÁZA (MTHFR)

- Gen **MTHFR** kóduje enzym **5-methylenetetrahydrofolátreduktázu** esenciální pro přeměnu **folátu** a **kyseliny listové** (souhrnně jsou označovány jako **vitamin B9**) na aktivní formu **5-methyltetrahydrofolát** (aktivní folát, nebo metylovaný folát) - tělo umí využít
- nedostatek aktivního folátu vede ke **↑ homocysteinu = hyperhomocysteinemie**
- homocystein je meziproduktem při syntéze aminokyseliny cystein; zvýšená hladina - rizikový faktor onemocnění cév, ischemické choroby srdeční, mozkových příhod, potratů a vývojových vad plodu, zejména nervové soustavy



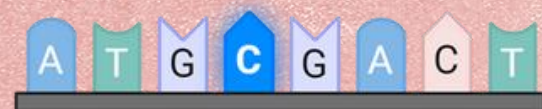
# JEDNONUKLEOTIDOVÝ POLYMORFISMUS

- angl. **single nucleotide polymorphism** (zkratka **SNP**)
- záměna jednoho nukleotidu, který se vyskytuje na konkrétním místě genomu
- **varianta je v populaci přítomna  $\geq 1\%$**



# POLYMORFISMY V GENU *MTHFR*

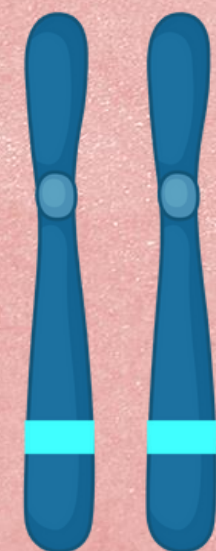
## rs1801133 (C677T)



WILD-TYPE ALELA

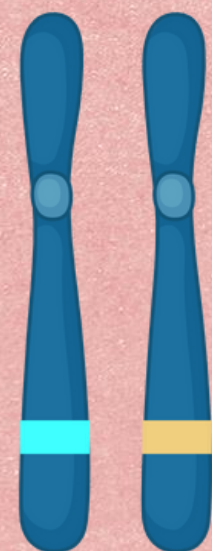


MUTANTNÍ ALELA



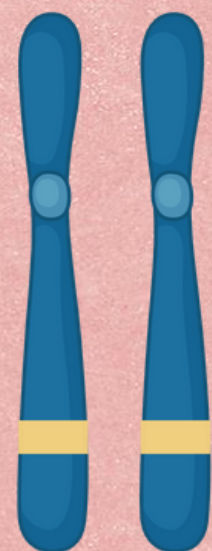
HOMOZYGOT VIC

CC



HETEROZYGOT

CT



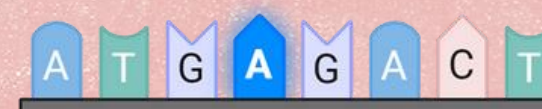
HOMOZYGOT FAM

TT

FENOTYP (AKTIVITA MTHFR ENZYMU):  
**100%**



## rs1801131 (A1289C)



WILD-TYPE ALELA



MUTANTNÍ ALELA



HOMOZYGOT VIC

AA



HETEROZYGOT

AC



HOMOZYGOT FAM

CC

FENOTYP (AKTIVITA MTHFR ENZYMU):  
**100%**



# QPCR - PRINCIP GENOTYPIZACE

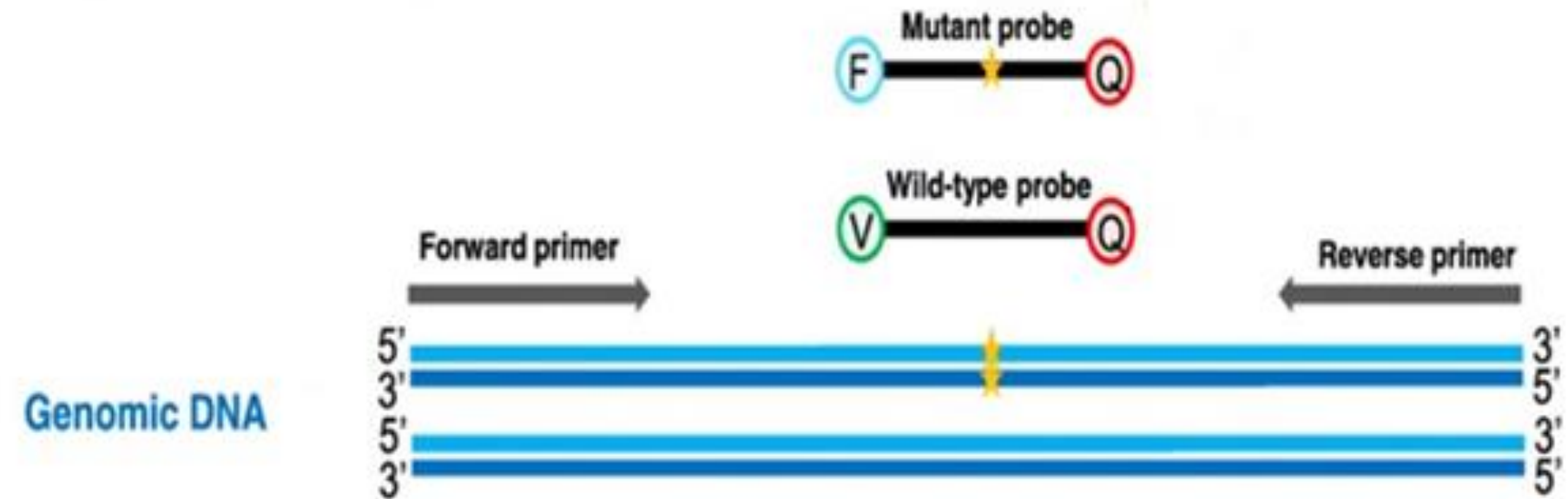
• komerční sonda obsahuje:

