



Zdravotně  
sociální fakulta  
Faculty of Health  
and Social Sciences

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice

## Validace metody PCR-RFLP pro stanovení laktóзовé intolerance

# BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

Specializace ve zdravotnictví

**Autor:** Denisa Prosová

**Vedoucí práce:** Mgr. Dagmar Bystřická, PhD.

České Budějovice 2019

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „Validace metody PCR-RFLP pro stanovení laktóзовé intolerance“ jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 3.5.2019

.....

*podpis*

### **Poděkování**

Ráda bych poděkovala své školitelce Mgr. Dagmar Bystřické, PhD. za vstřícnost a rady při vedení bakalářské práce a také za trpělivost. Dále bych ráda poděkovala laborantce slečně Čaloudové v laboratoři GENLABS v Českých Budějovicích, která se mě ujala a mohla jsem díky ní nejen provést práci samotnou, ale vidět i další genetická vyšetření. A největší dík patří mé rodině, která stála při mně a vždy pomohla, když jsem potřebovala studovat a pracovat.

# Validace metody PCR-RFLP pro stanovení laktóзовé intolerance

## Abstrakt

Laktóзовá intolerance je nejběžnější potravinovou intolerancí, vyskytující se celosvětově. Jedinci s laktóзовou intolerancí nedokáží v tenkém střevě tvořit enzym laktázu, který by štěpil laktózu obsaženou v mléce. Existuje několik možností, jak k tomuto postižení dochází.

Praktická část této bakalářské práce je zaměřena na genetický původ laktóзовé intolerance. V evropské populaci se nejčastěji vyskytují dva polymorfismy genu *MCM6*, zásadně ovlivňujícího tvorbu laktázy C/T 13910 a G/A 22018. Principiálně se jedná se o nové mutace v genu, které zajišťují tvorbu enzymu laktázy i v dospělosti.

Cílem práce je vypracovat rešerši vycházející s recentních poznatků publikovaných v odborné literatuře. Kdy budou popsány všechny typy laktóзовé intolerance a možnosti její diagnostiky, dále např. princip alergie, laboratorní metody použité v mé práci, pravidla pro validaci metody apod... Vysvětleny budou také výhody i nevýhody každého testovacího přístupu.

V praktické části je cílem provedení validace genetického testu použitého pro stanovení laktóзовé intolerance a vypracování validačního protokolu, který bude sloužit jako podklad pro mou práci. Genetické vyšetření je založeno na principu PCR RFLP, v rámci metodiky budou popsány laboratorní postupy používané v genetické laboratoři. Výsledkem validace bude zjištění, zda je použitá metoda dostatečně validní pro diagnostiku.

Genetická analýza bude zaměřena na dva vybrané polymorfismy C/T 13910 a G/A 22018. Pro validaci bude použit vzorek se známým genotypem, který byl již dříve ověřen sekvenací.

## Klíčová slova

laktóza; laktáza; alergie; laktóзовá intolerance; PCR; RFLP; validace; polymorfismus C/T 13910 a G/A 22018

## **Validation of PCR-RFLP method for determination of lactose intolerance**

### **Abstract**

The lactose intolerance is the most common food intolerance occurring worldwide. Individuals having the lactose intolerance cannot produce the lactase enzyme in their small intestine. This enzyme is able to digest the lactose contained in milk. There are several ways for this disability.

The practical part of this bachelor thesis is focused on the genetic origin of the lactose intolerance. In the population of Europe we can find as the most frequent the two polymorphisms of the *MCM6* gene that affect the production of lactase C/T13910 and G/A22018. In principle it concerns the new gene mutation which ensures the production of lactase enzyme even in adult age.

The aim of this bachelor thesis is to create the research based on the recent knowledge published in the specialized literature. There are going to be described all types of the lactose intolerance and the ways of its diagnostics, furthermore e.g. the principles of Alenya, the used laboratory methods, the rules of validation methods etc.. The pros and cons of every testing approach will be explained.

The practical part is aiming at the implementation of the validation of the genetics test used for detecting the lactose intolerance and creating the validation protocol that will serve as a base of my bachelor thesis. The genetic check-up is based on the PCR-RFLP principle, within the methodology the laboratory procedures being used in the genetic lab will be described. The validation will flow into a detection if the applied method is sufficiently valid for the diagnostics.

The genetic analysis will focus on the two selected polymorphisms C/T13910 and G/A22018. The sample with a familiar genotype that has already been verified by sequencing will be used for validation.

### **Key words**

lactose; lactase; allergy; intolerance; lactose intolerance; PCR; RFLP; polymorphism C/T13910;G/A22018

## Obsah

ÚVOD .....	8
<b>1 FYZIOLOGIE A ANATOMIE TRÁVICÍHO SYSTÉMU .....</b>	<b>10</b>
1.1 TRÁVENÍ.....	10
1.2 VSTŘEBÁVÁNÍ (RESORPCE) .....	10
1.3 METABOLISMUS .....	11
<b>2 LAKTÓZA .....</b>	<b>11</b>
2.1 LAKTÁZA .....	12
2.2 METABOLISMUS LAKTÓZY .....	13
2.2.1 Glykolýza .....	13
<b>3 ALERGIE VS. INTOLERANCE .....</b>	<b>14</b>
3.1 ALERGIE .....	14
3.1.1 Definice alergie.....	15
3.1.2 Princip alergie.....	15
3.2 INTOLERANCE .....	16
<b>4 LAKTÓZOVÁ INTOLERANCE.....</b>	<b>16</b>
4.1 HISTORIE A EVOLUCE LI .....	17
4.2 PŘÍZNAKY INTOLERANCE .....	18
4.3 GENETICKÉ KÓDOVÁNÍ LAKTÁZY .....	19
<b>5 DIAGNOSTIKA LAKTÓZOVÉ INTOLERANCE .....</b>	<b>21</b>
5.1 LAKTÓZOVÝ TOLERANČNÍ TEST .....	21
5.2 TESTOVÁNÍ KYSELOSTI STOLICE .....	21
5.3 DECHOVÝ TOLERANČNÍ TEST .....	21
5.4 BIOPSIE SLIZNICE TENKÉHO STŘEVA .....	21
5.5 GENETICKÉ TESTOVÁNÍ .....	22
<b>6 PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION) .....</b>	<b>23</b>
6.1 PRINCIP PCR .....	24
<b>7 RFLP .....</b>	<b>25</b>
<b>8 ELEKTROFORÉZA .....</b>	<b>26</b>
<b>9 VALIDACE .....</b>	<b>27</b>
9.1 OPAKOVATELNOST .....	28
9.2 REPRODUKOVATELNOST .....	28

9.3	ROBUSTNOST .....	28
<b>10</b>	<b>CÍLE A HYPOTÉZY .....</b>	<b>29</b>
10.1	CÍL PRÁCE .....	29
10.2	HYPOTÉZA .....	29
<b>11</b>	<b>PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>	<b>30</b>
11.1	IZOLACE DNA .....	30
11.2	IZOLACE DNA Z PERIFERNÍ KRVE .....	31
11.3	IZOLACE DNA Z BUKÁLNÍHO STĚRU .....	32
11.4	MĚŘENÍ KONCENTRACE DNA .....	33
11.5	PŘÍPRAVA A PROVEDENÍ PCR .....	34
11.6	PŘÍPRAVA GELOVÉ ELEKTROFORÉZY .....	37
11.7	RESTRIKČNÍ ŠTĚPENÍ .....	38
<b>12</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>40</b>
12.1	PRVNÍ MĚŘENÍ .....	40
12.2	OPAKOVATELNOST A ROBUSTNOST .....	42
12.2.1	<i>Druhé měření</i> .....	42
<b>13</b>	<b>DISKUSE .....</b>	<b>46</b>
<b>14</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>48</b>
<b>15</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ .....</b>	<b>49</b>
<b>16</b>	<b>PŘÍLOHY .....</b>	<b>54</b>
<b>17</b>	<b>SEZNAM ZKRATEK .....</b>	<b>59</b>

## Úvod

V současnosti se stalo trendem zabývat se tím, co jíme. Nejvíce se řeší, zda potraviny jsou zdravé, nebo nejsou, nebo zda prospívají či škodí našemu tělu. Potravinové intolerance se tak staly nejen propíraným tématem bulvárních článků, ale také tématem diskuzí pacientů, jejich lékařů a tím se samozřejmě dostaly až do laboratoří, kde se tyto nemoci testují.

Laktózovou intolerancí trpí přibližně 70% celosvětové populace a tím se stává nejčastěji vyskytující se intolerancí na světě. Přesto narážíme při zjišťování informovanosti u laické veřejnosti na fakt nesprávné interpretace pojmů intolerance a potravinové alergie. Právě proto jsem zapracovala do své práce pojem alergie a popsala její princip, který se tolik liší od intolerance.

Další problematika spočívá ve výběru správného testování laktózové intolerance. Různé druhy laboratorních testů a jejich výhody a nevýhody jsem se snažila popsat v následujících kapitolách.

Intolerance na mléčný cukr vzniká neschopností organismu člověka tvořit enzym laktázu. Existuje několik možností, proč tělo není schopno tento enzym syntetizovat. Jedná se o primární hypolaktázii u dospělých, která byla původním nastavením organismu u našich předků. Sekundární snížená tvorba laktózy, kdy k postižení dochází po prodělání předešlých onemocnění a nakonec terciální alaktázie, která je velmi vzácná a projeví se již v kojeneckém věku. Právě poslední jmenované postižení může mít nejvíce fatální následky.

Dále jsou v práci vysvětleny použité metody a jejich principy. Genetické testování v laboratořích se rychle vyvíjí a v současnosti je jednou z nejvýznamnějších cest, kudy se medicínská diagnostika bude s velkou pravděpodobností ubírat. Spoustu nemocí již známe a jsme schopni je vyléčit, ale genetická postižení stále čekají na svá odhalení a některá dokonce na možnosti léčby.

Každá metoda, která se zavádí do provozu v klinických laboratořích, musí projít validací. Výstupem validace je validační protokol, který se stává součástí laboratorních dokumentů. Cílem validace je zjištění, zda vůbec metoda funguje a zda funguje při malých odchylkách,



které se vyskytují v běžném provozu, při použití specifických reagensů, při provádění jinou osobou nebo v jiný den.

# 1 Fyziologie a anatomie trávicího systému

Trávicí systém člověka je důležitý pro metabolismus a ten pro zachování jeho existence. Lidské tělo musí přijímat potravu z okolí a následně ji zpracovat v trávicím systému pomocí mechanických a chemických procesů. Z potravy člověk získává základní živiny pro stavbu a chod organismu. První ze základních funkcí trávicího systému je trávení, které se skládá z mechanické a chemické složky. (Dylevský, 2000)

## 1.1 Trávení

Mechanické zpracování potravy začíná již v dutině ústní, která je společně s chrupem prvním oddílem trávicího traktu. Zde je sousto rozmělněno a je posouváno jazykem do hltanu až k jícnu. To jsou trubicovité části trávicího systému. Následuje žaludek, který potravu promíchává s enzymy pomocí pohybů stěn. Trávicí trakt končí dlouhým úsekem střev. Střevo se dělí na tenké a tlusté. Každé z nich má mechanickou funkci, kdy posouvuje tráveninu až ke konečníku, kde jsou nestrávené a nepotřebné zbytky vyloučeny. (Dylevský, 2000; Silbernagl a Despopoulos, 2004)

Chemické zpracování potravy je závislé především na enzymech, které produkují žlázy trávicího systému společně s vodou. Vše opět začíná již v dutině ústní, kde se sousto mísí se slinami, které jsou do úst produkovány pomocí slinných žláz. Dalším orgánem trávicí soustavy, který produkuje tzv. trávicí šťávy, je žaludek. Následuje znovu tenké střevo, které samotné produkuje řadu enzymů, ale navíc do jeho části zvané duodenum proudí enzymy tvořené játry a slinivkou břišní. (Dylevský, 2000; Koolman a Röhm, 2012)

## 1.2 Vstřebávání (resorpce)

Resorpce látek, které byly zpracovány trávením, je nedílnou a podstatnou součástí funkcí trávicího systému. Rychlost vstřebávání látek je relativní člověk od člověka. Další závislost vyplývá ze skladby potravy. Některé látky jako tuky a bílkoviny jsou tráveny hodiny a některé látky (např.: alkohol) mohou být vstřebány prakticky okamžitě. Avšak podle mechanismu resorpce je možné rozdělit vstřebávání na dva druhy: aktivní a pasivní. Správné vstřebávání je též závislé na správné spolupráci trávicího a cévního i mízního systému. Všechny orgány trávicího traktu jsou silně zásobeny krví a opleteny krevními a mízními cévami. (Dylevský, 2000; Silbernagl a Despopoulos, 2004)

Aktivní resorpce probíhá především v tenkém střevě, kde buňky na povrchu stěny tzv. epitelální buňky řídí aktivně transport látek z dutiny střeva do cév. (Dylevský, 2000; Silbernagl a Despopoulos, 2004)

Pasivní vstřebávání je založeno na resorpci vodných roztoků. Například v žaludku se za pomoci smísení vody, enzymů a rozmělněné potravy začínají vstřebávat hlavně soli, léky a výše zmiňovaný alkohol. (Dylevský, 2000; Silbernagl a Despopoulos, 2004)

### **1.3 Metabolismus**

Jde o soubor anabolických, katabolických a amfibolických reakcí. Katabolické a anabolické procesy probíhají současně. Metabolismus se řídí podle potřeby a stavu organismu. Katabolismus je rozklad látek ze složitějších na jednodušší a při tomto procesu se energie uvolňuje a tělo ji čerpá. Příkladem jsou bílkoviny, kdy se proteiny rozkládají až na své základní stavební jednotky a těmi jsou aminokyseliny. Při anabolických reakcích se z jednoduchých látek stávají složitější a organismus musí na tento proces energii uvolnit. Například pokud organismus vyžaduje škrob, tak se z jednoduchých sacharidů začnou tvořit polysacharidy. (Dylevský, 2000; Silbernagl a Despopoulos, 2004; Špička, 2004)

Metabolismus se skládá z množství tzv. metabolických drah, kterými udržuje volný tok energie. Do těchto drah vstupují látky, které se za pomoci enzymů metabolizují na určité produkty (meziprodukty). Metabolické dráhy jsou nevratné. Pokud se látky mezi sebou mají dát metabolizovat, je potřeba, aby dráha od látky A k látce B byla jiná než dráha opačná tj. od B k A. (Dylevský, 2000; Silbernagl a Despopoulos, 2004; Špička, 2004)

Z předchozích odstavců je jasné, že pro přežití je nutná přítomnost rozličných enzymů. Právě trávení a metabolismus laktózy je v případě laktózové intolerance narušen. Organismus pacienta, který trpí právě intolerancí, není schopen zpracovat laktózu pomocí enzymu laktázy. (Dylevský, 2000; Silbernagl a Despopoulos, 2004; Stráský a Ryšavá, 2014)

## **2 Laktóza**

Neboli mléčný cukr je disacharid, který se skládá ze dvou monosacharidů - glukózy a galaktózy. Přesněji  $\beta$ -D-galaktopyranózy a D-glukopyranózy spojených beta-1,4 glykosidickou vazbou. (Kalač, 2001) Kdybychom dali na rozbor mléka všech savců, zjistíme,

že se laktóza nachází ve všech, s rozdílem v koncentraci. V kravském mléce je obsah laktózy kolem 4,5g / 100ml. U zakysaných produktů koncentrace mléčného cukru klesá. Toto tvrzení však nemusí u jogurtů platit vždy, protože bývají velmi často zahušťovány sušeným mlékem, které opět zvyšuje koncentraci laktózy. A jako každý cukr, tak i laktóza má sladkou chuť. Její sladivost je však daleko nižší než u používaných sladidel. (Stráský a Ryšavá, 2014)

Tab. I - Obsah laktózy v běžných mléčných výrobcích (zdroj: Stráský a Ryšavá, 2014)

Výrobek	Obsah laktózy (g/100g)	Velikost porce (g)	Obsah laktózy v porci (g)
Plnotučné mléko	4,7	250	11,8
Odstředěné mléko	4,9	250	12,3
Šlehačka	3,1	15	0,5
Smetana do kávy	3,8	15	0,6
Jogurt	4,1	150	6,2
Jogurt ovocný	3,0	150	4,5
Kefir	3,8	200	7,6
Zmrzlina	6,0	50-100	3-6
Cottage	2,2	100	2,2
Tvaroh měkký	3,5	100	3,5
Tvrdý sýr	0,0	50-100	0,0
Máslo	0,7	10	0,07

Tab. II - Porovnání sladivosti cukrů (zdroj: Schaafsma, 2008).

