



FaF VFU	Druh dokumentace: Standardní operační postup	Strana:	1/3
Palackého 1/3 612 42 BRNO	Označení dokumentace: SNP-ICAM1 K469E	Počet listů/příloh:	3/0
Výtisk č.		Účinnost od:	27.9. 2007
Název dokumentu: Detekce polymorfismu K469E v genu ICAM1			
Rozsah působnosti: <i>Laboratoř farmakogenomiky</i>	Zpracoval: Jana Svobodová	Vydal: Milan Bartoš	Schválil: Milan Bartoš

1. Teoretický úvod

V genu ICAM-1 bylo identifikováno nejméně dvacet jednoduchých nukleotidových polymorfismů. Pouze dva jsou však spojovány s Crohnovou chorobou. Polymorfismus v kodonu 241 (G/R241, Gly/Arg, exon 4) a kodonu 469 (K/E469, Lys/Glu, exon 6) (Papa et al. 2004). Polymorfismy způsobují změny v řetězcích aminokyselin na imunoglobulinových doménách proteinu ICAM-1, což způsobuje alterace jejich interakce se specifickými ligandy.

Polymorfismus K469E je nekonzervativní substitucí aminokyselin na páté imunoglobulinové doméně ICAM-1. Tato doména je důležitá pro adhezi a B-buněk a dendritických buněk, je prezentována jako imunodominantní epitop molekuly ICAM-1.

Polymorfismus K469E vede k změněné expresi výsledné adhezivní molekuly, což způsobuje alteraci interakce mezi LFA-1 (lymphocyte function antigen 1) a B-buňkami. Změna funkce proteinu ICAM-1 potenciálně přispívá ke genetickým predispozicím k zánětlivým a imunitním onemocněním.

Návrh metody detekce polymorfismu 469E vychází z původního literárního zdroje - Nejentsev et al. (2000).

Literatura:

Nejentsev S, Laine AP, Simell O, Ilonen J (2000): Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) K469E polymorphism: no association with type 1 diabetes among Finns. *Tissue Antigens* 55: 568–570.

Papa A, Pola R, Flex A, Danese S, Armuzzi A et al. (2004): Prevalence of the K469E polymorphism of intercellular adhesion molecule 1 gene in Italian patients with inflammatory bowel disease. *Dig Liver Dis.* 36 (8): 528-32.



2. Pozice primerů v sekvenci lidského genomu

podle GenBank Accession Number – AC011511

```
1 aagcttgcag tgagccaaga tcatgccact gcaactccagc ctgggcaaca gagcaaaact
99001 gtgtgacctg aaccgcggggc ggggctcact gtgtgcctat tccaggcttt ccggcgccca
99061 acgtgattct gacgaagcca gaggtctcag aagggaccga ggtgacagtg aagtgtgagg
99121 cccaccctag agccaagggtg acgctgaatg ggggtccagc ccagccactg ggcccgaggg
99181 cccagctcct gctgaaggcc accccagagg acaacgggcg cagcttctcc tgctctgcaa
99241 ccctggaggt ggccggccag cttatacaca agaaccagac ccgggagctt cgtgtcctgt
99301 gtgagtgggg ctgctggtca atggccccta tcccccaagg cccaatctcc ctgaaggctc
99361 cataaggtct tgcctccaag tcttgccccc acccacctcc atgtcatctc atcgtgtttt
99421 tccagatggc ccccgactgg acgagaggga ttgtccggga aactggacgt ggccagaaaa
99481 ttcccagcag actccaatgt gccaggcttg gggaaccca ttgcccagac tcaagtgtct
99541 aaaggatggc actttccac tgcccatcgg ggaatcagtg actgtcactc gagatcttga
99601 gggcacctac ctctgtcggg ccaggagcac tcaaggggag gtcaccgcga aggtgaccgt
99661 gaatgtgctc tgtgagtga cggcggggca gagctgggtg ggggcagggg ccatggacct
99721 aatgcaatcc tcaccgcctg ttgtatcctc cccacagccc cccggatga gattgtcatc
99781 atcactgtgg tagcagccgc agtcataatg ggcactgcag gcctcagcac gtacctctat
99841 aaccgccagc ggaagatcaa gaaatacaga ctacaacagg ccaaaaaagg gacccccatg
99901 aaaccgaaca cacaagccac gcctccctga acctatcccg ggacagggcc tcttcctcgg
99961 ccttcccata ttggtggcag tggtgccaca ctgaacagag tggaagacat atgccatgca
```

Primer ICAM-1F

Primer ICAM-1R

Pozice polymorfismu

2. Izolace DNA

Izolovat z 200 µl nesrážlivé krve komerční soupravou „QIAquick Blood DNA Isolation Kit“ (QIAGEN) podle návodu výrobce.

3. Amplifikace

Primery:

ICAM-1 F 5' - GGA ACC CAT TGC CCG AGC - 3', 18 mer
ICAM-1 R 5' - GGT GAG GAT TGC ATT AGG TC - 3', 20 mer

Délka produktu: 223 bp

Amplifikační směs:

komponenta	množství
Taq MasterMix (QIAGEN)	10,0 µl
primer ICAM-1F (100 µM)	0,1 µl
primer ICAM-1R (100 µM)	0,1 µl
voda	7,8 µl
DNA (100 ng/µl)	2,0 µl



Program pro termocycler PTC-200:

krok	teplota (°C)	čas
1	94	5 min.
2	94	20 s
3	64	50 s
4	72	1 min.
5	go to 2	30x
6	72	5 min.
7	12	Neomezeně
8	END	

4. Restrikční štěpení a detekce produktů

Restrikční štěpení:

enzym	
BstU I	60min/60°C

Příprava směsi

komponenta	množství
voda	7,0 µl
NEB pufr 2 (10x)	2,0 µl
enzym BstU I (10 U/µl)	1,0 µl
PCR produkt (100 ng/µl)	10,0 µl
CELKEM	20,0 µl

Elektroforéza:

gel	3,0% agarosa
napětí	80V
proud	max A
čas	80min(+/-)

Hodnocení výsledku:

alela	počet fragmentů	bp
nestandardní homozygot EE	2	136 a 87
heterozygot EK	3	223, 136 a 87
standardní homozygot KK	1	223

5. Další informace

- 1) Pro návrh restrikčního štěpení použity materiály společnosti New England Biolabs, www.neb.com
- 2) Primery objednávat u společnosti Generi-Biotech, www.generi-biotech.com