

**Utprøving og validering av in-house
prosedyre for påvisning av
laktoseintoleranse ved bruk av real-time
PCR**

**Inger Karine Ambjørnsen
Camilla Frogner**

**Høgskolen i Østfold
Oppdragsrapport 2012:1**

Online-versjon (pdf)

Utgivelsessted: Halden

Det må ikke kopieres fra rapporten i strid med åndsverkloven og fotografiloven eller i strid med avtaler om kopiering inngått med KOPINOR, interesseorgan for rettighetshavere til åndsverk.

Høgskolen i Østfold har en godkjenningsordning for publikasjoner som skal gis ut i Høgskolens Rapport- og Arbeidsrapportserier.

Rapporten kan bestilles ved henvendelse til Høgskolen i Østfold.
(E-post: postmottak@hiof.no)

Høgskolen i Østfold. Oppdragsrapport 2012:1

© Forfatteren/Høgskolen i Østfold

ISBN: 978-82-7825-362-5

ISSN: 1504-5331

Prosjekt ansvarlige:

- Styringsgruppe: Divisjonsdirektør Tore Krogstad,
Sykehuset Østfold
Divisjonsrådgiver Anne S. Jansen,
Sykehuset Østfold
Avd. overlege Leif Wille, Sykehuset Østfold
Studieleder Elin G. Kristensen,
Høgskolen i Østfold
- Medisinsk faglig ansvarlig: Avd. overlege Leif Wille, Sykehuset Østfold
- Prosjektleder: Høgskolelektor Inger Karine Ambjørnsen,
Høgskolen i Østfold
- Prosjektgruppe: Avd. overlege Leif Wille, Sykehuset Østfold
Seksjonsleder Kari Østenby, Sykehuset Østfold
Bioingeniør Camilla Frogner, Sykehuset Østfold
Høgskolelektor Inger K. Ambjørnsen,
Høgskolen i Østfold
- Praktisk utførelse: Bioingeniør Camilla Frogner, Sykehuset Østfold
Høgskolelektor Inger K. Ambjørnsen,
Høgskolen i Østfold

Innholdsfortegnelse

1.0 Innledning.....	5
2.0 Teori	7
2.1 Laktase og laktoseintoleranse	7
2.1.1 Melkeallergi.....	9
2.2 Laktasegenet og MCM6.....	10
2.2.1 C/T-13910 og Oct-1	12
2.3 Påvisning av laktoseintoleranse	12
2.3.1 Pusteprøve	12
2.4 DNA-ekstraksjon	13
2.5 Polymerase Chain Reaction	14
2.5.1 DNA-polymerase.....	15
2.5.2 Primere	15
2.6 Real-time PCR	17
2.6.1 FRET Prober.....	17
2.6.2 Smeltekurveanalyse.....	19
3.0 Materiale og metode.....	25
3.1 Materiale	25
3.2 Metode	25
3.2.1 Ekstraksjon av DNA.....	25
3.2.2 Real-time PCR med Roche LightCycler 2.0	29
4.0 Resultater.....	31
4.1 Resultater fra utvikling av in-house metoden.....	31
4.2 Resultater fra klinisk validering.....	34
4.3 Resultater fra sekvensering.....	37
5.0 Diskusjon.....	39
6.0 Konklusjon	43
Vedlegg.....	45
Vedlegg 1: Reagenser til ekstraksjon	46
Vedlegg 2: Ekstraksjon av DNA fra EDTA-blod.....	47
Vedlegg 3: Preparering av mastermix	49
Vedlegg 4: Stock- og bruksløsning av primere og prober.....	50
Vedlegg 7: Sensitivitet.....	53
Vedlegg 8: Repeterbarhet.....	54
Vedlegg 9: Repeterbarhet for positiv og negativ kontroll	57
Vedlegg 10: Presisjon	58
Vedlegg 11: Robusthet angående preanalytiske faktorer	60
Vedlegg 12: Relativ nøyaktighet	61
Vedlegg 14: Sammenligning av resultat fra.....	65
Litteraturliste	67

1.0 Innledning

Nye molekylærbiologiske analyser og ny teknologi gir større sikkerhet i analyseresultater, og vil i fremtiden være en nødvendig videreutvikling av laboratorienes analysetilbud som grunnlag for rask og riktig diagnostisering og behandling av pasienter. Det er i denne forbindelse behov for å innføre flere genteknologiske analyser ved Sykehuset Østfold (SØ). Ved diagnostikk av primær laktoseintoleranse ved Seksjon for Medisinsk Biokjemi benyttes i dag laktosetoleranse test. Det har vist seg at hos barn kan laktosetoleransetesten gi opptil 30 % falske positive prøver Andre analyser som kan benyttes er bl.a. hydrogen pusteprobe, men den er også positiv ved bakteriell overvekst i tarm. Måling av laktaseaktivitet i tynntarmsbiopsi anses for å være en god test, men den er komplisert på grunn av invasiv teknologi. Genetisk analyse som real-time Polymerase Chain Reaction (real-time PCR) av laktasegenet anbefales som en primær test ved mistanke om laktoseintoleranse. Det var derfor av interesse for Sykehuset Østfold å utvikle en real-time PCR in-house metode for genotyping av nukleotidet (MCM6 C-13910T) for å påvise laktoseintoleranse eller ikke. Det ble opprettet et samarbeidsprosjekt mellom Sykehuset Østfold, Seksjon for Medisinsk Biokjemi og Molekylærbiologisk Forsknings og Utviklingslaboratorium (MBL) ved Høgskolen i Østfold (HiØ). Samarbeidet om dette utviklingsprosjektet startet i 2010, og våren 2011 var en in-house metode basert på real-time PCR etterfulgt av smeltekurve utarbeidet og validert.