<b>Laktóza</b>	0,2 - 0,4
<b>Glukóza</b>	0,6 - 0,7
<b>Fruktóza</b>	1,3
<b>Sacharóza</b>	1
<b>Maltóza</b>	0,4 - 0,5
<b>Galaktóza</b>	0,5 - 0,7

## 2.1 Laktáza

V lidských enterocytech se tvoří enzym zvaný laktáza. Tento enzym z biochemické podstaty patří do třetí skupiny- hydroláz. Tyto enzymy štěpí různé chemické vazby za účasti vody. Voda je zde katalyzátorem, který podporuje štěpení. (Špička, 2004)

Enzym laktáza je obsažen v kartáčovém lemu tenkého střeva. Podle výzkumu bylo zjištěno, že největší produkce hydrolázy probíhá v lačníku. Je to nejspíš proto, že právě zde se

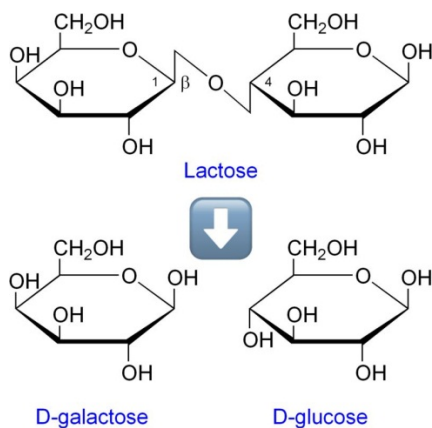
nenachází takové množství bakterií a proto mléčný cukr není zkvašen. (Di Rienzo et al., 2013; Misselwitz et al., 2014; Madry et al., 2010)

Nejvyšší koncentrace laktázy běžně nastává u člověka po porodu po dovršení prvních třech měsíců, kdy je právě mléko od matky jedinou potravou, kterou může dítě přijímat. Tato koncentrace se v těle intolerantního člověka postupně snižuje. Do období puberty je pokles velmi pomalý, avšak v období dospívání rapidně klesá. (Solomons, 2002; Stráský a Ryšavá, 2014)

## 2.2 *Metabolismus laktózy*

Trávení laktózy probíhá v tenkém střevě, kde u tolerantního jedince bude působit enzym zvaný laktáza. Tento enzym se sekretuje v kartáčovém lemu tenkého střeva, kde se disacharid laktóza štěpí na monosacharidové jednotky- glukózu a galaktózu. Následující metabolismus již probíhá pro každý monosacharid zvlášť po tom, co jej erytrocyty přenesou do krevního řečiště. (Silberagl a Despopoulos, 2004; Stráský a Ryšavá, 2014)

Obr. I: Laktóza a její hydrolýza (zdroj: vlastní)

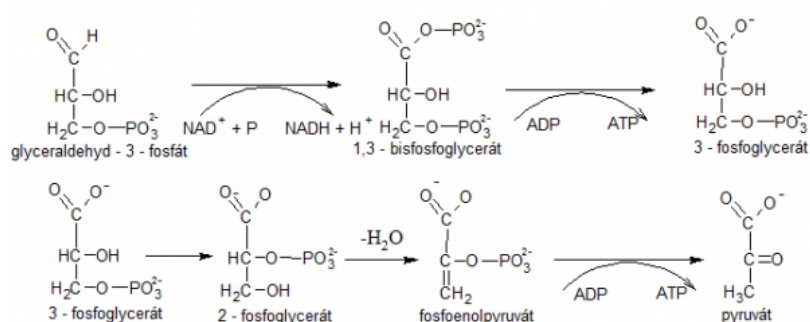


### 2.2.1 *Glykolýza*

Glykolýza je jedním z nejdůležitějších procesů v lidském organismu. Při rozkladu glukózy vznikají molekuly ATP, které jsou energií pro další anabolické děje. Například mozek je schopen získávat energii pouze z rozkladu glukózy. Ke glykolýze dochází v cytosolu buněk, kde jsou přítomny potřebné enzymy. (Špička, 2004)

Při glykolýze se přeměňuje glukóza až na pyruvát za uvolnění energie. Zajímavé je, že při počátečních reakcích glykolýzy se ATP spotřebovává a až v následujících reakcích jej organismus získává zpět. Při konečném součtu vychází, že z jednoho molu glukózy vznikají 2 moly ATP. (Špička, 2014)

Obr. II: Glykolýza (zdroj: Špička, 2004).



### 3 Alergie vs. intolerance

Alergie a intolerance jsou dvě různá onemocnění a laickou veřejností bývají tyto termíny často zaměňovány. Především intolerance je zaměňována za alergie. Tudíž je vhodné připomenout si rozdíly. (Kratěnová, 2012)

#### 3.1 Alergie

Termín alergie poprvé použil vědec Clemens von Pirquet roku 1906. V dnešní době je toto slovo již dobře známé a dalo by se říci, že je nadužívané. Pokud sledujeme televizi, internet, nebo čteme různé moderní časopisy, zjistíme, že téma alergie je skloňováno opravdu všude kolem nás. Obecně se tvrdí, že každý třetí člověk trpí jistým druhem alergie. Podle statistik SZÚ se prevalence alergie pohybuje kolem 30% a má stoupající tendenci. (Kratěnová, 2012)

Dítě, které se narodí rodičům s alergií, má šanci na rozvinutí alergie 50-90% v závislosti na tom, zda je pouze jeden z rodičů alergik, nebo jsou alergičtí oba rodiče. Přitom není jisté, že potomek bude mít alergii stejného druhu. (Kratěnová, 2012)

V mezinárodní terminologii imunologie a především alergie se donedávna málokdo mohl vyznat a to působilo problémy v oblasti výzkumu a objasnění onemocnění. Proto se

společnost evropských alergologů rozhodla zavést přesné termíny pro alergii, přecitlivělost i intoleranci. (Pavelková, 2015)

### 3.1.1 *Definice alergie*

Chorobný stav vyvolaný alergenem nebo také nepřiměřená odpověď imunitního systému na alergen. Obě tyto definice nám říkají totéž a to, že náš imunitní systém se po setkání s běžnou látkou, která v životě zdravých lidí nehraje žádnou roli, reaguje vyvoláním zánětlivé reakce. (Bartůňková, Hořejší a spol., 2013)

Alergen je synonymem pro slovo antigen, avšak používá se pouze pro alergické reakce. Alergenem se stává jakákoli látka, která dokáže vyvolat nepřiměřenou reakci v nízkých a život běžně neohrožujících koncentracích. Často se jedná o látky bílkovinné povahy, ale nemusí to být pravidlem. Pro každého jedince to může být naprosto ojedinělá věc. Pro jednoho člověka jsou to pyly, pro druhého roztoči a pro dalšího například určitá přísada v pracím prášku. Některé látky se stanou alergeny až v případě, že se navážou na bílkovinu přímo v organismu. Tyto nazýváme hapteny. (Bartůňková, Hořejší a spol., 2013)

### 3.1.2 *Princip alergie*

Musíme si uvědomit, že alergie se rozvíjí ve fázích. V té první alergen proniká do těla na tkáň či sliznice. Zde se setkává s antigen prezentujícími buňkami imunitního systému. Nejčastěji se jedná o dendritické buňky, které předkládají alergen T-lymfocytům třídy Th2. Tyto buňky začnou produkovat cytokiny, interleukin-4 a interleukin-5. Pod jejich působením nastane u B-lymfocytů sekrece imunoglobulinu třídy E. Tyto protilátky se naváží na povrch dalších buněk imunitního systému. Jsou jimi basofilní granulocyty a žírné buňky. Pokud se organismus opětovně setká s alergenem, dochází k agregaci receptorů na povrchu těchto buněk a ty začnou uvolňovat látky, které jsou pro alergickou reakci typické (především histamin, heparin, prostagliny, leukotrieny a další). (Bartůňková, Hořejší a spol., 2013)

Dále je nutné vzít v potaz, že alergie se projevuje buďto lokálně, nebo se může rozvinout v anafylaktický šok. Lokálními projevy jsou rutinně známé senné rýmy, slzení očí, kýchání, vyrážky a jiné. Anafylaktický šok se rozvine po proniknutí alergenu do krevního oběhu, kde dochází k rozpadu bazofilních granulocytů a mastocytů. Z těchto buněk se uvolňují látky, které zvýší propustnost cév a tím pokles tlaku. Rizika velmi nízkého tlaku jsou život

ohrožující otoky plic, ischemie mozku a další selhání orgánů v těle. (Bartůňková, Hořejší a spol., 2013)

### **3.2 Intolerance**

Intolerance je pojmem, který bývá s alergií často zaměňován. Nejčastěji se pojem intolerance spojuje právě s potravinami. Toto onemocnění má ale úplně jiný princip. Nejde už o imunologickou reakci, kterou zprostředkovává imunitní systém člověka, ale v některých případech o funkční chybu, která je kódována již v genomu člověka. (Pavelková, 2015)

Intolerance vzniká tím, že pro určitou látku, která je v potravě přijímána, není organismus schopný vytvořit enzym, který by ji rozštěpil/zpracoval a následně využil jako například laktózu. (Pavelková, 2015)

## **4 Laktózová intolerance**

Laktózově intolerantní lidé jsou jedinci, u kterých se v organismu tvoří malé nebo žádné množství laktázy, která je potřebná pro štěpení glykosidické vazby mezi glukózou a galaktózou. Známe tři možnosti, kdy organismus netráví laktózu. V angličtině zvaný typ primary adult hypolactasia, což bylo původní nastavení organismu. Enzym se tvoří pouze v období kojení a během dospívání vymizí. (Enattah et al., 2008) Sekundární, nebo-li získaná snížená tvorba laktázy, kdy povrch tenkého střeva a tím sekreci enzymu do lumen poškodí předešlé onemocnění (např.: onkologické, Crohnova choroba...). (Madry et al., 2010) Terciální, vrozená, alaktázie je vzácná, ale přesto se vyskytuje. Kojenec není schopný od narození přijímat mléko s obsahem laktózy. Jedná se o velmi nebezpečný jev. Pokud dítě nedostane potravu bez laktózy, dochází k prudkým průjmům, ztrátě hmotnosti a malnutrici, až nakonec může dojít k úmrtí. (Fojtík et al., 2013; Kuokkanen et al., 2005)

Je velice důležité, abychom rozlišovali laktózovou intoleranci od alergie na mléko. Přesněji bychom spíše měli použít označení alergie na mléčné bílkoviny. Jedná se především o komplex kaseinů a syrovátkových proteinů. Jak je z názvu již patrné, tak se jedná o alergii, které mají jiný mechanismus a jinou podstatu, než laktózová intolerance. Dalšími postiženími gastrointestinálního traktu, která se projevují podobnými symptomy, jsou Crohnova choroba, celiakie a alergie na další komponenty obsažené v mléce. Všechna tato onemocnění je třeba



vyšetřit v biochemických, imunologických a genetických laboratořích a odlišit je od sebe. (Stránský a Ryšavá, 2014)

#### **4.1 Historie a evoluce LI**

Pokud se ohlédneme do historie, vidíme, že laktózová intolerance byla původním nastavením organismu. Člověk v dávné minulosti pil mléko pouze od matky v kojeneckém období. Jako dospělý či dospívající tuto možnost již neměl a tudíž nebylo zapotřebí, aby tělo tvořilo laktázu, která by mléčný cukr štěpila. S postupnou domestikací a chovem domácích zvířat (krav, koz a ovcí) člověk začal požívat jejich mléko a následně i produkty vyráběné z mléka. Tento nápoj je bohatý na živiny a minerály. Například při morových ranách cholery bylo mléko vhodným nápojem pro nemocné. Lidem rychle dodalo energii a živiny, které společně s akutními průjmy odcházely z těla. (Holden, Mace et al., 1997)

Nyní ale narážíme na fakt, že rozložení intolerance laktózy je ve světě nerovnoměrné. Na Africkém a Asijském kontinentu tento trend přetrvává. Výskyt intolerance na laktózu je zde v prevalenci 80-100%, avšak na severu Amerického kontinentu (bílá rasa) se její prevalence snižuje na 15% a v severských zemích Evropy tyto procenta dále klesají a jejich rozptyl je pouze 5- 0,5%. (Stránský a Ryšavá, 2014)

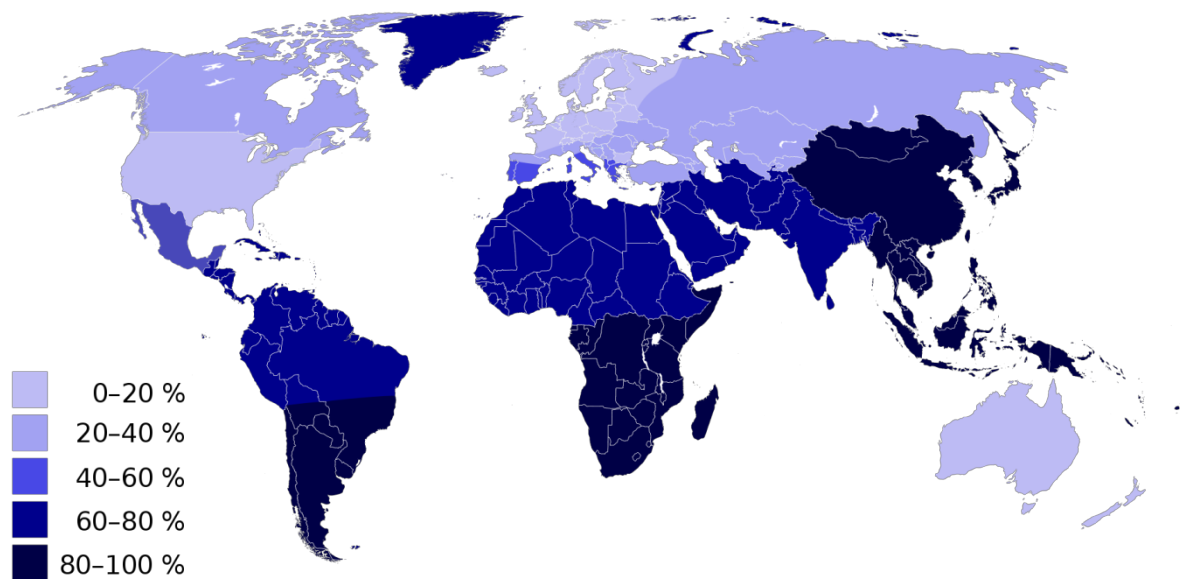
Jedna z teorií hovoří o možném vlivu slunečního záření v korelaci s aktivací vitamínu D. V okolí rovníku žijí lidé pod neustálým vlivem slunečního záření, které dopadá na pokožku a aktivuje v ní vitamin D, který má za následek větší vstřebávání vápníku. Není tudíž zapotřebí, aby byl vápník navíc dodáván i v mléce. Vápník, přirozeně obsažený v potravě a vznikající vlivem slunečního záření, zajišťuje optimální rovnováhu. V severských zemích je však slunečního svitu daleko méně. Aktivace vitamínu D je daleko menší a efektivita vstřebávání vápníku z potravy je daleko nižší. Proto může být tento prvek, pro tělo nezbytný, dodáván jinými způsoby. A právě mléko je bohatým zdrojem vápníku. (Holden a Mace, 1997)