1. forward primer
2. reverse primer
3. sondu značená VIC
4. sondu značení FAM

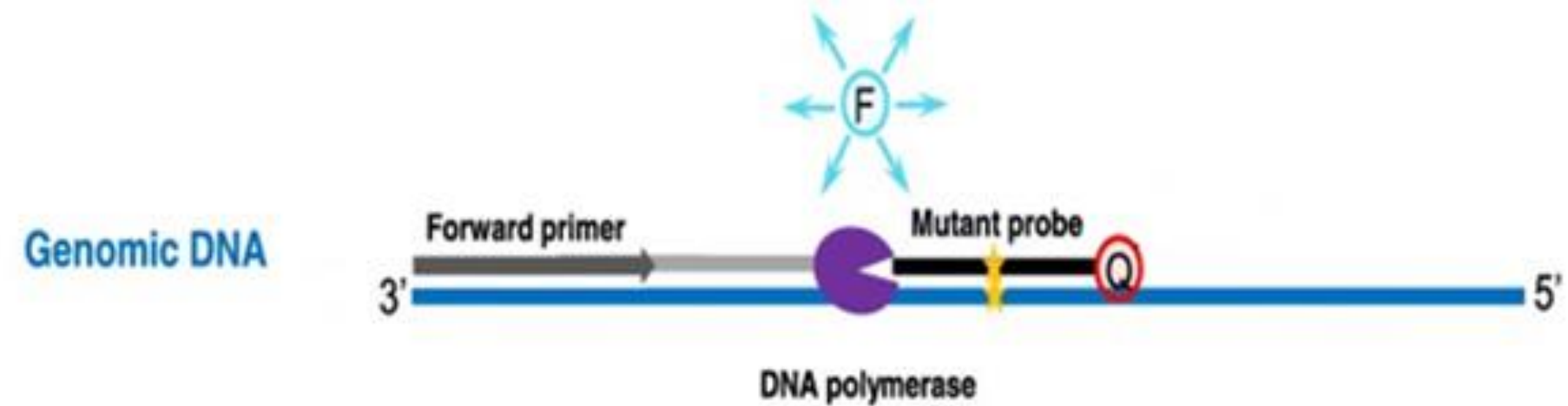
Jaký je rozdíl mezi  
PCR a qPCR?