Dette utviklingsprosjektet ad. laktoseintoleranse genererte også et Bachelorprosjekt for Bioingeniørstudenter våren 2010. Studentprosjektet hadde som målsetning å genotype MCM6 C-13910T ad. laktoseintoleranse ved bruk av et kommersielt kit fra firmaet TibMolbiol, Berlin. Resultatene de oppnådde har

vært til god nytte, det gjelder analysesvarene, samt rapporten som de utarbeidet. Teoridelen er benyttet i denne rapporten. Bioingeniørstudentene var Jan Eddie Linnom, Ina Kristine Michalsen, Rojan Haji Abbasi og Ida Askjem Andersen.

Det praktiske arbeidet med utviklingsprosjektet ved MBL ad. laktoseintoleranse ble gjennomført høsten 2010, og prosjektet ble avsluttet våren 2011.

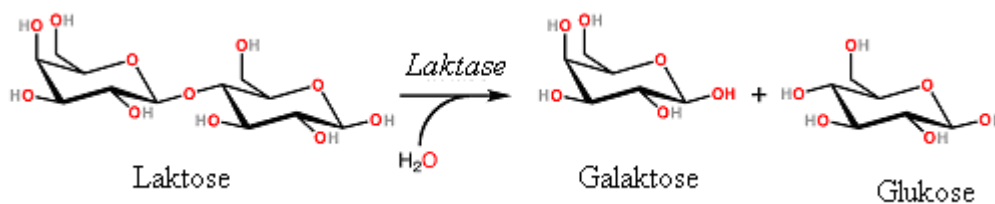
Utviklingsprosjektet hadde to hovedmålsetninger:

- 1: Utvikle og validere en in-house prosedyre basert på real-time PCR med Fluorescens Resonance Energy Transfer (FRET) prober og deteksjon av villtype C og mutert type T i MCM6 genet (C/T-13910).
- 2: In-house prosedyren skal være til bruk ved Sykehuset Østfold.

2.0 Teori

2.1 Laktase og laktoseintoleranse

I Nord- og Vest- Europa har melk lenge vært en viktig del av kostholdet. Melk inneholder disakkaridet laktose, som er et disakkarid bygget opp av de to monosakkaridene galaktose og glukose, som vist i figur 1. For at kroppen skal kunne ta opp laktose i tynntarmen, er man avhengig av at laktosen blir spaltet til to monosakkarider. Spaltingen av laktose utføres av det spesifikke enzymet laktase, som i hovedsak finnes langs membranene på enterocytene, som utgjør veggene i tynntarmen (1). Laktase arbeider optimalt ved en temperatur på 25 °C, og en pH på 6. Reaksjonsligningen for nedbryting av laktose er: $C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O \rightarrow C_6H_{12}O_6 + C_6H_{12}O_6 + \text{varme}$.



Figur 1. Laktosemetabolisme, der laktose spaltes til monosakkaridene galaktose og glukose ved hjelp av enzymet laktase.

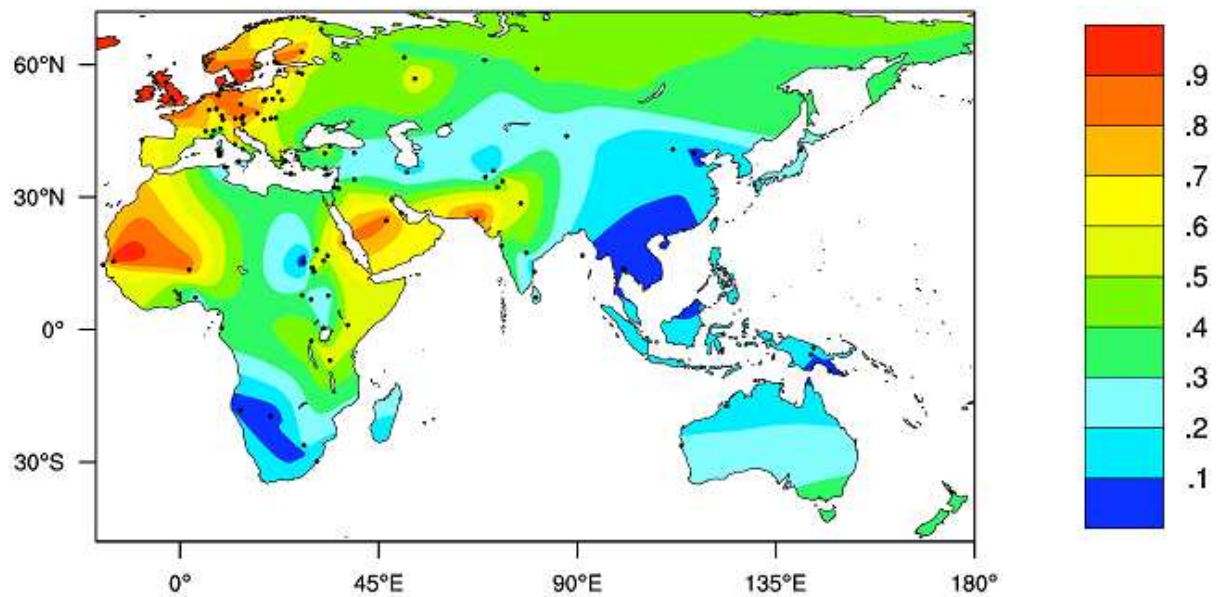
Over hele verden er det vanlig at nyfødte barn tåler melk, men at laktaseproduksjonen raskt avtar etter endt ammingsperiode (2). Det finnes tre typer laktoseintoleranse: primær, sekundær og kongenital. Primær laktoseintoleranse er den tilstanden som er direkte relatert til arv. Sekundær kan oppstå som følge av for eksempel sykdom som cøliaki, tarminfeksjon og tynntarmsbetennelse. Kongenital laktoseintoleranse er en variant av laktoseintoleranse hvor man mangler laktase fra fødselen (3). Målet med denne oppgaven er å detektere primær laktoseintoleranse, som er genetisk betinget.