Další skupina vědců hovoří o možném vlivu vysoké výživnosti mléka. V dobách, kdy se lidé o potravu doslova rvali, aby přežili, se mléčné výrobky staly součástí jídelníčku. Kalorické hodnoty sýrů jsou velmi vysoké. Navíc nebylo zapotřebí zvíře usmrtit a výrobky z mléka sytily kmeny po delší dobu než jedna zabitá kráva. Již při konzumaci sýrů se musela začít lidem tvořit laktáza v tenkém střevě. Ovšem zrání sýrů trvá nějakou dobu a možná právě

v období obzvláště krutých zim (především v severských oblastech) a s nimi spojenými hladomory se lidé rozhodli pít mléko přímo bez zpracování. To nejspíš vedlo k rozvoji laktóзовé tolerance. Organismus severských obyvatel se postupně přizpůsobil novým možnostem ve stravování a došlo k následné mutaci v jejich genomu. (Holden a Mace, 1997)

Z tohoto všeho opět vyplývá, že laktóзовá intolerance byla původním nastavením organismu. Tolerance laktózy je výsledkem mutace v genomu člověka. (Swallow, 2003)

Obr. III: Výskyt intolerance podle zemí (zdroj: Zenz, 2010)



#### 4.2 Příznaky intolerance

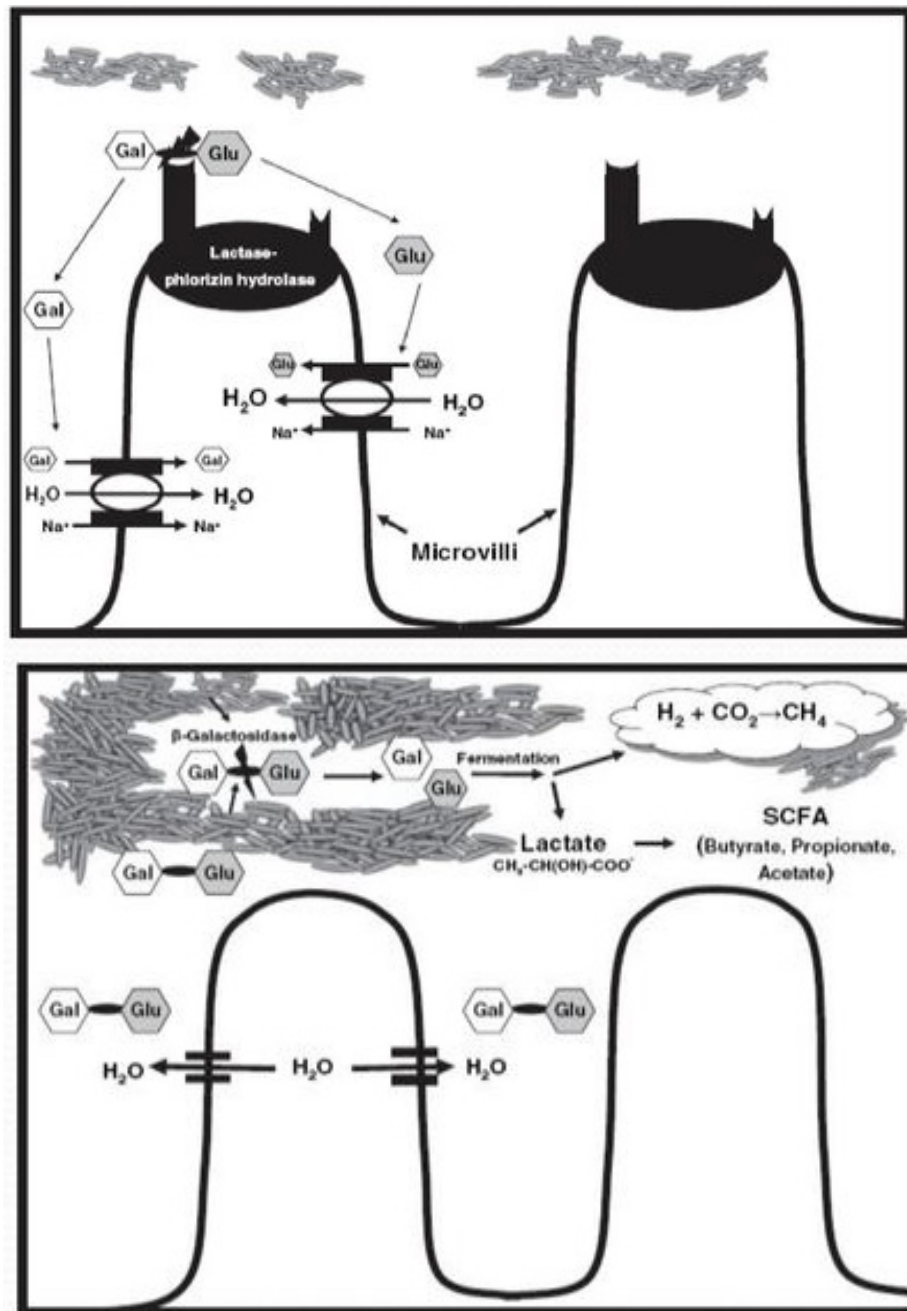
Pokud laktáza v tenkém střevě laktózu nerozštěpí, prochází až do tlustého střeva, kde ji začnou metabolizovat hnilobné bakterie za přísunu vody do lumen. (Matthews et al., 2005)

Produkty právě jejich metabolismu způsobují nepříjemné obtíže, které se projevují jako:

- plynatost
- křečovitě bolesti břicha (kolika)
- nadýmání
- průjmy
- zvracení

Závažnost a přetrvávání příznaků je závislé na množství zkonsumované laktózy a na tom, kolik enzymu laktázy je organismus schopný vytvářet. (Matthews et al., 2005)

Obr IV: Názorná ukázka tenkého střeva při laktóзовé toleranci a intoleranci (zdroj: Lomer et al., 2007)

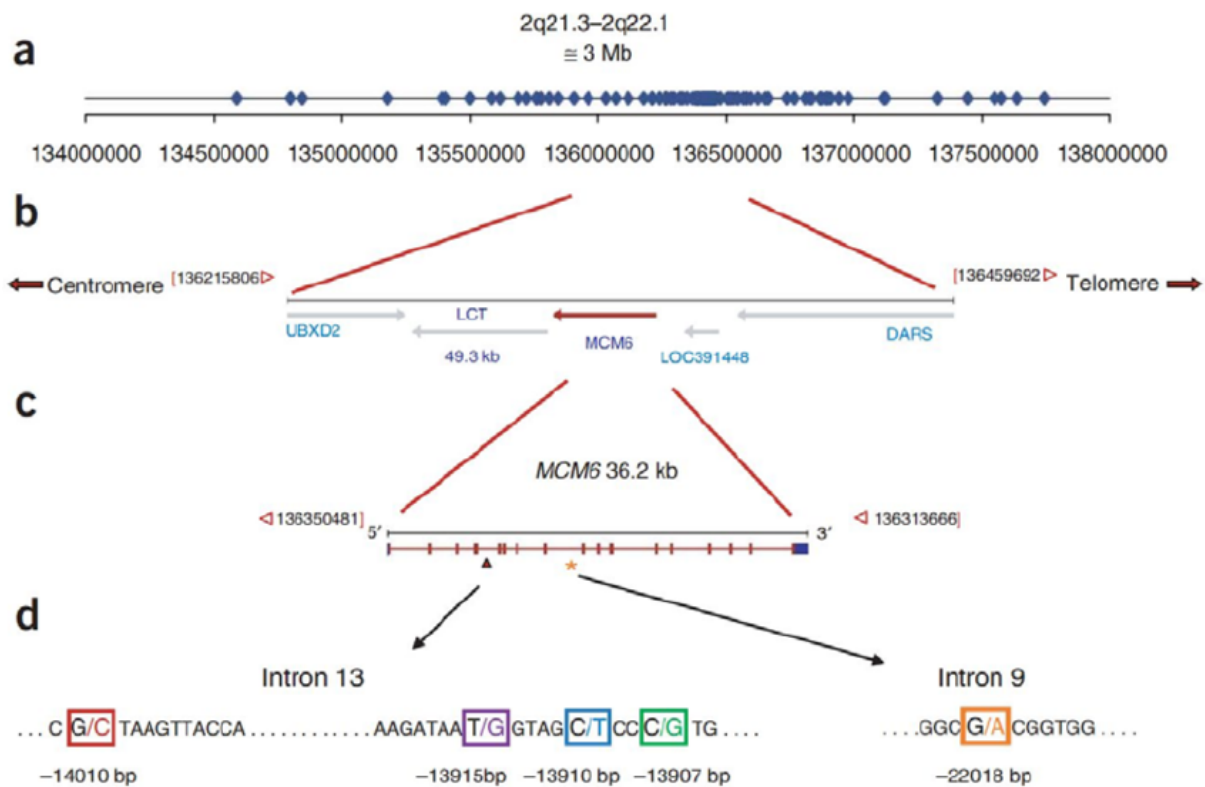


### 4.3 Genetické kódování laktázy

Laktóзовá intolerance je geneticky podmíněné onemocnění. Gen kódující tvorbu laktázy se nazývá *LCT*. Gen *LCT* o velikosti asi 20 kb se nachází na 2. chromozomu na delším rameni q.(Enattah et al., 2002; Madry et al., 2010) Přesné označení lokace je 2q21.3. Bohužel po sekvenování tohoto genu nebylo nalezeno žádné přímé pojitko mezi intolerancí a *LCT* genem. (Harvey et al., 1996)

Ovšem před tímto genem leží jiný gen. *MCM6*, který má úlohu promotoru a řídí transkripci tohoto genu. Tento gen se skládá ze 17 exonů a právě zde byla zjištěna dvě polymorfnní místa na intronech 13 a 9. Tyto lokusy hrají důležitou roli při regulaci exprese genu *LCT*. Na intronu 13 je umístěn polymorfismus C/T-13910 a na intronu 9 leží polymorfismus G/A-22018. Jedná se o jednonukleotidové polymorfismy. Jedna báze je zaměněna při transkripci za jinou. V těchto případech se jedná o záměnu C (cytosin)/ T (thymin) a G (guanin)/A (adenin). (Enattah et al., 2002)

Obr. V: Mapa *LCT* a *MCM6* genu (zdroj: Tishkoff et al., 2007)



## **5 Diagnostika laktóзовé intolerance**

V dnešní době je možné pacienta s podezřením na laktóзовou intoleranci vyšetřit několika způsoby. Některé metody jsou méně invazivní a jiné více. Podle toho mohou způsobit člověku nepříjemné potíže spojené právě s tímto postižením nebo jej mohou ušetřit nepříjemných projevů. Záleží proto čistě na pacientovi a lékaři, který z těchto testů si vybere. (Fojík et al, 2013)

### **5.1 Laktóзовý toleranční test**

Častým testem, který se využívá pro stanovení laktóзовé tolerance/intolerance, je postaven na biochemickém základě. Pacient dostane k vypití roztok půl litru vody obsahující 50g laktóзы a následně je měřena glykémie po 15, 30, 60 a 90 minutách. Pokud glykémie nevzroste alespoň o 1 mmol/l, má se za to, že je jedinec intolerantní, jelikož není schopen trávit laktóзу. Před testem by pacient neměl jíst a pít alespoň 8 hodin, z důvodu možnosti ovlivnění výsledků. Tento test není vhodný pro novorozence a kojence. (Fojík et al., 2013; Misselwitz et al., 2014)

### **5.2 Testování kyselosti stolice**

Testem, který je vhodný pro novorozené děti a kojence pro svou nízkou invazivitu a omezené možnosti je test na kyselost stolice. Dětem je podáno běžné „laktóзовé“ mléko, které u intolerantních dětí projde do tlustého střeva, kde vykvasí za pomoci enterobakterií a vzniknou kyseliny, které lze detekovat ve stolici - pH klesá pod 6. (Martini,Savaiano et al., 1988)

### **5.3 Dechový toleranční test**

Při tomto testování se měří koncentrace vydechovaného vodíku a oxidu uhličitého a metanu. Pokud totiž laktóза není rozložena ihned v tenkém střevě a dostává se do tlustého střeva, hnilobné bakterie začnou cukr rozkládat a vylučovat právě tyto plyny. (Mattar et al., 2012) V dnešní době je možné bez problémů zakoupit komerční sady pro tento test téměř v jakékoli lékárně. Nevýhodou testu je jeho falešná pozitivita u pacientů, který mají ve střevě větší množství enterobakterií. (Fojík et al., 2013)

### **5.4 Biopsie sliznice tenkého střeva**

Principem této metody je odběr tkáně tenkého střeva postiženého člověka, ve které se prokazuje aktivita enzymu laktázy. Obvykle se jedná o jednu z nejprůkaznějších metod. Samozřejmě i tato metoda má svá úskalí. Pacienti často nechtějí podstupovat biopsii, jelikož

je to invazivní zákrok. Navíc tato metoda může být opět falešně pozitivní. Záleží na odběru tkáně. Může se stát, že chirurg odebere tkáň, která právě není schopná produkovat enzym. (Swallow, 2003)

### 5.5 *Genetické testování*

Nejbezpečnějším testováním je proto genetický průkaz, který nám s velkou přesností stanoví, zda se v DNA jedince nachází gen pro tvorbu laktázy i v dospělosti. Navíc pacient je ušetřen nepříjemných projevů vyplývajících z ostatních testovacích přístupů. (Mattar et al., 2012)

Při vyšetření 13910 CT se setkáváme s třemi referenčními hodnotami:

- CC – wild type (nemutovaný homozygot)
- CT – heterozygot
- TT – mutovaný homozygot

Wild type je označení nemutovaného homozygota. Jedná se o původní nastavení genů. Jedinec, kterému vyjde při vyšetření tato hodnota, je typicky silně laktózově intolerantní stejně jako naši předci. Jedinec s referenční hodnotou CT je heterozygotní. To znamená, že zdědil od jednoho z rodičů gen pro intoleranci a od druhého zmutovaný gen, který podporuje tvorbu laktázy i v dospělosti. Tento člověk může mít občasné příznaky intolerance. Vše záleží na klinickém projevu. Enzym se u něj může tvořit, ale záleží v jak velkém množství. A poslední hodnotou je TT, kdy pacient má zmutované obě alely, a proto je jeho organismus i v dospělosti schopný tvořit enzym laktázu. (Rasinperä et al., 2004)

