

Úloha č. 4

Sekvenace části genu pro laktázu: určení laktózové intolerance

ÚVOD

Laktáza je enzym vyskytující se v trávicím traktu, přesněji v kartáčovém lemu enterocytů. Zde štěpí disacharid **laktózu** (mléčný cukr) na dva jednoduché sacharidy glukózu a galaktózu, které pak trávicí trakt dále využívá. Pokud laktáza chybí nebo má sníženou účinnost, zůstává laktóza nerozštěpená a buňky střevní sliznice ji nemohou vstřebávat. Laktóza se tak pak dostává i do dalších částí zažívacího traktu, kde je nadbytečná, což následně vyvolává zdravotní problémy. Střevo se snaží naředit svůj obsah, a proto se do střevní dutiny začne sliznicí nasávat voda, což způsobí zvětšení objemu střevního obsahu, urychlení peristaltiky a průjem. Kromě toho se nenatrávená laktóza dostává do tlustého střeva, kde představuje potravu pro přítomné bakterie, které ji začnou kvasit. Tím vzniká mnoho produktů – plyny (methan, oxid uhličitý), organické kyseliny, které dráždí střevní stěnu a vyvolávají křeče a bolesti břicha, a vodík, který se vstřebává a je vydechován plícemi, čehož se využívá při diagnostice onemocnění zvaného **laktózová intolerance**.

V současnosti trpí laktózovou intolerancí přibližně každý šestý člen populace, přičemž u jižních národů a u černé rasy bývá její četnost mnohonásobně vyšší než u obyvatelů severní Evropy. Četnost intolerance mléčného cukru stoupá s věkem, u předškolních dětí bývá vzácná, ve vyšším věku je její výskyt častější.

Nejčastější příčinou nedostatku laktázy bývá geneticky podmíněné snižování produkce tohoto enzymu se stoupajícím věkem. Nazývá se **adultní (dospělý) typ** laktózové intolerance. Stává se také, že vznik intolerance laktózy způsobí poškození sliznice střeva jinými vlivy – ta se pak nazývá **sekundární neboli získaná**. Vzniká jako důsledek infekčních průjmových onemocnění, po užívání některých léků (antibiotik) a také při některých chronických onemocněních střeva, jako je Crohnova choroba nebo celiakie. Typicky vzniká u dětí v kojeneckém věku po infekčním průjmu způsobeném rotaviry, kdy se po pokusech o znovuzavedení mléka do jídelníčku dítěte objevují průjmy. Nedostatek enzymu je však pouze dočasný, se zhojením povrchu střevní sliznice se začne laktáza opět tvořit a dítě pak může pít mléko bez dalších negativních následků.

Podezření na intoleranci laktózy se nejčastěji potvrzuje vodíkovým dechovým testem, který je založen na stanovení množství vodíku ve vydechovaném vzduchu po podání laktózy. Další variantou potvrzení diagnózy bývá určení pH průjmovité stolice, které bývá při laktózové intoleranci kyselé v důsledku vyššího obsahu organických kyselin. Lékař také může změřit hladinu cukru v krvi po podání laktózy, která bývá u laktózové intolerance málo zvýšená kvůli tomu, že nerozštěpením laktózy nevznikají jednodušší cukry, které by se vstřebaly ze střeva a glykémii by zvýšily. Nejméně používaným testem, zejména kvůli jeho náročnosti a invazivnímu charakteru,

bývá přímé stanovení enzymu ve střevní sliznici. Lékař při endoskopickém vyšetření odstříhne malý kousek sliznice tenkého střeva a v ní se pak prokazuje přítomnost nebo nepřítomnost laktázy. Onemocnění se dá léčit omezením laktózy v jídelníčku, ve výjimečných případech je nutno výrobky s obsahem laktózy úplně vyloučit. Jelikož má většina postižených ve střevě aspoň malou aktivitu laktázy, nemá potíže po konzumaci malých množství výrobků s obsahem mléčného cukru.

Ve cvičení budeme pomocí genetického analyzátoru ABI PRISM 3130 detekovat přítomnost jednobodového polymorfismu C13910T nacházejícím se v regulační oblasti genu pro laktázu, u kterého byla nalezena asociace s geneticky podmíněnou formou laktózové intolerance.

PRACOVNÍ POSTUP

I. PCR reakce

Materiál: pipety, špičky, popisovače, mikrozkušavky (0,2 ml), termocyklér, reagentie pro PCR – KAPA mix, primery (5 μ M), PCR voda, DNA.