Inntak av melk hos personer med laktoseintoleranse eller lav laktaseaktivitet kan gi symptomer som varierer fra svake symptomer som romling i magen, følelse av oppblåsthet og liknende til mer alvorlige symptomer som sterk flatulens, kraftige magesmerter og diaré.

Utbredelse av laktoseintoleranse varierer med ulike folkeslag.

Laktoseintoleranse er minst utbredt i Nord- og Vest-Europa. Eksempelvis er bare 3 til 5 % av befolkningen i Skandinavia laktoseintolerante. Andre land i dette området hvor man har talldata inkluderer Finland (17 %), Storbritannia (5 – 15 %), Tyskland (15 %), Østerrike (15 - 20 %) og Nord-Frankrike (17 %). I Sør-Europa er laktoseintoleranse mer utbredt. Eksempler på prosentvis antall av befolkningen som har laktoseintoleranse har man fra Sør - Frankrike (65 %), Italia (20 – 70 %) og Balkan (55 %). I andre verdensdeler er laktoseintoleranse mer utbredt. I Afrika er størstedelen av befolkningen laktoseintolerante (70 – 90 %). Noen folkeslag her, som for eksempel Beduiner, Tuareg og Fulani, har betraktelig lavere andel laktoseintolerante (10 - 25 %). Dette kan skyldes at disse folkeslagene har en annen matkultur. I Asia er også andelen laktoseintolerante stor, med 80 % i sentral Asia, 90 – 100 % i Øst-Asia og 70 % i Sør - India. I Amerika er det noe mer sparsomt med tallmateriale, i tillegg er størsteparten av befolkningen innvandret fra andre verdensdeler. Hos den amerikanske urbefolkningen er andelen laktoseintolerante derimot opp mot 100 % (2,4).

Figur 2 viser et kart som angir spredningen av laktosetolerant befolkning i Europa, Asia og Afrika. Blå farge angir steder der en lav andel av befolkningen har laktosetolerant fenotype, det vil si høy andel laktoseintoleranse. Rød farge angir steder der en høy andel av befolkningen har laktosetolerant fenotype (2).



Figur 2. Kart som viser prosentvis spredning av laktosetolerant befolkning, gradert fra blå farge (svært få personer med laktosetoleranse) til rød farge (svært mange personer med laktosetoleranse).

Primær laktoseintoleranse avgjøres av genmutasjoner. Hos personer med laktoseintoleranse, finner man at base nummer 13910 oppstrøms fra laktasegenet er Cytosin (C). Hvis C her i stedet er erstattet med en Tymin (T), er det assosiert med laktosetoleranse (5). Denne mutasjonen er arvelig, autosomal og dominant og resulterer i at man beholder evnen til å fordøye melkesukkeret laktose også i voksen alder. Etersom mutasjonen er dominant fører dette til at en person som har heterozygot genotype, det vil si at et gen har mutasjonen og ett har det ikke, vil være laktosetolerant.

2.1.1 Melkeallergi

Det er viktig å skille mellom melkeallergi og laktoseintoleranse. Melkeallergi er en allergisk immunreaksjon mot proteiner i kumelk, som ellers er ufarlig for ikke-allergikere. Laktoseintoleranse er en ikke-allergisk sensitivitet som skyldes

mangel på enzymet laktase. Melkeallergi oppstår som regel hos spedbarn, men forsvinner igjen i løpet av de første leveårene (6).

2.2 Laktasegenet og MCM6

Laktase kodes for av genet laktaseflorizinhidrolase (LPH). Dette genet er aktivt fram til 8 til 12 års alder, hvor laktoseintoleranse inntreffer hvis aktiviteten avtar. Genet befinner seg på kromosom 2. Det er til nå ikke funnet noen mutasjoner i selve laktasegenet som har sammenheng med laktoseintoleranse (4).

Genet Mini-Chromosome Maintenance 6 (MCM6) ligger oppstrøms for laktasegenet. Genet inneholder to regulerende regioner for laktasegenet, og det er i disse det funnet mutasjoner som er relatert til laktoseintoleranse. Spesielt regionen rundt 13910 basepar (bp) ovenfor laktasegenet har vist seg å være en enhancer-region som kan aktivere transkripsjon av laktasegenets promoter. MCM6-proteinet er et protein som innehar en helicaseaktivitet. Det spiller en viktig rolle i start- og forlengelsesfasene i DNA-replikasjonen (7). Mutasjonene det dreier seg om er singlenukleotide polymorfismer (SNP). Det vil si at et enkelt nukleotid er byttet ut med et annet. Det er funnet flere SNP som kan være relevante for laktoseintoleranse. En av disse er den såkalte C/T-13910 mutasjonen. C/T indikerer at det dreier seg om et nukleotid som enten er en C eller en T, og tallet etter indikerer hvor mange basepar ovenfor laktasegenet mutasjonen befinner seg.