Druhým nejčastěji se vyskytujícím se polymorfismem je G/A-22018, který je v segregaci s C/T- 13910. Zde se jedná o záměnu báze guaninu za adenin. (Rasinperä et al., 2004)

Při vyšetření polymorfismu 22018 GA dostáváme obdobné referenční hodnoty:

- GG – wild type
- GA – heterozygot
- AA – mutovaný homozygot

Wild type je označení nemutovaného homozygota. Jedná se o původní nastavení genů. Jedinec, kterému vyjde při vyšetření tato hodnota, je typicky silně laktózově intolerantní

stejně jako naši předci. Jedinec s referenční hodnotou GA je heterozygotní. To znamená, že zdědil od jednoho z rodičů gen pro intoleranci a od druhého zmutovaný gen, který podporuje tvorbu laktázy i v dospělosti. Tento člověk může mít občasné příznaky intolerance. Vše záleží na klinickém projevu. Enzym se u něj může tvořit, ale záleží v jakém množství. A poslední hodnotou je AA, kdy pacient má zmutovaná obě alely, a proto je jeho organismus i v dospělosti schopný tvořit enzym laktázu. (Raspierä et al, 2004)

Samozřejmě při studiích byly zjištěny další souvislosti a další polymorfismy. U polymorfismu C/T-13910, který se dlouho dobu považoval za jediný polymorfismus, se zjistilo, že jej lze nalézt především u evropské populace a naopak u africké populace a národností na blízkém východě jej nalézáme sporadicky. Právě to vedlo genetiky k dalšímu zkoumání a přivedlo je na myšlenku dalších polymorfismů - G/C-14010, T/G-13915 a C/G-13907. Všechny tři polymorfismy se nacházejí poblíž prvního popsaného C/T-13910. Polymorfismus T/G-13915 se nejčastěji nachází u arabské populace a zbývající dva polymorfismy G/C-14010 a C/G-13907 můžeme naopak pozorovat spíše na africkém kontinentu. (Ranciaro et al., 2014)

Polymorfismus G/A-22018 je spojován především s polymorfismem C/T-13910. Jeho výskyt s ním přímo souvisí. Samostatně nemá žádný velký vliv na exprese genu *LCT*. (Rasinperä et al., 2011)

## **6 PCR (Polymerase chain reaction)**

Pod zkratkou PCR se v češtině skrývá polymerázová řetězová reakce. V minulosti se pro namnožení DNA používaly metody klonování v bakteriích. Ty však neměly nikdy zaručenou úspěšnost a výsledná koncentrace nemusela být dostačující pro následná vyšetření. K PCR není zapotřebí mít vysokou koncentraci původní DNA na začátku, avšak zaručuje velké zmnožení DNA po ukončení reakce. Jedná se o metodu, která probíhá *in vitro*. Při metodě PCR je přesně určeno, který úsek DNA má být namnožen pomocí výběru specifických primerů. PCR probíhá v přístroji zvaném thermocycler. Během amplifikace roste koncentrace specifického úseku DNA geometrickou řadou. V thermocycleru dochází ke změnám teplot, které jsou potřebné pro vždy probíhající reakci. (Snustad et al., 2009; Šmarda, 2005)

## 6.1 *Princip PCR*

Na začátku každé amplifikace DNA je nutné si namíchat tzv. mastermix, což je reakční roztok používaný pro její správný průběh. Jde o směs izolované DNA, primerů, pufru, DNA polymerázy, DMSO a vody. V každé laboratoři je postup jiný a často veřejně nepřístupný. Pokud laboratoř nevyužívá přímo komerční sady pro diagnostiku laktóзовé intolerance, stojí před zavedením „in house“ postupu spočívajícího v optimalizaci metody, který může být pracný i časově náročný. (Brdička, 2007)

Jednou z nejdůležitějších složek mastermixu jsou primery. Jedná se o přesně danou sekvenci nukleotidů, které dokáží ohraničit začátek a konec úseku DNA, který chceme namnožit. Z toho vyplývá, že pro každé vyšetření je potřeba jiná sada primerů. Pro alelově specifickou PCR je běžné, že jeden typ primeru, forward, označuje začátek úseku a druhý, reverse, označuje konec amplifikovaného úseku. (Ruml et al., 2002)

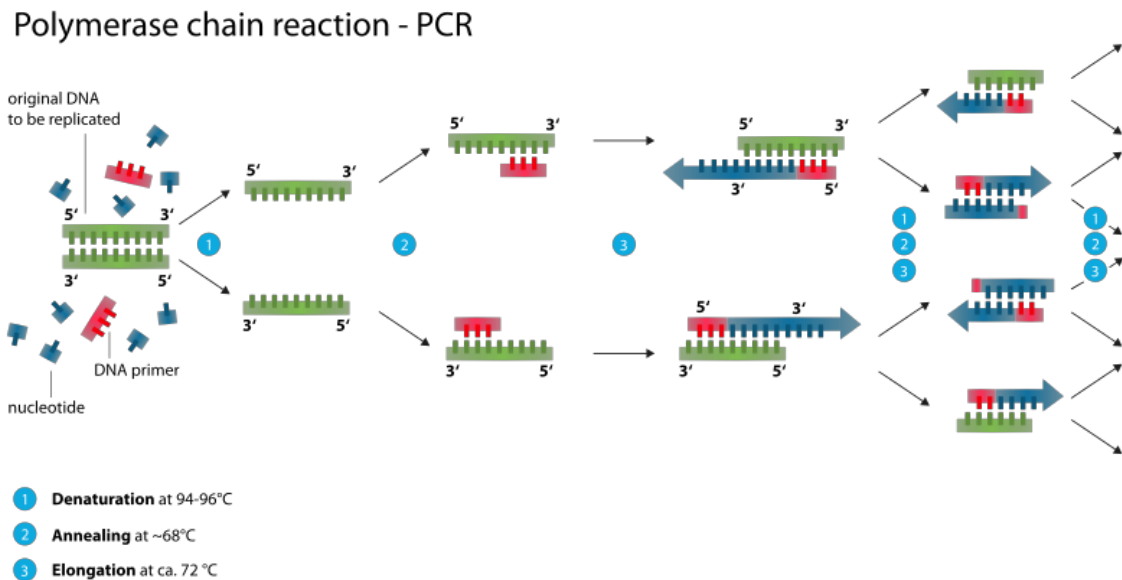
Další velmi zajímavou a nedílnou součástí PCR reakce je DNA polymeráza a DMSO, které jsou schopny k templátovému vlákně nasynetizovat nové vlákno na principu komplementarity bazí a denaturovanou DNA opět spojit. (Ruml et al., 2002)

Samotným principem PCR je střídání teplot, kdy nejprve dochází k denuraci (rozpletení) vláken DNA. Dvě vlákna ve dvoušroubovici DNA jsou spojena mnoha vodíkovými můstky. Tato chemická vazba není příliš silná, přesto velký počet těchto můstků zaručuje pevnost a soudržnost mezi vlákny. Proto aby došlo k narušení těchto můstků, vyvine thermocycler teplotu kolem 95°C. Vlákna DNA se oddělí. V odborné literatuře se tento děj popisuje tak, že z dsDNA (dvouvláknové DNA) vzniknou ssDNA (jednovláknové DNA). Následuje nasednutí primerů. Pro označení začátku úseku nasedne na vlákno forward primer a na konec nasedá reverse primer. Tento děj se odborně nazývá annealing a probíhá pouze za určité teploty. Každý primer má svou přesnou anealingovou teplotu, ale obvykle se jedná o teploty mezi 50-60°C a nasednutí trvá kolem 15 sekund. Poté se na primery naváže DNA polymeráza a pokud jsou v reakčním roztoku volné nukleotidy, začnou nasedat na základě komplementarity bazí k templátovému vlákně. Tvorba nového vlákna probíhá stejně jako v organismu od 3' konce ke 5' konci, jedná se o tzv. elongaci. Teplota v termocycleru je v tuto chvíli nastavena v rozmezí 70-80°C. Jak již bylo zmíněno, tak během PCR narůstá počet DNA fragmentů geometrickou řadou. Tento postup se cyklicky opakuje. Nejčastěji probíhá 30 – 40 cyklů



zahrnujících tři kroky, denuraci, anealing a elongaci. (Ruml et al., 2002; Snustad a Simmons, 2009)

Obr. VI: Schématický nákres cyklu PCR (Zdroj: Enzoklop, 2014)

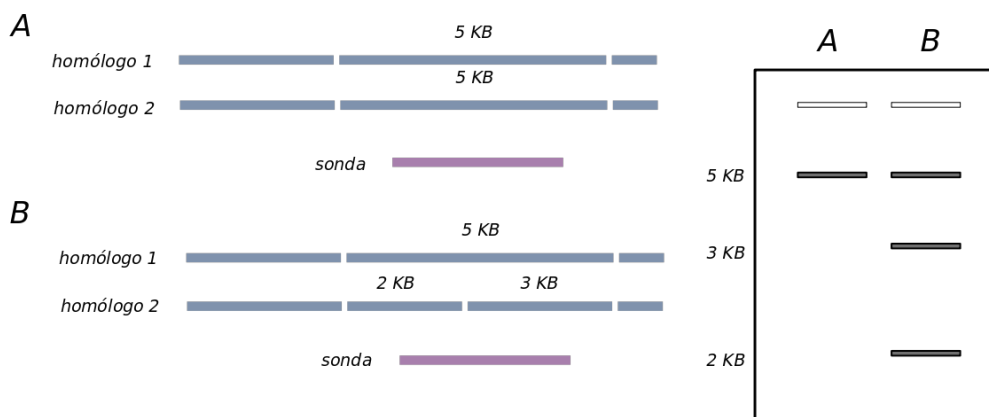


## 7 RFLP

Restrikční analýza patří mezi nejstarší metody používané pro genetická molekulární vyšetření. Principem této analýzy je jednoduché zjištění, zda se hledané místo v DNA nachází, nebo ne. K restrikci, neboli štěpení, se používají enzymy zvané restriktázy. Přesněji bakteriální restriktázy (endonukleázy). Tyto enzymy dokáží štěpit DNA v přesně daném místě na základě sekvence nukleotidů. V laboratořích je používáno mnoho endonukleáz (restriktáz) a každá dokáže rozpoznat specifickou sekvenci nukleotidů o počtu pouhých několika párů bazí. Často dochází ke štěpení v místě, kde se nachází tzv. palindromické sekvence. Tyto sekvence mají pořadí bazí stejné od 3'konce i 5'konce. Pokud jedna alela genu obsahuje sekvenci rozpoznanou restriktázou, bude v tomto místě DNA rozštěpena. Pokud se však druhá alela genu liší od požadovaného sledu nukleotidů, DNA zůstane nerozštěpena. Každá endonukleáza vyžaduje pro štěpení optimální teplotu a pufr. Výsledky se odečítají po provedení elektroforézy na agarózovém gelu, kde na fragmenty rozdělí na základě hmotnosti lze je dobře odečítat. (Knoll a Vykoukalová, 2002)

Často se tato metoda používala pro stanovení paternity. Jak víme, každý člověk dědí polovinu genetické informace od otce a polovinu od matky. Tudiž lze při porovnání fragmentů lehce určit otce. (Zima, 2007)

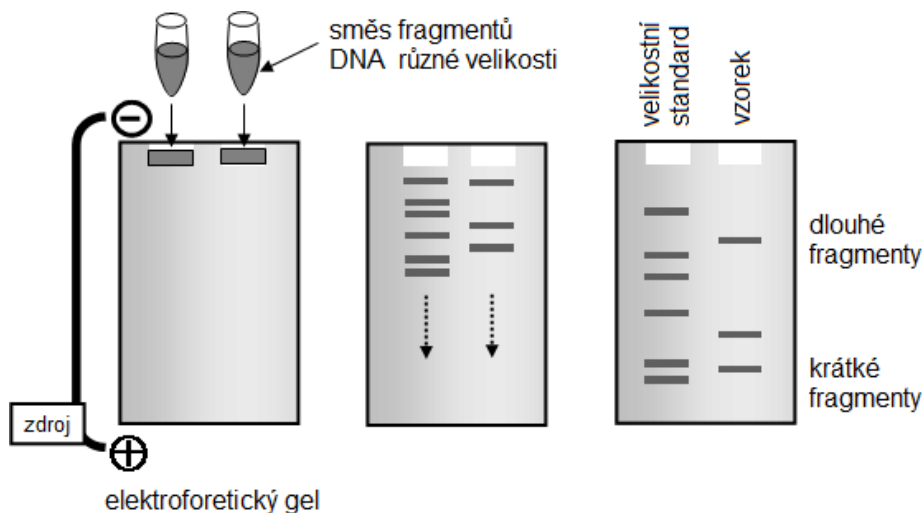
Obr. VII: Princip RFLP (Zdroj: Retama, 2008)



## 8 Elektroforéza

Tuto metodu využívá většina klinických laboratoří od běžné rutinní biochemie až po speciální imunologické a genetické laboratoře. Zakládá se na principu využívajícího povahu látek a jejich chování v elektrickém poli. V genetických laboratořích se hojně využívá elektroforéza v agarózovém gelu, který je při vyšších koncentracích vhodný právě pro dělení nukleových kyselin. Agarózový gel vytvoříme rozpuštěním polysacharidu agarózy ve vhodném pufru. V tomto gelu putují molekuly DNA podle velikosti, náboje i jejich konformace. Fragменты podle velikosti putují od malých, které jsou rychlejší až k těm velkým, které putují déle od katody k anodě, jelikož DNA je záporně nabitá. DNA po provedení elektroforézy se vizualizuje na gelu v podobě bandů o známé velikosti. Pokud byla DNA rozštěpena, jsou na gelu, po obarvení speciálními barvami určenými pro ELFO, dobře viditelné rozdíly ve srovnání s nerozštěpenou DNA (např. negativní a pozitivní kontrolou). (Šmarda et al., 2005)

Obr. VIII: Gelová elektroforéza (zdroj: Bártová, 2011)



## 9 Validace

Validování metod nejen v klinických laboratořích je nedílnou součástí jejich řádného provozu a vnitřní kontroly. Navíc je to jeden z požadavků norem ISO. Tyto zkoušky by měly objasnit, zda metoda funguje v z hlediska různých aspektů, jako je například opakovatelnost, reprodukovatelnost a robustnost.