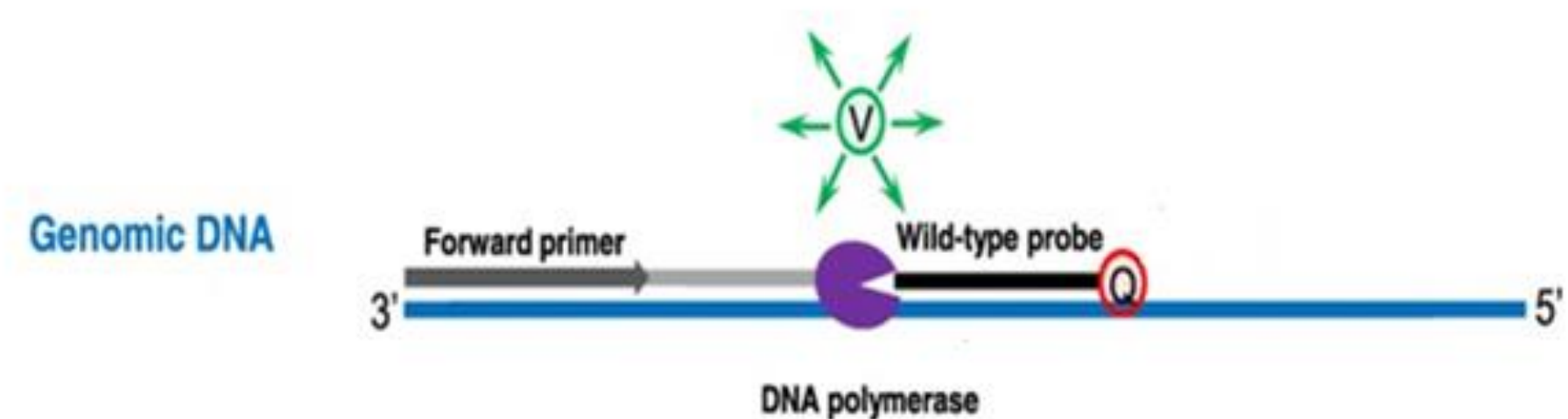
## 1. Template DNA and assay components



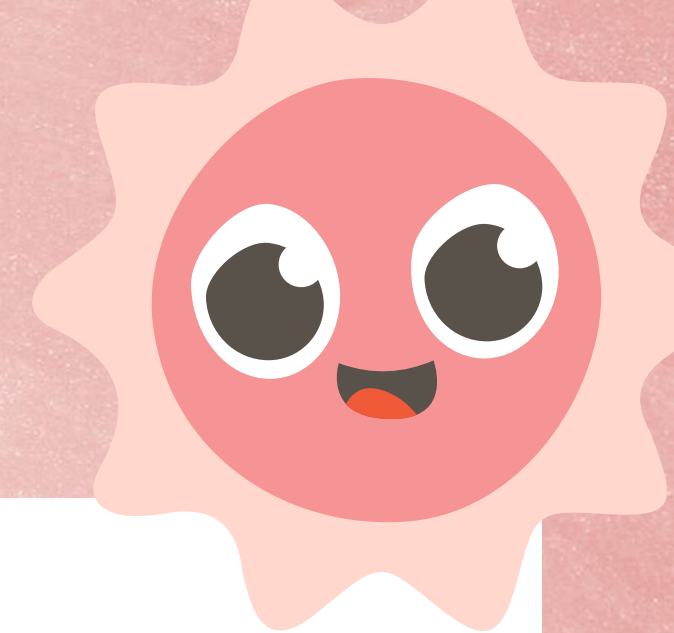
## 2. Denatured mutant template, probe annealing and signal generation



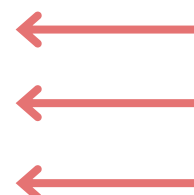
## 3. Denatured wild-type template, probe annealing and signal generation



# QPCR - POSTUP



| Reagencie – rs1801131                                 | Finální koncentrace | Množství 1 reakce | Množství 9 reakce |
|-------------------------------------------------------|---------------------|-------------------|-------------------|
| FastStart Essential DNA Probes Master (MasterMix)     | 1x                  | 5 ul              |                   |
| PCR grade voda                                        | -                   | 3,8 ul            |                   |
| TaqMan® SNP Genotyping Assays (rs1801131 / rs1801133) | 1x                  | 0,2 ul            |                   |
| Namíchaný MasterMix                                   | -                   | 9 ul              |                   |
| DNA vzorek                                            | -                   | 1 ul              | -                 |
| <b>Celkový objem</b>                                  | -                   | <b>10 ul</b>      | -                 |



|                                 | 1. strip | 2. strip |
|---------------------------------|----------|----------|
| Číslo Vašeho vzorku             | VZ_1     | VZ_1     |
| Označení jamek                  | A        | VZ_1     |
|                                 | B        | VZ_1     |
|                                 | C        | PC_1     |
|                                 | D        | PC_2     |
|                                 | E        | PC_3     |
|                                 | F        | NC_1     |
|                                 | G        | NC_2     |
|                                 | H        | NC_3     |
| Poslední dvojčíslí polymorfismu | 31       | 33       |





# 60%

Těhotných žen trpí nedostatkem vitamínu B9

# 3x

Vyšší potřeba vitamínu B9 v těhotenství

# N<sub>2</sub>O

Rajský plyn (anestezie) zvyšuje hladinu homocysteinu v krvi u lidí s homozygotní mutací genu MTHFR 677C>T nebo 1298A>C

# FOLÁT

Název kyselina listová se používá u syntetických preparátů, folát je označení pro tetrahydrofolátové deriváty, které se přirozeně nacházejí v potravinách, souhrnný název vitamin B9

# DĚKUJI ZA POZORNOST

## Informace o duševním vlastnictví

Tato prezentace je autorským dílem vytvořeným zaměstnanci Masarykovy univerzity.

Studenti kurzu/předmětu mají právo pořídit si kopii prezentace pro potřeby vlastního studia.

Jakékoliv další šíření prezentace nebo její části bez svolení Masarykovy univerzity je v rozporu se zákonem.



Canva



ENVIRONMENTAL  
GENOMICS

MUNI | RECETOX  
SCI