I tillegg til C/T-13910 er det også funnet at G/C-14010, T/G-13915 og C/G-13907 er relaterte til laktoseintoleranse. C/T-13910 er den som ser ut til å ha

størst betydning for laktosetoleranse i Europa og Asia. T/G-13915 mutasjonen er funnet i noen andre områder hvor andelen av befolkningen som kan fordøye laktose er høy, og da spesielt i området Saudi-Arabia (8). C/G-13907 er en mutasjon som har oppstått i Øst-Afrika området. I tillegg til at det er flere forskjellige mutasjoner som hver for seg kan gi laktosetoleranse, det ikke over alt sammenhengen mellom kjente mutasjoner og fenotype laktosetoleranse er like klar. Dette gjelder til en viss grad over hele verden, men mest av alt et område i Vest-Sahara, hvor sammenhengen er spesielt dårlig (2).

Området i MCM6 hvor mutasjonen befinner seg har følgende baserekkefølge, som vist i figur 3.

```

AGAGCAGAGA TAAACAGATT TGTTGCATGT TTTTAATCTT TGGTATGGGA CATACTAGAA
TTCAGTCAA ATACATTTTT ATGTAAGTGT TGAATGCTCA TACGACCATG GAATTCTTCC
CTTTAAAGAG CTTGGTAAGC ATTTGAGTGT AGTTGTTAGA CGGAGACGAT CACGTCATAG
TTTATAGAGT GCATAAAGAC GTAAGTTACC ATTTAATACC TTTCAATCAG GAAAAATGTA
CTTAGACCCT ACAATGTACT AGTAGGCCTC TCGCCTGGCA ATACAGATAA GATAAATGAG
Y
CCCTGGCCTC AAAGGAACTC TCCTCCTTAG GTTGCATTTG TATAATGTTT GATTTTTAGA
TTGTTCTTTG AGCCCTGCAT TCCACGAGGA TAGGTCAGTG GGTATTAACG AGGTAAGG
GGAGTAGTAC GAAAGGGCAT TCAAGCGTCC CATCTTCGCT TCAACCAAAG CAGCCCTGCT
TTTTCTAGT TTTATTAATA GGTGATGATGT AAGGTCGCT TTGAAAAGGG GGTGTTGGCTT
TTTTTTACAG TGTGACTGAG GTATAATTTA TAAAAAGGGA AATGTATGGC ATGGTGAGTT

```

Figur 3. Gensekvensen viser baserekkefølgen i MCM6-genet. Rød base angir C/T-13910 mutasjonens plassering. Basene markert med grønt, angir andre SNP som er funnet relevante for laktosetoleranse. Områdene markert i gult angir områder for foreslåtte primere.

Bokstaven Y i figuren signaliserer lokasjonen for C/T-13910 mutasjonen. Y betyr at det skal være enten en C eller en T på denne plassen. Forøvrig er noen av de andre mulige mutasjonene merket med grønt. For å detektere mutasjonen C/T-13910 trenger man primere som er posisjonert slik at man får amplifisert en gensekvens omkring den aktuelle mutasjonen. Primere angir start og slutt på gen sekvensen som skal amplifiseres i løpet av PCR-prosessen. Det finnes flere tilgjengelige verktøy, eller Primer Designing Tools, som hjelper til med å finne primere som kan benyttes. I en av disse var det foreslått flere litt forskjellige

primere innenfor områdene merket i gult. Hvilken primer som er benyttet i kitet som anvendes er usikkert, da dette ikke var oppgitt noe sted av produsenten.

2.2.1 C/T-13910 og Oct-1

Mutasjonen C/T-13910 er, som nevnt, den som vanligvis er relatert til laktosetoleranse blant den europeiske- og asiatiske befolkningen. Forsøk viser at komplekset Octamer Transcription Factor-1 (Oct-1) har høyere affinitet for T-13910 enn C-13910. Oct-1 regulerer genetisk transkripsjon. Oct-1 kalles også for "POU domain class 2, transcription factor 1", og tilhører en familie med "POU domain factors" som binder seg til sekvensen ATTTGCAT i promoter- og enhancer-regioner for å regulere uttrykkelsen av gener. Oct-1 genet uttrykkes i alle celler.

Forsøk viser at binding av Oct-1 på denne plassen gir økt laktase promoteraktivitet. Dette kan være en forklaring på hvorfor denne mutasjonen fører til en laktosetolerant fenotype.

2.3 Påvisning av laktoseintoleranse

2.3.1 Pusteprobe

I dag er en vanlig måte å teste etter laktoseintoleranse å utføre en H₂-pusteprobe. Denne bygger på at laktose hos personer med laktoseintoleranse ikke vil absorberes i tynntarmen, men heller fortsette til tykktarmen. Der vil bakterier bryte ned noe av laktosen, og et avfallsprodukt fra bakteriene vil være hydrogen. Denne gassen tas opp i blodbanen, og vil til slutt gå til lungene og deretter pustes ut. Man måler så mengden hydrogen i utåndingsluften. Hos

personer uten laktoseintoleranse vil den målte verdien vanligvis ligge rundt 2-5ppm. Hvis pasienten har laktoseintoleranse, vil det derimot kunne måles verdier mellom 30-100ppm (9). Det er imidlertid ikke slik at bakteriene hos alle personer produserer hydrogen. Det kan dermed bety at en lav verdi ikke kan utelukke intoleranse med 100 % sikkerhet. For å påvise et falskt negativt svar, kan man innta en mengde av det ikke-opptakbare disakkaridet laktulose. Hvis man etter 45 til 180 minutter ikke kan påvise produksjon av hydrogen gass, betyr det også at bakteriene ikke kan produsere det. Dette kan tyde på at svaret fra pustep prøven, i forbindelse med laktoseinntak, kan ha vært falskt negativt.

2.3.2 Tynntarmsbiopsi

En tynntarmsbiopsi for påvisning av laktaseenzymaktivitet er den eneste direkte målemetoden for laktasemangel (10). Her tas det en biopsi fra tynntarmen, og denne analyseres for laktase ved hjelp av immunhistokjemi. En biopsi må gjøres med endoskopisk inngrep, og er derfor en invasiv prosedyre. Det er derfor ikke praktisk å utføre dette som en standard analysemetode.