Reakční směs pro PCR (20 μ l/vzorek):

*KAPA mix.....	12,5 μ l
FLAC primer	0,7 μ l
RLAC primer.....	0,7 μ l
PCR voda.....	10,5 μ l
<hr/>	
*DNA.....	1,0 μ l

*KAPA2G Fast HotStart ReadyMix – obsahuje HotStart DNA polymerázu, PCR pufr, dnes (0,2mM), MgCl₂ (1,5 mM), stabilizátory.

*DNA – použity izoláty z 1. cvičení

Amplifikace fragmentů:

- Mikrozkušavky vložte do termocykléru. Amplifikace bude probíhat dle následujícího programu:

	94°C	2,5 min
40x	94 °C	20 sek (denaturace)
	55 °C	20 sek (annealing)
	72 °C	20 sek (extenze)
	72°C	5 min (extenze)
	10°C	hold

II. Analýza na agarózovém gelu

- na připravený 1,5% agarózový gel naneste 10 µl amplifikované PCR směsi, přičemž do první jamky napipetujte 1,5 µl DNA standardu
- elektroforetickou vanu připojte ke zdroji elektrického napětí a nechte proběhnout elektroforézu cca 30 minut při 90 V
- poté vyjměte gel z elektroforetické vany a vložte jej do transiluminátoru ke konečnému vyhodnocení

III. Přečištění amplifikované DNA pomocí ExoSAP

Materiál: Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP), Exonuclease I *E.coli* (Exo), DNA, pipety, špičky, popisovače, mikrozkušavky (0,2 ml), termocyklér

Do zkumavky napipetujte následující reagenty, krátce promíchejte na vortexu a stočte, poté vložte do termocykléru.

Reakční směs pro přečištění (6,5 µl/vzorek):

SAP.....	1,0 µl
Exo.....	0,5 µl
<hr/>	
*DNA.....	5,0 µl

*DNA – PCR produkty

Teplotní protokol pro přečištění:

37 °C 15 min

80 °C 15 min

10 °C hold

IV. Sekvenační reakce

Materiál: BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, pipety, špičky, popisovače, mikrozkušavky (0,2 ml), termocyklér, FLAC primer (0,5 µM), PCR voda, DNA

Do zkumavky napipetujte následující reagenty, krátce promíchejte na vortexu a stočte, poté vložte do termocykléru.

Reakční směs pro sekvenační reakci (10 µl/vzorek):

sekvenační mix	2,0 µl
sekvenační pufr	2,0 µl
FLAC primer	0,6 µl
PCR voda.....	3,4 µl
<hr/>	
*DNA.....	2,0 µl

* DNA – vzorek po přečištění ExoSAP

Teplotní protokol pro sekvenační reakci:

	96 °C – 1 min
35x	96 °C – 10 sek (denaturace)
	50 °C – 5 sek (annealing)
	60 °C – 2 min (extenze)
	10 °C – hold

V. Přečištění po sekvenační reakci

Materiál: EDTA, ethanol (70%, 100%), pipety, špičky, popisovače, destička, adhezivní fólie, centrifuga, termostat, formamid, vortex, PCR produkt.

Přečištění DNA pomocí EDTA (ethylendiamintetraoctová kyselina) a ethanolu

Do destičky napipetujte 2,5 µl 125 mM EDTA, 10,0 µl vzorku po PCR a 25,0 µl 100% ethanolu. Destičku přelepte fólií a několikrát otočte, aby se směs promíchala. Následuje inkubace ve tmě po dobu 15 min při pokojové teplotě. Poté destičku centrifugujte po dobu 30 min při 3000 x g při 4 °C. Z destičky odlepte fólii a nechte ji centrifugovat dnem vzhůru na papírové utěrce po dobu 1 min 8 x g při 4 °C. Do destičky napipetujte 30 µl 70% ethanolu, přelepte fólií a centrifugujte 15 minut při 3000 x g 4 °C. Z destičky poté odlepte fólii a nechte ji centrifugovat dnem vzhůru na papírové utěrce po dobu 1 min 8 x g při 4 °C. Vložte destičku do termostatu a nechte odpařit ethanol při 95 °C cca 1 min. Přidejte 10,0 µl formamidu, destičku promíchejte na vortexu a krátce zcentrifugujte. Vzorky přeneste do nové destičky a nechte DNA zdenaturovat v termostatu cca 2 min. Zchladte destičku v mrazáku a krátce zcentrifugujte.

VI. Analýza na sekvenátoru ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer

Vzorky napipetujte do destičky na sekvenaci a spusťte sekvenátor.

Pro analýzu a vyhodnocení použijeme programy 3130 Data Collection v3.0 a Sequencing Analysis 5.3.1.