V oblasti molekulární genetiky ještě nebyly stanoveny pevná pravidla a standardy pro validaci metod, ale existují jistá doporučení. Pro validaci je nutné v případě genetického testování používat vzorky se známým genotypem, kdy předem známe výsledek, který musí být odečten také při validaci. Je důležité rozpoznat možné falešně pozitivní či falešně negativní výsledky, které mohou vzniknout během testování. Dále je třeba, aby validace obsahovala všechny používané metody včetně příprav a zpracování primárního vzorku jako je např. izolace DNA nebo validování PC programu, který je použit pro analýzu. (Brdička, 2007)

Výsledkem validace je validační protokol, který se stává součástí laboratorní dokumentace. (Brdička, 2007)

### **9.1 Opakovatelnost**

Opakovatelnost je validačním kritériem, kdy prokazujeme, že metoda je při opakovaných měřeních stále přesná. Je to vlastnost metody, nikoli výsledku. Opakovatelnost musí být prokázána za použití stejných metod, stejných postupů, ve stejné laboratoři, se stejnými přístroji a stejným laborantem. (Brdička, 2007)

### **9.2 Reprodukovatelnost**

Opět se jedná o kritérium validace, kdy prokazujeme, zda je metoda přesná. Avšak při reprodukovatelnosti je metoda vykonána jiným pracovníkem, s jinými přístroji, v jiném čase a za jiných podmínek. Ovšem metoda musí být prováděna vždy stejným způsobem. (Brdička, 2007)

### **9.3 Robustnost**

Jde o kritérium, kdy prokazujeme, že metodu je možné provést i při různých odchylkách v postupu či složení (koncentraci/hmotnosti) vzorku. Toto kritérium je zavedeno proto, že v běžném provozu se mohou vyskytnout situace, kdy nebude dostupný běžný a/nebo potřebný obsah materiálu, pro provedení testu atd.. (Brdička, 2007)

## **10 Cíle a hypotézy**

### ***10.1 Cíl práce***

1. Prvním cílem bakalářské práce bylo vypracování rešerše zabývající se laktózovou intolerancí, vypracované na základě poznatků publikovaných v odborné literatuře.
2. Druhým cílem bylo praktické zvládnutí základních metod používaných v genetické laboratoři. Praktická část bakalářské práce probíhala v genetické laboratoři GENLABS.
3. Třetím cílem byla příprava a zpracování validačního protokolu pro PCR-RFLP pro stanovení laktózové intolerance.

### ***10.2 Hypotéza***

Lze předpokládat, že metoda PCR RFLP pro stanovení laktózové intolerance bude úspěšně zvalidována z hlediska opakovatelnosti, reprodukovatelnosti i robustnosti.

## 11 Praktická část

Laboratorní a praktická část mé bakalářské práce byla vykonávána v genetické laboratoři GENLABS pod vedením vedoucí práce Mgr. Dagmar Riegert Bystřické, Ph.D. V úvodu bude věnována pozornost izolaci DNA jak z periferní krve, tak z bukalního stěru. V dalších částech se zaměřím na použité metody PCR, RFLP, přípravu agarózového gelu, průběh elektroforézy a analýzu výsledků

Vzorky použité pro validaci poskytla genetická laboratoř. Validace metody PCR RFLP pro stanovení laktóзовé intolerance byla vykonána ve dnech 22. a 23.1.2018.

Přístroje a pomůcky použité při laboratorní práci:

- chladnička pro laboratorní použití
- chlazená centrifuga
- stolní minicentrifuga/vortex
- mikrovlnná trouba
- sada pipet
- sady zkumavek a kolonek
- thermocycler
- termostat
- laminární box
- elektroforetický systém
- detekční systém pro ELFO a měření koncentrace DNA

### 11.1 *Izolace DNA*

Před každým vyšetřením v genetické laboratoři je potřeba od pacienta/klienta získat genetický materiál. Ten získáme izolací DNA z bukalního stěru, nebo z periferní krve. Každý pacient/klient podepisuje informovaný souhlas, popř. souhlas s použitím genetického materiálu pro vědecké účely.

V laboratoři se pro spousty vyšetření používají komerční kity, které jsou pro laboratoř výhodné z hlediska šetření času atd.. I při mé práci jsem je využívala a postupovala podle předepsaných protokolů.

Použité zkratky:

RT - pokojová teplota (room temperature)

TE - Re-hydration buffer TE

### ***11.2 Izolace DNA z periferní krve***

Pro izolaci DNA z periferní krve byl použit Genomic DNA Mini Kit od firmy PureLink dle přiloženého doporučení výrobce.

Reagencie:

- 96 % ethanol - zásobní roztok se skladuje při RT
- GT Buffer - skladuje se při RT
- W1 Buffer - skladuje se při RT
- Wash Buffer - dle návodu výrobce se ke koncentrátu Wash Buffer přidá 100 ml 96 % etanolu, skladuje se při RT
- Elution Buffer - skladuje se při RT, před každým použitím vytemperovat požadovaný objem na 60 °C
- RBC Lysis Buffer - skladuje se při RT

Pracovní postup:

1. do 1,5 ml mikrozkušavky, kterou je nutno označit (!), napipetujeme 300 µl plné krve
2. dále přidáme 900 µl RBC Lysis Bufferu a vše promícháme převrácením zkumavky v ruce
3. necháváme inkubovat 10 min. při RT
4. dalším postupem je centrifugace vzorku na 5 min. při 5698 ot/min
5. odstranění supernatantu
6. přidáme 100 µl RBC Lysis Buffer a peleta musí být resuspendována
7. v dalším kroku přidáme 200 µl GB Bufferu
8. zvortexujeme a krátce stočíme
9. inkubace 10 - 15 minut v termostatu při 60 °C, lyzát je projasněn
10. během inkubace je nutno zkumavku převrátit každé 3 min.
11. přidáme bylo 200 µl 96% etanolu

12. vortexujeme 10 s a krátce zcentrifugujeme
13. lyzát přepipetujeme na kolonku (GD Column) a tu vložíme do čisté sběrné zkumavky (2 ml Collection tube)
14. centrifugace při 13 tis. ot/min po dobu 5 min
15. kolonku přendáme do nové sběrné zkumavky a použitou zkumavku s tekutinou vyhodíme
16. do kolonky napipetujeme 400 µl W1 Buffer
17. centrifugace pro 13 tis. ot/min na 30 s
18. ze sběrné zkumavky vylijeme zcentrifugovanou tekutinu a kolonku vrátíme
19. do kolonky přidáme 600 µl Wash Buffer
20. centrifugace při 13 tis. ot/min na 30 s
21. ze sběrné zkumavky opět vylijeme tekutinu a kolonku do ní vrátíme
22. „suchou“ kolonku se sběrnou zkumavkou zcentrifugujeme při 13 tis. ot/min po dobu 3 min
23. přímo na filtr kolonky přidáme 100 µl Elution Buffer (vytemperováno na 60 °C)
24. inkubováno alespoň 3 min při RT
25. kolonka s označenou 1,5 ml mikrokumavkou zcentrifugujeme při 13 tis. ot/min po dobu 30 s
26. změříme koncentraci DNA
27. vzorek uložíme do mrazícího boxu nastaveného na -20 °C

### ***11.3 Izolace DNA z bukálního stěru***

Pro izolaci z bukálního stěru byl použit kit od firmy Isohelix: DNA Isolation kit: (DDK-3/DDK-50).

Reagencie:

- Lysis Buffer (LS) - skladovat při RT
- Proteinase K - skladovat při -20 °C
- Capture Buffer (CT) - skladovat při RT
- Re-hydration Buffer (TE) - skladovat RT

Pracovní postup:



1. do zkumavky odstříháme tampon s buklárním stěrem
2. do zkumavky dále napipetujeme 500 µl Lysis Buffer
3. přidáme 20 µl Proteinázy K
4. krátce zvertexujeme a zcentrifugujeme
5. inkubace při 60 °C na hodinu
6. krátce zvertexujeme a zcentrifugujeme
7. vzorek přepipetujeme do nové 1,5 ml mikrozukavky
8. přidáme 500 µl Capture Buffer
9. krátce zvertexujeme
10. centrifugace při 13 tis. ot/min na 7 min
11. supernatant opatrně odstraníme
12. k peletě DNA přidáme 50 µl TE
13. inkubace na 10 min při RT
14. dále krátce zvertexujeme a zcentrifugujeme při 13 tis. ot/min na 2 min
15. supernatant odebereme do nové 1,5 ml zkumavky -> finální izolát
16. změříme koncentraci DNA
17. koncentraci DNA změříme fluorometrem Qubit<sup>®</sup> 2.0.
18. vzorek uložíme do mrazícího boxu nastaveného na -20 °C

#### ***11.4 Měření koncentrace DNA***

Před provedením samotných vyšetření je zapotřebí změřit koncentraci nukleových kyselin. Zjistíme, zda je DNA alespoň v minimální koncentraci, která je potřebná pro provedení testu. Nám také posloužila k testování robustnosti, když snižovali objem DNA.

Použité zkratky:

RT - pokojová teplota (room temperature)

St I - Qubit<sup>™</sup> dsAssays BR Standard #1

St II - Qubit<sup>™</sup> dsAssays BR Standard #2

Reagencie:

- Qubit<sup>™</sup> dsAssays BR reagent (Component A) - skladování při RT
- Qubit<sup>™</sup> dsAssays BR buffer (Component B) - skladování při RT

- Qubit<sup>TM</sup> dsAssay BR Standard #1 (Component C) - skladování v lednici ( $\leq 4^{\circ}\text{C}$ )
- Qubit<sup>TM</sup> dsAssay BR Standard #2 (Component D) - skladování v lednici ( $\leq 4^{\circ}\text{C}$ )

Pracovní postup:

1. pro každý vzorek byl připraven pracovní roztok Qubit<sup>TM</sup> Working Solution
2. do 1,5 ml mikrozkušavky bylo pro každý vzorek napipetováno 199  $\mu\text{l}$  Qubit<sup>TM</sup> dsDNA BR buffer a 1  $\mu\text{l}$  Qubit<sup>TM</sup> dsDNA BR reagent
3. pracovní roztok krátce zvortexován a stočen
4. označili jsme si 0,5 ml mikrozkušavky Qubit<sup>TM</sup> Assay tubes
5. do nich bylo napipetováno 190  $\mu\text{l}$  pracovního roztoku a přidáno 10  $\mu\text{l}$  příslušné standardy (ST I a ST II) nebo 10  $\mu\text{l}$  vzorku do každé
6. krátce zvortexováno a stočeno
7. inkubace vzorků 2 min při RT
8. poté měření koncentrace DNA na fluorometru Qubit<sup>TM</sup> 2.0

Tab. III: Měření DNA

Druh odebraného materiálu	Koncentrace v ng/ $\mu\text{l}$
Periferní krev	73,2
Bukální stěr	354

### 11.5 Příprava a provedení PCR

Vzorky DNA se musejí smíchat s reagensy, které denaturují dvoušroubovici, poté nasednou primery a tím označí začátek a konec syntézy a dokáží je naamplifikovat. Tento mix označujeme termínem mastermix, který následně umístíme do thermocycleru.

Vyšetřujeme dva nejčastěji se vyskytující polymorfismy v evropské populaci, které mají za následek laktózovou intoleranci - C/T 13910 a G/A 22018. Každý polymorfismus je vzhledem k použitým primerovým pářům analyzován zvlášť a vyžaduje samostatný reakční mix. Příprava reakčního mixu je popsána níže.

Reagencie pro 13910 CT:

- voda
- MyTaq Red Reaction buffer
- MyTaq polymeráza
- DMSO
- primery F+R (LAC 13910 C/T for, LAC 13910 C/T rev)

Reagencie pro 22018 GA:

- voda
- MyTaq Red Reaction buffer
- MyTaq polymeráza
- DMSO
- primery (LAC 22018 G/A for a LAC 22018 rev) (syntetizovány fi Elisabeth Phramacon)

Použité primery:

Sekvence primerů pro polymorfismus 13910 CT:

LAC 13910 C/T for: 5'- GCT GGC AAT ACA GAT AAG ATA ATG GA-3'

LAC 13910 C/T rev: 5'- CTG CTT TGG TTG AAG CGA AGA T-3'

Sekvence primerů pro polymorfismus 22018 GA:

LAC 22018 G/A for: 5'- CTC AGT GAT CCT CCC ACC TC-3'

LAC 22018 G/A rev: 5'- CCC CTA CCC TAT CAG TAA AGG C-3'

Sekvence primerů a reakční protokoly pro polymorfismus C/T-13910 byly převzaty z práce Mattar et al., 2008 a pro polymorfismus G/A-22018 z práce Coelho et al., 2005.

Tab. IV : Pro šest vzorků. První tři vzorky byly po standartních 2\_μl a následující tři vzorky byly kvůli testu robustnosti o objemu 1,5 μl , 1 μl a 0,5 μl .

Reagencie	1 reakce	6 reakcí
Voda	34,3 $\mu$ l	205,8 $\mu$ l
MyTag Red Reaction buffer	10 $\mu$ l	60 $\mu$ l
MyTaq polymeráza (5U/ $\mu$ l)	0,2 $\mu$ l	1,2 $\mu$ l
DMSO (100%)	2,5 $\mu$ l	15 $\mu$ l
Primery forward + reverse (20 pmol)	0,5 $\mu$ l	3 $\mu$ l
<b>Celkem</b>	48 $\mu$ l	288 $\mu$ l
<b>DNA</b>	2 $\mu$ l	3x2 $\mu$ l ; 1x1,5 $\mu$ l ; 1x1 $\mu$ l ; 1x0,5 $\mu$ l

Pracovní postup:

1. vysvítíme laminární box UV světlem
2. z mrazničky vyndáme chladicí stojan a reagencie: primery, DNA vzorky, buffer a polymerázu
3. z chladničky vyndáme DMSO
4. pro každý jeden vzorek si připravíme jednu mikrozkušavku a dvě velké zkumavky
5. velkých zkumavek nepipetujeme reagencie podle tabulky kromě DNA! (pozor na primery podle polymorfismu)
6. rozpipetujeme po jedné reakci do každé mikrozkušavky připravený mastermix
7. krátce zvertexujeme a stočíme
8. přidáme DNA opět podle tabulky
9. opět krátce zortexujeme a stočíme
10. vložíme do thermocycleru podle návodu do příslušných otvorů
11. spustíme program pro laktózovou intoleranci

Tab. V: Reakce v therocycleru a jejich teploty a čas:

Krok programu	Teplota	Čas	Počet cyklů
<b>Počáteční denaturace</b>	95 °C	5 min	1 cyklus
<b>Denaturace</b>	95 °C	60 s	30 cyklů
<b>Annealing</b>	57,4 °C pro C/T 13910 60,1 °C pro G/A 22018	60 s	

<b>Extenze</b>	72 °C	60 s	
<b>Terminální extenze</b>	72 °C	5 min	1 cyklus
<b>Chlazení</b>	4 °C	10 min	1 cyklus

### 11.6 Příprava gelové elektroforézy

Při kontrole PCR produktů nebo vzorků po restrikčním štěpení je třeba použití gelové elektroforézy.