2.4 DNA-ekstraksjon

For å kunne utføre en genanalyse, må man ekstrahere DNA som man kan benytte til analysen. I vårt tilfelle er prøvematerialet EDTA-fullblod. Som kjent er den mest dominante celletypen i fullblod erytrocytter, men ettersom dette er celler uten cellekjerne finnes det heller ikke DNA i dem. Vi må derfor ekstrahere DNA fra leukocyter. Det finnes mange ulike metoder for å ekstrahere DNA, noen er manuelle metoder, andre er halvautomatiske

Prinsippet for metoden er at cellene lyses, hvorpå DNA som frigjøres fra leukocytene vil binde seg til glassfibere i et filter. Etter å ha vasket bort urenheter, tilsettes et stoff som får DNAet til å løsne fra glassfibrene, og dermed samles opp i en beholder. Kitet inneholder også reagens til å ekstrahere DNA fra andre celler, men dette skal ikke vi benytte oss av i dette arbeidet.

2.5 Polymerase Chain Reaction

Polymerase Chain Reaction (PCR) er en metode som ble utviklet i 1984 av Kary Mullis (11). Det er en mye brukt metode for å amplifisere DNA og metoden benyttes både innenfor forskningslaboratorier og kliniske laboratorier. DNA står for Deoxyribo Nucleic Acid, og er cellens arvemateriale. DNA er en heliks bestående av to tråder, hvor hver av trådene er nukleotider satt sammen i lange kjeder. Hvert nukleotid er igjen bygget opp av deoksyribose, fosfat og en base. For DNA finnes det fire forskjellige baser. Disse er Adenin (A), Thymin (T), Cytosin (C) og Guanin (G). Av disse er A komplementær med T, og C komplementær med G. Basene holder de to trådene sammen ved hjelp av hydrogenbindinger.

Målet med PCR-metoden er å amplifisere et stort antall av en gitt DNA-sekvens, eller et såkalt templat, som bestemmes av hva slags primere som benyttes. Metoden benytter reagenser som inneholder store mengder med primere, termostabil DNA-polymerase (Taq Polymerase) og nukleotider.

2.5.1 DNA-polymerase

DNA-polymerase er et enzym som katalyserer reaksjonen hvor frie nukleotider basepares til en eksisterende DNA-tråd. Enzymet er kanskje mest kjent for å ha en sentral rolle i DNA-replikasjonsprosessen. Enzymet virker ved at det "leser" en eksisterende tråd som templat, og kobler på korrekt komplementær base. Det finnes flere forskjellige typer DNA-polymerase i både eukaryotiske og prokaryotiske celler. Det er viktig at polymerasen er termostabil for at den ikke skal denatureres ved temperaturene som benyttes for å denaturere DNA-heliksen. DNA-polymerase gjør også proofreading av den nye dobbelttråden, for å være sikker på at korrekt korresponderende base er festet til den opprinnelige tråden.

2.5.2 Primere

Primere er korte nukleotidsekvenser som angir hvor syntesen av DNA skal starte. I og med at DNA-polymerase bare kan tilføye nukleotider på en allerede påbegynt tråd, trenger man primere for å starte syntesen (12). Det benyttes to forskjellige primere. Den ene definerer starten på ønsket sekvens. Den andre primeren definerer slutten på ønsket sekvens. En primer må lages for primærtråden, og den andre for sekundærtråden. Dessuten er det viktig at primeren er av optimal lengde, det vil si 18 til 30 bp, og spesifikk nok til at man unngår hybridisering med andre områder på DNA-tråden, da dette kan føre til at feil DNA sekvens blir kopiert. Den ideelle smeltetemperaturen for primere er 58 °C til 65 °C, med forskjell i smeltetemperatur mellom de to primerne på mindre enn 3 °C (13).

2.5.3 Prinsipp for PCR

Prinsippet for PCR består av tre hovedtrinn:

- 1) Denaturering av DNA-tråden gjøres ved oppvarming til 94 °C. Da brytes hydrogenbindingene mellom de to komplementære trådene, og trådene skilles fra hverandre.
- 2) Reaksjonsløsningen kjøles så ned til ca. 55 °C, avhengig av hvilke primere som benyttes. De to primerne fester seg til et komplementært område på den denaturerte tråden, og definerer dermed hvor DNA-polymerasen skal starte. Denne prosessen kalles hybridisering eller annealing.
- 3) Temperaturen økes så til 72 °C, og nukleotidene blir ved hjelp av DNA-polymerasen koblet på trådene ved komplementær baseparing. Resultatet er to dobbelttråder, hvor hver har en gammel og en ny tråd.

Deretter gjentas prosessen til man har oppnådd ønsket amplifisering av templatet.

