

IDENTIFICAZIONE DEI POLIMORFISMI Y402H del gene CFH e A69S del gene ARMS2

AMPLI-AMD

Cat. n. 1.299

La degenerazione maculare legata all'età (DMLE o AMD) è una patologia multifattoriale che colpisce la zona centrale della retina, detta macula. È ad andamento progressivo e può portare alla perdita completa ed irreversibile della visione centrale.

Nei paesi industrializzati è la prima causa di ipovisione nei soggetti di età superiore ai 50 anni e presenta una prevalenza stimata intorno al 3% nei soggetti con età > di 65 anni. È quasi sempre bilaterale.

Le cause di questa malattia sono in larga parte ancora sconosciute. Tuttavia in base alle conoscenze scientifiche attuali si possono individuare i seguenti fattori di rischio: 1) Fattori genetici: il 60% delle persone con una degenerazione maculare correlata all'età ha uno o più familiari con una DME; 2) fumo e 3) obesità. L'associazione genetica più forte è stata trovata con i polimorfismi Y402H del gene CFH (Complement factor H) e A69S del gene ARMS2 (Age-Related Maculopathy susceptibility 2).

La ricerca del polimorfismo CFH Y402H viene eseguita previa amplificazione con primers specifici di un frammento di 241 bp, con successivo taglio di restrizione ad opera dell'enzima MluCI. La sostituzione T-C, infatti, causa la perdita di sito di restrizione riconosciuto dall'enzima MluCI. In altri termini il prodotto di amplificazione dell'allele normale è tagliato in 2 frammenti (181 bp e 60 bp), mentre quello dell'allele mutato non è tagliato (241 bp). La ricerca del polimorfismo ARMS2 A69S viene eseguita previa amplificazione con primers specifici di un frammento di 234 bp, con successivo taglio di restrizione ad opera dell'enzima PvuII. La sostituzione G-T, infatti, causa la perdita di sito di restrizione riconosciuto dall'enzima PvuII, in modo tale che il prodotto di amplificazione dell'allele normale è tagliato in 2 frammenti (134 bp e 100 bp), mentre quello dell'allele mutato non è tagliato (234 bp).

Principio del metodo: A) estrazione del DNA genomico B) amplificazione C) digestione enzimatica D) rivelazione sul gel di agarosio.

Applicabilità: Su DNA genomico estratto e purificato da campioni di Sangue Intero.

Numero di Tests: 40.

CONTENUTO DEL KIT E SUA CONSERVAZIONE

AMPLIFICAZIONE e DIGESTIONE

PCR mix CFH Y402H	-20°C
PCR mix ARMS2 A69S	-20°C
H ₂ O sterile	-20°C
Taq Polymerase (5U/μl)	-20°C
Enzima MluCI (10U//μl)	-20°C
Enzima PvuII (10U//μl)	-20°C
BUFFER di digestione 10X	-20°C
Controllo positivo (Omozigote wt CFH Y402H)	-20°C
Controllo positivo (Omozigote wt ARMS2 A69S)	-20°C

Stabilità: superiore a 12 mesi se correttamente conservato.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Il frammento amplificato con la mix ARMS2 ha le dimensioni di 234 bp, mentre il prodotto di amplificazione con la mix CFH Y402H ha le dimensioni di 241 bp. La digestione enzimatica può produrre i seguenti risultati:

ARMS2

OMOZIGOTE GG	ETEROZIGOTE GT	OMOZIGOTE TT
134 bp 100 bp	234 bp 134 bp 100 bp	234 bp

CFH Y402H

OMOZIGOTE TT	ETEROZIGOTE TC	OMOZIGOTE CC
181 bp 60 bp	241 bp 181 bp 60 bp	241 bp

Bibliografia:

Molecular Vision 2011 ; 17 :3574-3582.

J Hum Genet 2007; 52: 384-387.

IOVS 2006; 47, 8: 3242-3246.