Reagencie:

- Crystal 10x TBE Buffer - prášek se skladuje při RT
- 10x TBE - roztok připravený z Crystal 10X TBE buffer dle doporučení výrobce, skladuje se při RT
- pracovní roztok 1x TBE - skladuje se při RT
- agarózové tablety (1 tableta = 0,5 g agarózy) - skladování při RT
- Midori Green Advanced DNA stain - skladování v lednici ve tmě
- 100bp DNA LADDER H3RTU - skladování při RT

Pracovní postup:

1. příslušný počet agarózových tablet vložíme do plastové kádinky o celkovém objemu 100 ml (1% gel = 1 tableta/50 ml, 2% gel = 2 tablety/50 ml atd.)
2. k tabletám přidáme 50 ml 1x TBE pufru
3. kádinku s rozpuštěnými tabletami vložíme do mikrovlnné trouby
4. kádinku zahříváme cca tři minuty a během ohřevu kontrolujeme a mícháme, aby roztok nepřetekl
5. pokud potřebujeme barvený gel, přidáme do gelu 6 µl barvičky Midori Green Advanced DNA Stain
6. gel pečlivě promícháme a vlijeme do elektroforetické formy s připravenými hřebeny (pokud je třeba snažíme se lopatičkou zbavit gel bublin)
7. gel ponecháme ztuhnout ve tmě po dobu 10-15 min
8. z tuhého gelu opatrně vyndáme hřebeny
9. gel vkládáme do elektroforetické vany obsahující 1x TBE pufrem

### 11.7 Restrikční štěpení

Na laktózovou intoleranci pro metodu RFLP jsme použili restrikční enzymy bakterie *Haemophilus influenzae*. Pro polymorfismus C/T 13910 se použila restriktáza nazvaná *HinfI* a pro SNP G/A 22018 byl použit enzym zvaný *Hin6I*. Tyto restrikční enzymy štěpí příslušné PCR produkty na přesné fragmenty.

#### Místa štěpení:

*HinfI*

5' ...G↓ANTC...3'

3' ...CTNA↑G...5'

*Hin6I*

5' ...G↓CGC...3'

3' ...CGC↑G...5'

#### Reagencie:

- enzym *HinfI* + CutSmart Buffer pro LAC 13910 C/T
- enzym *Hin6I* + Tango buffer pro LAC 22018 G/A

#### Pracovní postup:

1. z lednice jsme si vyndali chladicí stojan
2. z mrazáku bylo vyndány enzymy *HinfI* a *Hin6I* spolu s pufrý 10xNBE buffer a 10x Tango buffer
3. připravíme si dvě velké zkumavky, které označíme čísly I pro C/T 13910 a II pro G/A 22018
4. do zkumavky označené I si napipetujeme pro každou reakci 1 µl enzymu *HinfI* a 4,5 µl 10x NBE buffer
5. do zkumavky označené II si napipetujeme pro každou reakci 1 µl enzymu *Hin6I* a 4,5 µl Tango buffer
6. krátce zvertexujeme a stočíme
7. poté po 5 µl rozpipetujeme do mikrozkušavek s PCR produktem
8. opět stočíme a zvertexujeme
9. dáme do stojánku a necháme při 37 °C štípat alespoň hodinu
10. poté výsledek restrikčního štěpení zkontrolujeme na 4% agarózovém gelu

Tab. VI: Všechny možné výsledky PCR RFLP

	<b>PCR produkt</b>	<b>Restrikce</b>	<b>Mutace</b>	<b>Wild Type</b>	<b>Heterozygot</b>
<b>LAC 19310</b>	201 bp	HinfI	177+24 (T/T)	201 (C/C)	201+177+ 24 (CT)
<b>LAC 22018</b>	271 bp	Hin6I	271 (AA)	196+75 (GG)	271+196+75 (GA)

## 12 Výsledky

Validace probíhala v různých dnech a prováděli ji dvě osoby nezávisle na sobě. V prvním dnu prováděla testování a celý proces laborantka z laboratoře GENLABS a v druhém dni jsem provedla testování sama. Testování proběhlo úspěšně a zde jsou výsledky.

Dále je nutné, aby se testování týkalo jednoho typu vzorku, aby byla zaručena validnost.

### 12.1 První měření

22.1.2018 – provedla druhá laborantka

Vzorek 1/18

Koncentrace DNA 354 ng/μl -> množství použité do PCR 2 μl, tj. 708 ng

Tab. VII: Výsledky prvního měření PCR produktu:

<b>Datum</b>	<b>Vzorek</b>	<b>Koncentrace</b>	<b>PCR produkt 13910</b>	<b>PCR produkt 22018</b>	<b>Test provedl</b>
22.1.2018	1/18	708 ng/μl	201 bp	271 bp	LČ
22.1.2018	1/18	708 ng/μl	201 bp	271 bp	LČ
22.2.2018	1/18	708 ng/μl	201 bp	271 bp	LČ

Popis/ Foto gelu

1.vz 1/18 PCR produkt 13910

2.vz 1/18 PCR produkt 13910

3.vz 1/18 PCR produkt 13910

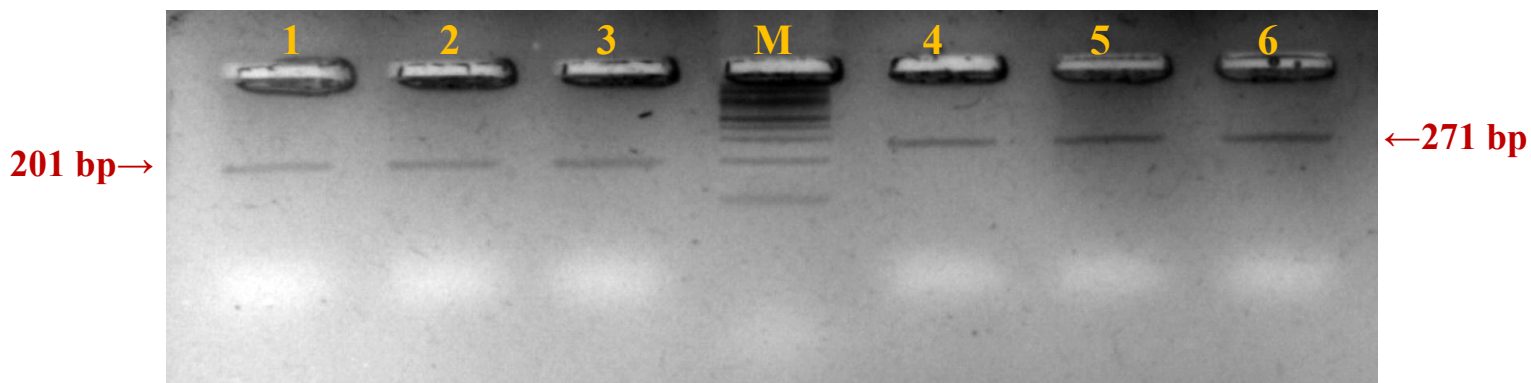
M - hmotnostní marker

4.vz 1/18 PCR produkt 22018

5.vz 1/18 PCR produkt 22018

6.vz 1/18 PCR produkt 22018





### Restrikční štěpení

- RŠ pro LAC 13910 v 50  $\mu$ l: 45  $\mu$ l CutSmarter buffer + 1  $\mu$ l *Hinf*I
- RŠ pro LAC 22018 v 50  $\mu$ l: 45  $\mu$ l Tango buffer + 1  $\mu$ l *Hin*6I
- Kontrola restrikčního štěpení na 4% agarózovém gelu

Tab. VIII: Výsledky prvního restrikčního štěpení:

Datum	Vzorek	Koncentrace DNA	RŠ 13910	RŠ 22018	Výsledek	Test provedl
22.1.2018	1/18	708 ng/ $\mu$ l	201 bp	196+75 bp	Wild type CC/GG	LČ
22.1.2018	1/18	708 ng/ $\mu$ l	201 bp	196+75 bp	Wild type CC/GG	LČ
22.1.2018	1/18	708 ng/ $\mu$ l	201 bp	196+75 bp	Wild type CC/GG	LČ

### Popis/ Foto gelu

1.vz 1/18 restrikční štěpení 13910

2.vz 1/18 restrikční štěpení 13910

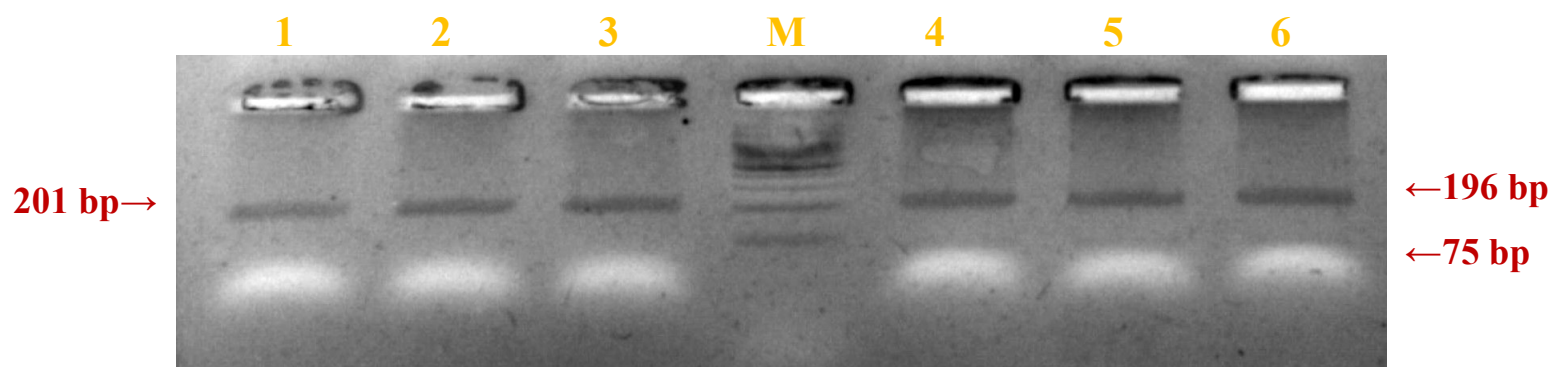
3.vz 1/18 restrikční štěpení 13910

M- hmotnostní marker

4.vz 1/18 restrikční štěpení 22018

5.vz 1/18 restrikční štěpení 22018

6.vz 1/18 restrikční štěpení 22018



**Závěr: Test proběhl úspěšně ve všech třech měřeních.**

(Sekvenování genu bylo provedeno externí laboratoří, která potvrdila správnost restrikčního štěpení.)

### 12.2 Opakovatelnost a robustnost

Testování se muselo pro validní výsledek zopakovat a navíc byl přidán aspekt robustnosti. Test robustnosti obnášel snížení objemu vzorku o vždy o ½ µl. To znamená, že původní vzorek pro štípaní obsahoval 2 µl DNA a další tři 1,5 µl, 1 µl a 0,5 µl DNA.

#### 12.2.1 Druhé měření

23.1.2018 – provedla jsem osobně

#### PCR

Koncentrace DNA 354 ng/µl -> množství použité do PCR 2 µl, tj. 708 ng

Tab. IX: Výsledky druhého PCR produktu:

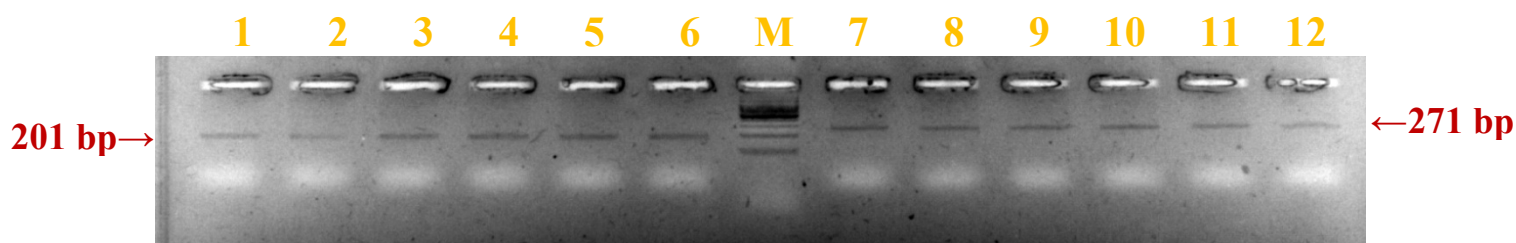
Datum	Vzorek	Koncentrace DNA	PCR produkt 13910	PCR produkt 22018	Test provedl
23.1.2018	1/18	708 ng/µl	201 bp	271 bp	DP
23.1.2018	1/18	708 ng/µl	201 bp	271 bp	DP
23.1.2018	1/18	708 ng/µl	201 bp	271 bp	DP

Tab. X: Výsledky PCR při testování robustnosti:

Datum	Vzorek	Koncentrace DNA	PCR produkt 13910	PCR produkt 22018	Test provedl
23.1.2018	1/18	531 ng/μl	201 bp	271 bp	DP
23.12.2018	1/18	354 ng/μl	201 bp	271 bp	DP
23.1.2018	1/18	177 ng/μl	201 bp	271 bp	DP

Popis/ Foto gelu

- 1.vz PCR produkt 13910
- 2.vz PCR produkt 13910
- 3.vz PCR produkt 13910
- 4.vz PCR produkt 13910 (1,5 μl DNA)
- 5.vz PCR produkt 13910 (1 μl DNA)
- 6.vz PCR produkt 13910 (0,5 μl DNA)
- M - hmotnostní marker
- 7.vz PCR produkt 22018
- 8.vz PCR produkt 22018
- 9.vz PCR produkt 22018
- 10.vz PCR produkt 22018 (1,5 μl DNA)
- 11.vz PCR produkt 22018 (1 μl DNA)
- 12.vz PCR produkt 22018 (0,5 μl DNA)



Restrikční štěpení

- RŠ pro LAC 13910 v 50 μl: 45 μl CutSmarter buffer + 1 μl *Hin*I
- RŠ pro LAC 22018 v 50 μl: 45 μl Tango buffer + 1 μl *Hin*6I
- Kontrola na 4% agarózovém gelu

Tab. XI: Výsledky druhého restrikčního štěpení:

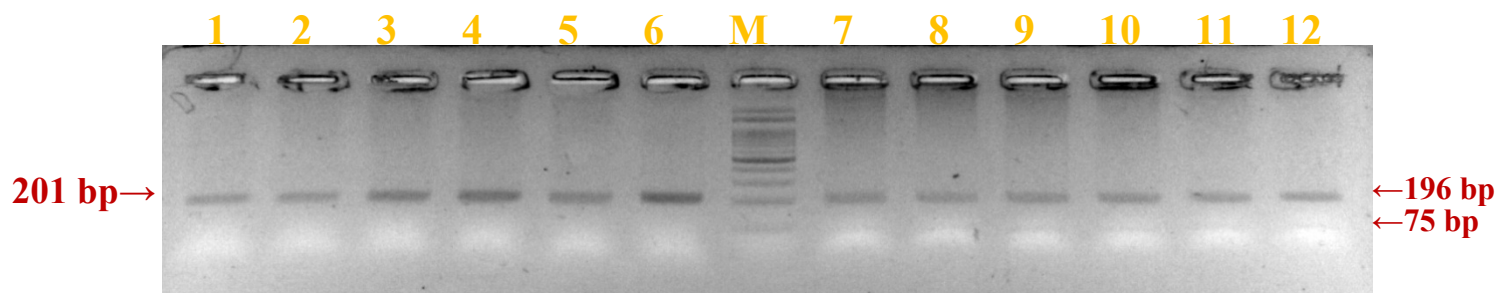
<b>Datum</b>	<b>Vzorek</b>	<b>Koncentrace DNA</b>	<b>RŠ 13910</b>	<b>RŠ 22018</b>	<b>Výsledek</b>	<b>Test provedl</b>
23.1.2018	1/18	708 ng/μl	201 bp	196+75 bp	Wild type CC/GG	DP
23.1.2018	1/18	708 ng/μl	201 bp	196+75 bp	Wild type CC/GG	DP
23.1.2018	1/18	708 ng/μl	201 bp	196+75 bp	Wild type CC/GG	DP

Tab. XII: Výsledky druhého restrikčního štěpení při testování robustnosti:

<b>Datum</b>	<b>Vzorek</b>	<b>Koncentrace DNA</b>	<b>RŠ 13910</b>	<b>RŠ 22018</b>	<b>Výsledek</b>	<b>Test provedl</b>
23.1.2018	1/18	531 ng/μl	201 bp	196+75 bp	Wild type CC/GG	DP
23.1.2018	1/18	354 ng/μl	201 bp	196+75 bp	Wild type CC/GG	DP
23.1.2018	1/18	177 ng/μl	201 bp	196+75 bp	Wild type CC/GG	DP

Popis/ Foto gelu

- 1.vz 1/18 restrikční štěpení 13910
- 2.vz 1/18 restrikční štěpení 13910
- 3.vz 1/18 restrikční štěpení 13910
- 4.vz 1/18 restrikční štěpení 13910 (1,5 μl DNA)
- 5.vz 1/18 restrikční štěpení 13910 (1 μl DNA)
- 6.vz 1/18 restrikční štěpení 13910 (0,5 μl DNA)
- M - hmotnostní marker
- 7.vz 1/18 restrikční štěpení 22018
- 8.vz 1/18 restrikční štěpení 22018
- 9.vz 1/18 restrikční štěpení 22018
- 10.vz 1/18 restrikční štěpení 22018 (1,5 μl DNA)
- 11.vz 1/18 restrikční štěpení 22018 (1 μl DNA)
- 12.vz 1/18 restrikční štěpení 22018 (0,5 μl DNA)



**Závěr:** Test proběhl i tentokrát úspěšně ve všech třech měřeních pro aspekt opakovatelnosti a reprodukovatelnosti. Testování robustnosti proběhlo úspěšně.