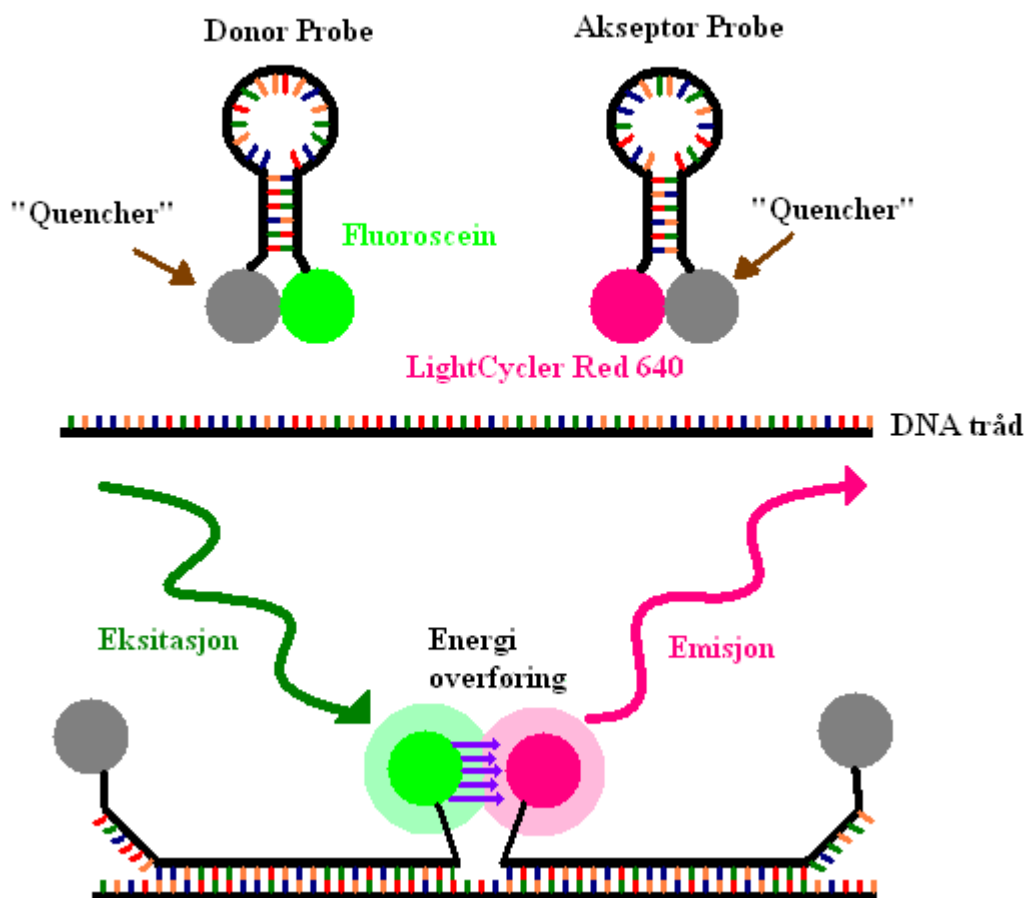
2.6 Real-time PCR

Real-time PCR er en teknikk som bygger på den tradisjonelle PCR-metoden. Den kalles real-time fordi det i stedet for å samle inn data ved endepunkt, som ved vanlig PCR, blir innhentet data under selve amplifikasjonen (1). Med real-time PCR utføres både amplifisering, detektering og kvantitering samtidig, og i et og samme rør. Dette gjør det hele mer brukervennlig sammenliknet med konvensjonell PCR, hvor det må utføres en egen kvantitativ prosess. Deteksjonen baserer seg på bruk av fluorescerende signalstoffer, også kalt fluoroforer og spektrofluorimetrisk avlesning. Det finnes flere ulike måter å utføre real-time PCR på, men i dette prosjektet blir det benyttet doble Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) prober i kombinasjon med smeltepunktsanalyse. Under analyse med bruk av FRET prober vil det dannes en amplifikasjonskurve som viser kvantitering av amplifisert genmateriale. Dette skyldes at probene midlertidig fester seg på gensekvensene under annealingfasen, og dermed avgir signal som måles. Deretter løsner probene igjen i denatureringsfasen. Det lages så en kurve som viser målt fluorescens over tid, og denne kurven kalles amplifikasjonskurve. Ved amplifikasjon av ønsket templat, vil man få en stigende kurve, som så etter hvert avtar noe. Hvis det ikke blir amplifisert templat, eller det blir amplifisert et annet templat enn det probene er beregnet for, vil man bare få en støyfylt kurve, som ikke har noen markant stigning. I denne metoden, blir det amplifisert et 156 bp langt templat.

2.6.1 FRET Prober

Prinsippet for doble FRET prober illustreres i figur 5. Det benyttes prober, som er korte DNA-sekvenser, som har fått en fluorofor festet til seg i den ene

enden og en quencher i den andre enden. En fluorofor er en komponent av et molekyl som gjør molekylet fluorescent. Det vil si at molekylet vil absorbere lys av en spesifikk bølgelengde, og så emittere lyset igjen med en annen, men like spesifikk, bølgelengde. En quencher er en substans som absorberer eksitasjonsenergien fra en fluorofor, og frigjør energien som varme (14). Denne hindrer at proben sender ut lys før tråden har hybridisert med templatet. Den ene proben kalles donor probe, og har en quencher festet i 3' retningen og en fluorofor av typen fluorescein i 5' retningen. Den andre proben kalles en akseptor probe, og har en quencher i 3' retningen, og en fluorofor av typen LightCycler Red 640 i 5' retningen. Fluoresceinen eksiteres av lys med en spesifikk bølgelengde utenfra, og emitterer lys av en annen bølgelengde som igjen eksiterer LightCycler Red 640 på den andre proben. Det emitterte lyset fra akseptorproben registreres av et fluorometer. Dette krever imidlertid at de to merkelappene står nær hverandre, helst en til fem basepar. Ettersom produsenten ikke har oppgitt noen detaljer om probene vi har benyttet, vet vi ikke hvor mange basepar avstand det er i denne metoden. Probene syntetiseres derfor slik at de binder seg til to sekvenser rett etter hverandre, med de to merkelappene stående mot hverandre. Signalet ut fra donorproben er av en annen bølgelengde enn signalet inn. Siden akseptorproben er avhengig av å bli ladet opp av donorproben, vil det si at det bare er mulig å måle et signal ut hvis begge er bundet. Bruk av FRET prober gir også mulighet for smeltekurveanalyse.



Figur 5. Figur som viser prinsippet for dobbel-FRET probe. Lys inn eksiterer fluorosceinen på donorproben, som så sender ut lys i en frekvens som eksiterer LightCycler Red 640 på akseptorproben, som igjen sender ut lys som detekteres av et fluorometer.

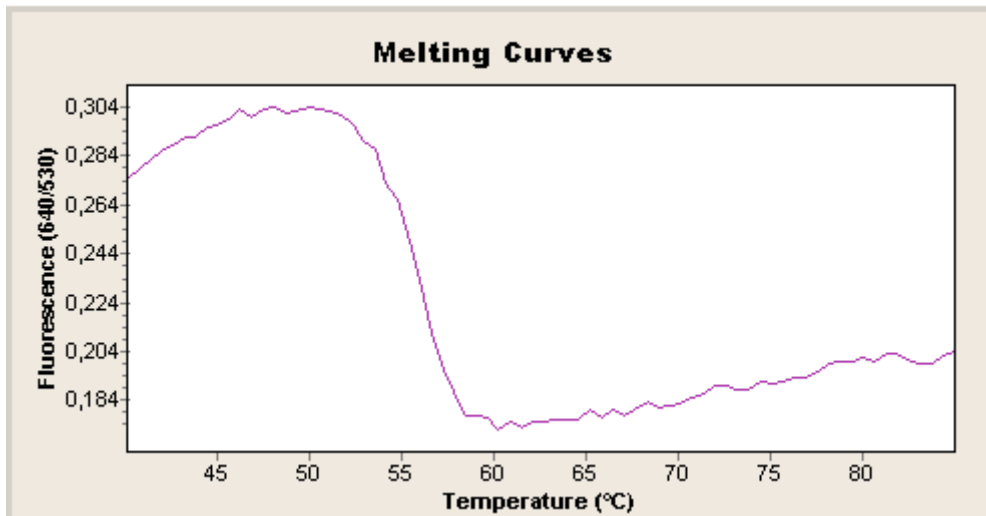
2.6.2 Smeltekurveanalyse

Smeltekurveanalyse er en analyse som kan gjøres i sammenheng med blant annet anvendelse av FRET prober. Dette gjøres for å kunne finne genotypen til DNA-sekvensen.

Prinsippet for metoden, er at probene vil løsne fra DNA-tråden når temperaturen blir høy nok. Temperaturen som trengs for å få dette til å skje, er imidlertid avhengig av bindingene mellom proben og templatet. Hvis alle basene på proben er tilkoblet en korresponderende base på DNA-tråden, vil det trengs høyere temperatur for å skille de enn det trengs hvis enkelte baser

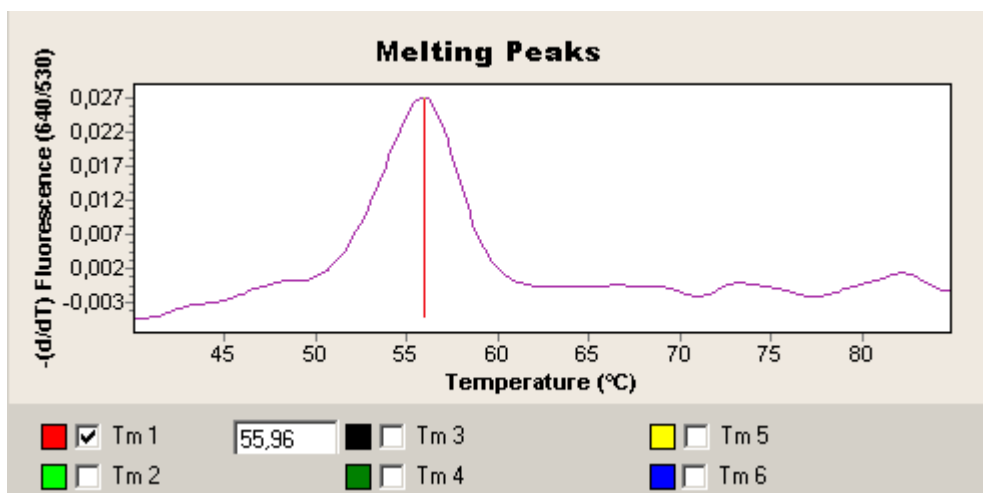
ikke bindes. Proben som benyttes i Bachelorprosjektet 2010 er komplementær til en DNA-tråd som inneholder genotypen T-13910. Hvis en DNA-tråd har genotypen C-13910, det vil si at genotypen er forenelig med laktoseintoleranse, vil det være en av basene som ikke har en komplementær base på proben å binde seg til. Dette vil gjøre at proben lettere løsner fra DNA-templatet og at smeltepunkttemperaturen blir lavere. Smeltepunktene for denne metoden er oppgitt av produsent til å være 56 °C for genotype C-13910, og 61,5 °C for genotype T-13910.

Smeltekurven gjør det mulig å oppdage SNP, ved at man kan finne smeltepunktet for et templat, og sammenlikne dette med de kjente smeltepunktene for de ulike genotypene. I tilfeller med homozygot genotype, vil man kunne få ett enkelt smeltepunkt. Ved heterozygot genotype, vil det bli to forskjellige smeltepunkt. Selve metoden går ut på at man gradvis øker temperaturen, og kontinuerlig overvåker fluorescensen. Fluorescensen vil da være høyest i starten, og etter hvert som temperaturen når et visst punkt vil prøber begynne å løsne fra DNA-sekvensene i prøvene. Prosessen vil gi en kurve som i figur 6.