## 13 Diskuse

Jak jsme zjistili, existuje několik možností, jak vyhodnotit laktózovou intoleranci. Nejprokazatelnějším testováním pro prokázání laktózové intolerance je biopsie sliznice tenkého střeva. Nevýhodou této diagnostické metody je velká invazivita a další nevýhodou je, že lékař může odebrat část tkáně, která může být rozdílně aktivní v produkci tohoto enzymu. Lékař by měl s pacientem probrat všechna pro a proti a vysvětlit úskalí falešné positivity a falešné negativy. Avšak výhodou při tomto vyšetření může být průkaz sekundární příčiny intolerance, nebo dokonce odhalení jiných příčin obtíží, které pacienta trápí.

Genetické testování může být prakticky neinvazivní, pokud zvolíme odběr DNA formou bukálního stěru, spočívající ve stěru buněk přítomných v ústech v oblasti vnitřní strany tváře. Výhody tohoto testování jsou nepopíratelné. Pacient je ušetřen nepříjemných vedlejších účinků testování vznikajících po požití laktózy a možných nežádoucích účinků anestezie při výše zmíněné biopsii. Pokud je vhodně zvolená metoda a odbornost personálu je na dobré úrovni, zdá se být tento způsob testování nejlepší volbou. Genetický test nemusí být lékařem doporučen z důvodu jeho neznalosti nebo vyšší finanční nákladnosti.

Při zjištění laktózové intolerance je nutné, aby pacient začal dodržovat dietní pokyny, které předejdou vzniku možných nežádoucích účinků. Nejlepší možností je vyzkoušet, jaké množství postiženému způsobuje problémy a které nikoli, aby nemusel úplně vyloučit mléčné výrobky z jídelníčku. V případě, že se bude jednat o silně intolerantní osobu, která není schopná zpracovat sebemenší množství laktózy, je dobré se poradit s odborným nutričním terapeutem o možnostech doplnění chybějícího vápníku a vitamínu D.

V evropské populaci se běžně testují dva polymorfismy - C/T 13910 a G/A 22018. Tyto dva polymorfismy jsou společně v segregaci. Proto jsme i my použili testování těchto dvou SNP. Avšak není vyloučeno, že při zkoumání genomů pacientů s projevy intolerance, kterým vyjdou negativně výsledky pro polymorfismy C/T 13910 a G/A 22018, se časem objeví další polymorfismus.

V experimentální části jsou popsány metodické postupy a vypracován validační protokol mého měření v laboratoři. Pro testování laktózy intolerance byla vybrána metoda PCR RFLP, jedná se o tzv. „in house“ metodický přístup, vyžadující nezbytnou optimalizaci pro podmínky laboratoře a následnou validaci. Tuto metodu se mi podařilo společně s pracovníky laboratoře zvalidovat.

Validace metody byla provedena ve dvou dnech dvěma pracovníky, za použití různé koncentrace DNA. Nejen, že jsme prokázali možnost opakovatelnosti získaných výsledků, kdy nám správnost ověřila externí laboratoř sekvenováním, ale navíc jsme přidali aspekt robustnosti metody. Jak z výsledného protokolu vyplývá, tak testování vycházelo i při použití nižších koncentrací DNA. Metoda byla tedy úspěšně validována z hlediska opakovatelnosti, reprodukovatelnosti i robustnosti.

Validační protokol, který je výstupem tohoto procesu se stává nedílnou součástí každé správně vedené laboratorní praxe. Pokud chce laboratoř seriózně provádět vyšetření, nevyhneme se provádění validací. Protokol se stane součástí laboratorní dokumentace.

## 14 Závěr

Mým cílem nebylo naučit něco o genetice, testování a práci v laboratoři pouze sebe. Dalším zamýšleným cílem bylo, aby práce mohla být prospěšná i pro okolní laiky, kteří si pletou pojmy alergie a potravinová intolerance, nebo jim alespoň částečně osvětlit problematiku genetického testování.

Při práci v laboratoři jsem se naučila několik dalších metod, jelikož jsem směla přihlížet i dalším laboratorním postupům a navíc se mi propojila teorie s praxí, což je pro studenta velmi důležité. Jedním z cílů bylo také vypracování rešerše a práce s odbornou literaturou. Cílem praktické části bylo zvládnutí základních metod používaných v genetické laboratoři a zpracování výsledků z laboratorního testování do podoby validačního protokolu.

Dále bylo v teoretické části vysvětleno, jaké jsou možnosti testování, jejich pozitiva i negativa. Osobně si myslím, že genetické vyšetření je nejlepším možným vyšetřením pro kliniky, kteří právě podle výsledků z genetické laboratoře a s anamnézou, kterou jim poskytl pacient, mohou nasadit vhodnou léčbu. Ta by měla lidem, kteří trpí laktózovou intolerancí pomoci od nepříjemných potíží.



## Seznam použitých zdrojů

1. BÁRTOVÁ, E., 2011. *Gelová elektroforéza*. In: cti.vfu.cz [online]. [cit. 26.04.2018] Dostupné z WWW: [https://cit.vfu.cz/opvk2011/?title=popis\\_metod-gelova\\_elektroforeza&lang=cz](https://cit.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-gelova_elektroforeza&lang=cz)
2. BRDIČKA, R., VRANÁ, M., OTÁHALOVÁ, E., ŠTAMBERGOVÁ, A., ČAMAJOVÁ, E., 2007. *Analytická validace metod molekulární genetiky určených pro analýzu lidského genomu*. [online] Praha: Národní referenční laboratoř pro DNA diagnostiku. [ cit. 2019-04-01]. Dostupné z WWW: [http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2007/1-07/KBM0701\\_SLG\\_58.pdf](http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2007/1-07/KBM0701_SLG_58.pdf)
3. COELHO, M., LUISELLI, D., BERTORELLE, G., LOPES, A. I., SEIXAS, S., DESTROBISOL, G., ROCHA, J., 2005. Microsatellite variation and evolution of human lactase persistence. *Human Genetics*. 117(4), 329-339. DOI: 10.1007/s00439-005-1322-z
4. HOŘEJŠÍ, V., BARTUŇKOVÁ, J., BRDIČKA, T., ŠPIŠEK, R., 2013. *Základy imunologie*, 5.vydání. Praha: Triton. 330 s. ISBN 978-80-7387-713-2.
5. DI RIENZO, T., D'ANGELO, G., D'AVERSA, F., CAMPANALE, M. C., CESARIO, V., MONTALTO, M., GASBARRINI, A., OJETTI, V., 2013. Lactose intolerance: from diagnosis to correct management. *European Review for Medical and Pharmacological Science*. 17(2), 18-25. ISSN 1128-3602.
6. DYLEVSKÝ, I., 2000. *Somatologie*, 2.vydání. Olomouc: Epava. 480 s. ISBN 80-86297-05-5.
7. ENATTAH, N. S., TRUDEAU, A., PIMENOFF, V., MAIURI, L., AURICHIO, S. GRECO, L., ROSSI, M., LENTZE, M. SEO, J. K., RAHAGOZAR, S., KHALIL, I., ALIFRANGIS, M., NATAH, S., GROOP, D., BULAVEVA, K., MEHDI, S. Q., TERWILLIGER, J. D., SAHI, T., SAVILAHTI, E., PEROLA, M., SAJANTILA, A., JÄRVELÄ, I., PELTONEN, L., 2007. Evidence of Still-Ongoing Convergence Evolution of the Lactase Persistence T-13910 Alleles in Humans. *American Journal of Human Genetics*. 81(3), 615-625. DOI: 10.1086/520705.

8. ENZOKLOP, 2014. *Schématický nákres cyklu PC*. In: Wikipedie.cz [online]. [cit. 20.04.2019] Dostupné z WWW: [https://sk.wikipedia.org/wiki/Polymer%C3%A1zov%C3%A1\\_re%C5%A5azov%C3%A1\\_reakcia#/media/File:Polymerase\\_chain\\_reaction.svg](https://sk.wikipedia.org/wiki/Polymer%C3%A1zov%C3%A1_re%C5%A5azov%C3%A1_reakcia#/media/File:Polymerase_chain_reaction.svg)
9. FOJÍK, P., FALT, P., URBAN, O., NOVOSAD, P., RICHTEROVÁ, L., BÓDAY, A., 2013. Laktózová intolerance. *Practicus*. 13(5), 7-12. ISSN 1213-8711.
10. HARVY, C. B., WANG, Y., DARMOUL, D., PHILLIPS, A., MANTEI, N., SWALLOW, D. M., 1996. Characterisation of a human homologue of a yeast cell division cycle gene, MCM6, located adjacent to the 5' end of the laktase gene on chromosome 2q21. *Federation of European Biochemical Societies*. 398, 135-140. ISSN 1742-464x.
11. HOLDEN, C., MACE, R., 1997. Phylogenetic Analysis of Evolution of Lactose Digestion in Adults. *Human Biology*. 69(5), 605-628. ISSN 0018-7143.
12. KALAČ, P., 2001. *Organická chemie přírodních látek a kontaminantů*. České Budějovice: Jihočeská fakulta, Zemědělská fakulta. 120 s. ISBN 80-7040-520-1.
13. KNOLL, A., VYKOUKALOVÁ, Z., 2002. *Molekulární genetiky zvířat: (metody detekce polymorfizmů DNA gen)*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. ISBN 80-715-7616-6.
14. KOOLMAN, J., RÖHM, K. H., 2012. *Barevný atlas biochemie*, 4.vydání. Praha: Grada. 512 s. ISBN 978-80-247-2977-0.
15. KRATĚNOVÁ, J., 2012. *Současný pohled na výskyt alergií a astmatu, epidemiologická data včetně monitoringu SZÚ*. [online] Milovy: SZÚ [cit. 2019-01-15] Dostupné z WWW: [http://szu.cz/uploads/documents/chzp/alergie/Alergie\\_2012\\_prezentace.pdf](http://szu.cz/uploads/documents/chzp/alergie/Alergie_2012_prezentace.pdf)

16. KUOKKANEN, M., KOKKONEN, J., ENATTAH, N. S., YLISAUKKO-OJA, T., *et al.*, 2005. Mutations in the translated region of the lactose gene (LCT) underlie congenital lactose deficiency. *American Journal of Human Genetics*. 78, 339-344. ISSN 0002-9297.
17. LOMER, M. C. E., PARKERS, G. C., SANDERSON, J. D., 2007. Lactose Intolerance in Clinical Practise – Myths and Realities. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 27(2), 93-103. DOI: 10.1111/j.1365-2036.2007.03557.
18. MADRY, E., FIDLER, E., WALKOWIAK, J., 2010. Lactose intolerance – Current State of Knowledge. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*. 9(3). 343-350. ISSN 1889-9594.
19. MARTINI, M. C., SAVAIANO, D. A., 1988. Reduced intolerance symptoms from lactose consumed during a meal. *American Journal of Clinical Nutrition*. 41, 57-60. ISSN 0002-9165.
20. MATTAR, R., VILLARES, C. A., DOS SANTOS, A. F., CARRILHO, F. J., DO SOCORRO, MONTEIRO, M., 2008. Single nukleotide polymorfism C/T-13910, located upstream of the laktase gene, associated with adult-type hypolactasia: Validation for clinical practise. *Clinical Biochemistry*. [online] 41(7-8), 628-630. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2008.01.006. ISSN 00099120. Dostupné z WWW: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009912008000143>
21. MATTHEWS, S. B., WAUD, J. P., ROBERTS, A. G., CAMPBELL, A. K., 2005. Sytemic lactose intolerance: a new perspective on an old problem. *PostgradualMedical Journal*. 81, 161-173. ISSN 002-3859.
22. MISSELWITZ, B., POHL, D., FRÜHAUF, H., FRIED, M., VAVRICKA, S. R., FOX, M., 2013. Lactose malabsorption and intolerance: pathogenesis diagnosis and treatment. *United European Gastroenterology Journal*. 1(3), 151-159. ISSN 2050-6406.
23. PAVELKOVÁ, K., BUREŠOVÁ, P., 2015. *Potravinová alergie, intolerance a přecitlivělost na potraviny*. [online] Praha: Státní zemědělská a potravinářská inspekce [cit.

2018-02-20]. Dostupné z: [http:// http://www.szpi.gov.cz/clanek/potravinova-alergie-intolerance-a-precitlivost-na-potravinu.aspx](http://http://www.szpi.gov.cz/clanek/potravinova-alergie-intolerance-a-precitlivost-na-potravinu.aspx)

24. RANCIARO, A., CAMPBELL, M. C., HIRBO, J. B., KO, W., FORMENT, A., *et al.*, 2014. Genetic origin of lactase persistence and the sprej of pastoralism in Africa. *The American Journal of Human Genetics*, 94. 4(3), 496-510. ISSN 0002-9297.

25. RASINPERÄ, H., SAVILAHTI, E., ENATTAH, N. S., KUOKANEN, M., TÖTTERMAN, N., LINDAHL, H., JÄRVELÄ, I., KOLHO, K. L., 2004. A genetic test which can be used to diagnose adult-type hypolactasia in children. *Gut*. 53(11), 1571-1577. DOI: 10.1136/gut.2004.040048.

26. RETAMA, 2008. *Princip RFLP*. [online]. [cit. 06.01.2019] Dostupné z WWW: [https://cs.wikipedia.org/wiki/Polymorfismus\\_d%C3%A9lky\\_restrik%C4%8Dn%C3%ADch\\_fragment%C5%AF#/media/File:RFLP\\_mapping.svg](https://cs.wikipedia.org/wiki/Polymorfismus_d%C3%A9lky_restrik%C4%8Dn%C3%ADch_fragment%C5%AF#/media/File:RFLP_mapping.svg)

27. RUML, T., RUMLOVÁ, M., PAČES, V., 2002. *Genové inženýrství*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická. ISBN 80-708-0499-8.

28. SCHAAFSMA, G., 2008. Lactose and lactose derivates as bioactive ingredients in human nutrition. *International Dairy Journal*, 18(5), 458-465. ISSN 0958-6946.

29. SILBERNAGL, S., DESPOPOULOS, A., 2004. *Atlas fyziologie člověka*. 6.vydání. Praha: Grada. 448 s. ISBN 978-80-247-4271-7.

30. SNUSTAD, D. P., SIMMONS, M., RELICHOVÁ, J., ed., 2009. *Genetika*. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 978-80-210-4852.

31. SOLOMONS, N. W., (2003). Fermentation, fermented fous and lactose intolerance. *European Jornal of Clinical Nutrition*, 56(4), 50-55. ISSN 0954-3007.

32. STRÁSKÝ, M., RYŠAVÁ, L., 2014. *Fyziologie a patofyziologie dětské výživy*. 2., dopl. vyd. České Budějovice: Jihočeská univerzita, Zdravotně sociální fakulta. 182 s. ISBN 978-80-7394-241-0.

33. SWALLOW, D. M., 2003. Genetics of lactase persistence and lactose intolerance. *Annual Review of Genetics*. 37, 197-218. DOI: 10.1146/annurev.genet.37.110801.143820.
34. ŠMARDA, J., DOŠKAŘ, J., PANTŮČEK, R., RŮŽIČKOVÁ, V., KOPTÍKOVÁ, J., 2005. *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 80-210-3841-1.
35. ŠPIČKA, J., 2004. *Biochemie*. České Budějovice: Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta. 150 s. ISBN 80-7040-683-6.
36. TISHKOFF, S. A., REED, F. A., RANCIARO, A., VOIGHT, B. F., BABBITT, C. C., SILVERMAN, J. S., POWELL, K., MORTENSEN, H. M., HIRBO, J. B., OSMAN, M., IBRAHIM, M. OMAR, S. A., LEMA, G., NYAMBO, T. B., GHORI, J., BUMPSTEAD, S., PRITCHARD, J. K., WRAY, G. A., DELONKAS, P., 2007. Convergent adaptation of human lactase persistence in Africa and Europe. *Nature Genetics*. 39(1), 31-40. ISSN 1061-4036.
37. ZIMA, T., 2007. *Laboratorní diagnostika*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén. 906 s. ISBN 978-80-7262-372-3.
38. ZENZ, R., 2010. *Weltweite Verteilung der Laktoseintoleranz*. In: Wikipedia.de [online]. [cit. 05.02.2019] Dostupné z WWW: [https://cs.wikipedia.org/wiki/Intolerance\\_lakt%C3%B3zy#/media/File:Laktoseintoleranz-1.svg](https://cs.wikipedia.org/wiki/Intolerance_lakt%C3%B3zy#/media/File:Laktoseintoleranz-1.svg)

## 15 Přílohy

Příloha 1: Protokol k validaci vyšetření laktóзовé intolerance

### **Retrospektivní validace metody pro SOP1\_GL\_001\_C: Vyšetření Laktóзовé intolerance (polymorfismy C/T 13910 a G/A 22018) metodou PCR RFLP**

#### Účel metody:

Účelem vyšetření je detekce vybraných genových polymorfismů asociovaných s laktóзовou intolerancí. Přičemž včasná a správná diagnóza může předejít komplikacím vznikajícím při trávení laktózy a souvisejícím nepříznivým vedlejším účinkům u pacienta. Primární deficit laktázy je spojován s mutací v *MCM6* genu, který leží na chromozómu 2q21 a který se skládá ze 17 exonů. V genu *MCM6* byla zjištěna dvě polymorfnní místa na intronech 13 (C/T 13910) a 9 (G/A 22018). Jedná se o bodové mutace ovlivňující produkci laktázy, která umožňuje štěpení mléčného cukru laktózy.

Pracovní postup: definován v SOP9\_GL\_001\_C

#### Související dokumenty:

SOP9\_GL\_001\_C

PP2\_GL\_001\_C Měření koncentrace nukleových kyselin pomocí Qubit™ Assays

PP4\_GL\_001\_C Příprava a provedení gelové elektroforézy

PP6\_GL\_001\_C Izolace genomové DNA z plné krve (GeneAll ExGene™ Clinic SV)\_

PP7\_GL\_001\_C Izolace genomové DNA z bukalního stěru (GeneAll ExGene™ Clinic SV)\_

#### Specifičnost metody:

Pravděpodobnost negativního výsledku testu v případě nepřítomnosti hledané varianty testovaného znaku. Je vyjadřována jako poměr mezi správnou negativitou (TN) a součtem správné negativity a falešné positivity (FP):  $TN/(TN+FP)$ .

### Citlivost metody:

Pravděpodobnost pozitivního výsledku testu v případě přítomnosti hledané varianty testovaného znaku. Je vyjadřována jako poměr mezi správnou pozitivitou (TP) a součtem správné positivity a falešné negativity (FN):  $TP/(TP+FN)$ .

### Validační plán:

Počet vzorků: 1 vzorek/ známý genotyp (Wild type CC/GG), výsledný genotyp ověřený druhou nezávislou metodou sekvenování v externí laboratoři SEQme s.r.o.

1. Opakovatelnost: stejný vzorek 3x v jednom dni jedním pracovníkem – 3 měření jednoho vzorku.
2. Reprodukovatelnost: stejný vzorek 3x v různých dnech (ve dvou různých dnech, různí pracovníci) – 6 měření jednoho vzorku.
3. Robustnost: stejný vzorek 3x jiná koncentrace DNA (3x2  $\mu$ l DNA a další vždy o 0,5  $\mu$ l méně – 1x1,5  $\mu$ l DNA, 1x1  $\mu$ l DNA a 1x0,5  $\mu$ l DNA)
4. Výsledek externího hodnocení vzorku – sekvenace z 28.2. 2018.

## **Validační report:**

### **Opakovatelnost, reprodukovatelnost a robustnost**

Robustnost byla hodnocena vzhledem k vstupnímu množství DNA do reakce.

Vzorek 1/18, koncentrace (3x2  $\mu$ l DNA, 1x1,5  $\mu$ l DNA, 0,5  $\mu$ l DNA)

#### **Pro polymorfismus C/T 13910**

<b>Datum</b>	<b>Vzorek</b>	<b>Koncentrace DNA</b>	<b>PCR produkt</b>	<b>Restrikční štěpení</b>	<b>Výsledek</b>	<b>Test prov</b>
22.1.2018	1/18	708 ng/ $\mu$ l	201 bp	201 bp	Wild type CC	LČ
22.1.2018	1/18	708 ng/ $\mu$ l	201 bp	201 bp	Wild type CC	LČ

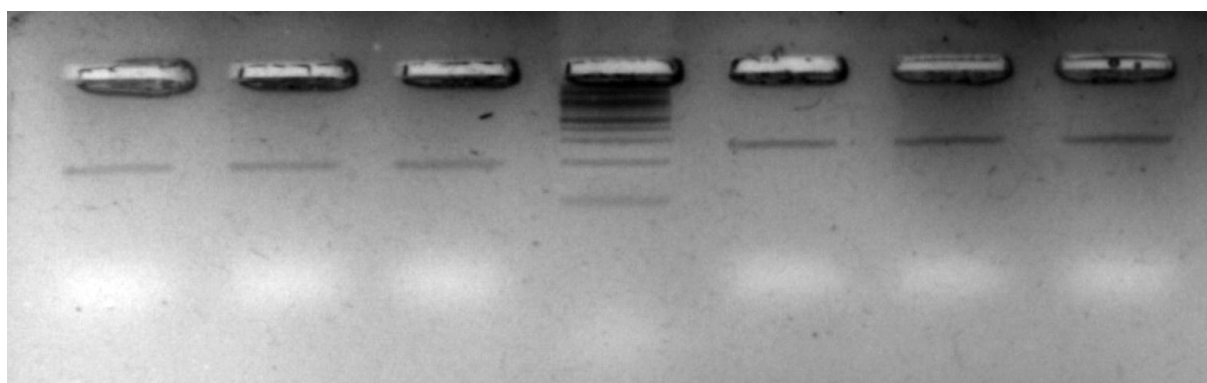
22.1.2018	1/18	708 ng/μl	201 bp	201 bp	Wild type CC	LČ
23.1.2018	1/18	708 ng/μl	201 bp	201 bp	Wild type CC	DP
23.1.2018	1/18	708 ng/μl	201 bp	201 bp	Wild type CC	DP
23.1.2018	1/18	708 ng/μl	201 bp	201 bp	Wild type CC	DP
23.1.2018	1/18	531 ng/μl	201 bp	201 bp	Wild type CC	DP
23.1.2018	1/18	354 ng/μl	201 bp	201 bp	Wild type CC	DP
23.1.2018	1/18	177 ng/μl	201 bp	201 bp	Wild type CC	DP

### Pro polymorfismus G/A 22018

Datum	Vzorek	Koncentrace DNA	PCR produkt	Restrikční štepení	Výsledek	Test proved
22.1.2018	1/18	708 ng/μl	271 bp	196 + 75 bp	Wild type GG	LČ
22.1.2018	1/18	708 ng/μl	271 bp	196 + 75 bp	Wild type GG	LČ
22.1.2018	1/18	708 ng/μl	271 bp	196 + 75 bp	Wild type GG	LČ
23.1.2018	1/18	708 ng/μl	271 bp	196 + 75 bp	Wild type GG	DP
23.1.2018	1/18	708 ng/μl	271 bp	196 + 75 bp	Wild type GG	DP
23.1.2018	1/18	708 ng/μl	271 bp	196 + 75 bp	Wild type GG	DP
23.1.2018	1/18	531 ng/μl	271 bp	196 + 75 bp	Wild type GG	DP
23.1.2018	1/18	354 ng/μl	271 bp	196 + 75 bp	Wild type GG	DP
23.1.2018	1/18	177 ng/μl	271 bp	196 + 75 bp	Wild type GG	DP

Foto gelu:

**22.1.2018:** PCR produkty C/T 13910 a G/A 22018



Popis gelu:

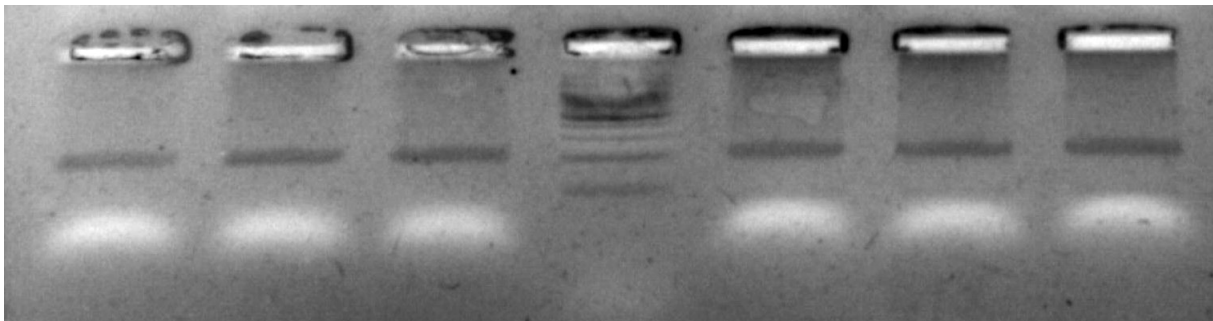
1. vzorek 1/18 PCR produkt C/T 13910



2. vzorek 1/18 PCR produkt C/T 13910
3. vzorek 1/18 PCR produkt C/T 13910
4. M – hmotnostní marker
5. vzorek 1/18 PCR produkt G/A 22018
6. vzorek 1/18 PCR produkt G/A 22018
7. vzorek 1/18 PCR produkt G/A 22018

Foto gelu:

**22.1.2018:** Restrikční štěpení

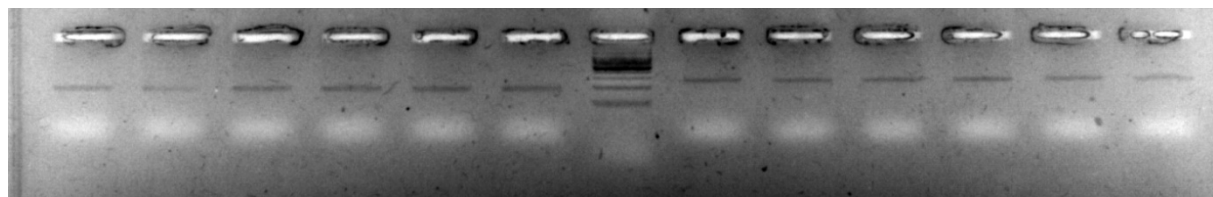


Popis gelu:

1. vzorek 1/18 restrikční štěpení C/T 13910
2. vzorek 1/18 restrikční štěpení C/T 13910
3. vzorek 1/18 restrikční štěpení C/T 13910
- M - hmotnostní marker
4. vzorek 1/18 restrikční štěpení G/A 22018
5. vzorek 1/18 restrikční štěpení G/A 22018
6. vzorek 1/18 restrikční štěpení G/A 22018

Foto gelu:

**23.1.2018:** Opakovatelnost + robustnost – PCR produkty C/T 13910 a G/A 22018



Popis gelu:

1. vzorek 1/18 PCR produkt C/T 13910 ( 2 µl DNA)

2. vzorek 1/18 PCR produkt C/T 13910 ( 2  $\mu$ l DNA)
3. vzorek 1/18 PCR produkt C/T 13910 ( 2  $\mu$ l DNA)
4. vzorek 1/18 PCR produkt C/T 13910 (1,5  $\mu$ l DNA)
5. vzorek 1/18 PCR produkt C/T 13910 ( 1  $\mu$ l DNA)
6. vzorek 1/18 PCR produkt C/T 13910 ( 0,5  $\mu$ l DNA)

M – hmotnostní marker

7. vzorek 1/18 PCR produkt G/A 22018 ( 2  $\mu$ l DNA)
8. vzorek 1/18 PCR produkt G/A 22018 ( 2  $\mu$ l DNA)
9. vzorek 1/18 PCR produkt G/A 22018 ( 2  $\mu$ l DNA)
10. vzorek 1/18 PCR produkt G/A 22018 ( 1,5  $\mu$ l DNA)
11. vzorek 1/18 PCR produkt G/A 22018 (1  $\mu$ l DNA)
12. vzorek 1/18 PCR produkt G/A 22018 ( 0,5  $\mu$ l DNA)

**Závěr: Test proběhl úspěšně ve všech měřeních. Nejnižší vstupní koncentrace DNA do PCR reakce byla 177 ng/ $\mu$ l.**

## 16 Seznam zkratek

A	adenosin
C	cytosin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ELFO	elektroforéza
DMSO	dimethylsulfoxid
G	guanin
<i>LCT</i>	gen pro laktázu
<i>MCM6</i>	minichromosome maintenance komplex komponent 6
PCR	polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)
RFLP	polymorfismus délky restrikčních fragmentů
SNP	single nucleotid polymorphism (jednonukleotidový polymorfismus)
ssDNA	single-stranded DNA (jednonukleotidová DNA)
T	thymin