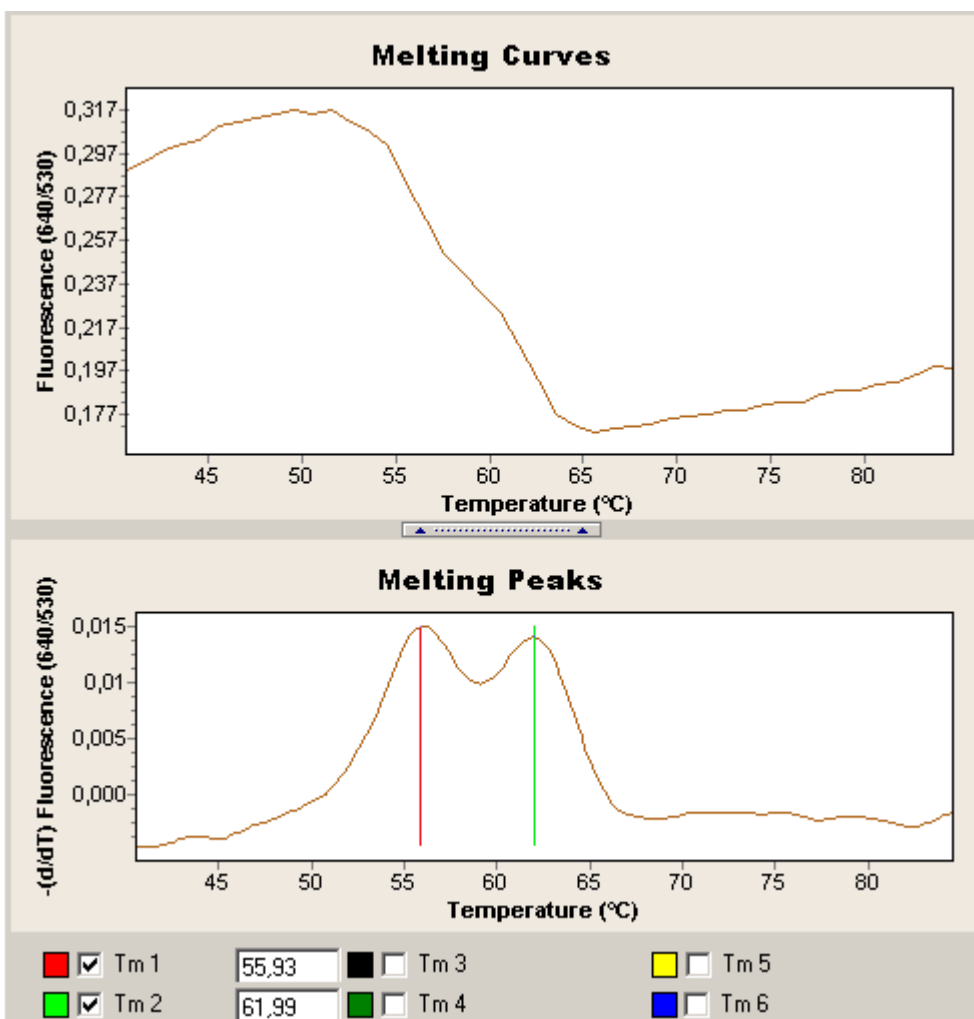
Figur 6. Smeltekurven for en homozygot C-13910 viser hvordan fluorescensen starter med en høy verdi, for så å falle raskt, med et vendepunkt underveis.

Ved homozygot genotype, vil hastigheten fluorescensen avtar med øke brått, fram til den når et visst punkt hvor hastigheten avtar. Deretter vil etter hvert kurven flate ut. Punktet som regnes som smeltepunkt, er der hastigheten som fluorescensen avtar med snur fra økende til minkende. Ved å benytte den deriverte av smeltekurven, en såkalt smeltepunktcurve, er det lettere å se hvilken temperatur toppen ligger på. Dette illustreres i figur 7.



Figur 7. Smeltepunktcurve for homozygot C-13910 viser den deriverte av smeltekurven i figur 6. Den røde streken indikerer posisjonen for toppunktet for kurven.

Ved heterozygote genotyper, vil det være to krumninger på smeltekurven, noe som også vil bety to topper på smeltepunkt kurven. Posisjonen til toppene angir da de to forskjellige genotypene. Dette er illustrert i figur 8, ved både smeltekurve og smeltepunkt kurve.



Figur 8. Smeltekurven og smeltepunkt kurven for en heterozygot prøve viser hvordan man får to forskjellige smeltepunkt.

Smeltepunktanalyse kan gjøres samtidig som selve real-time PCR-metoden utføres. Dette gjøres ofte i vitenskapelige laboratorier, men i kliniske laboratorier er det mest vanlig å utføre dette etter endt PCR-prosess (10).

I analysen av C/T-13910 mutasjonen i MCM6-genet, vil det være to aktuelle smeltepunkt. Ved genotypen C-13910, som er forenelig med

laktoseintoleranse, vil smeltepunktet være på 56 °C. Ved genotypen T-13910, som er forenelig med laktosetoleranse, vil smeltepunktet være på 61,5 °C. Heterozygot genotype vil ha smeltepunkt ved begge disse temperaturene.

NB!

Smeltepunkttemperaturene for de ulike genotypene i MCM6-genet som oppgis i Bachelorprosjektet kan ikke sammenlignes med smeltepunkttemperaturene ved in-house metoden. Årsaken er at baserekkefølgen i probene ikke er identiske i de to prosedyrene.

3.0 Materiale og metode

Teoridelen i denne rapporten er som tidligere nevnt hentet fra et Bachelorprosjekt 2010, men materiale og metode er fra utviklingsprosjektet ved MBL som skulle utvikle og validere en in-house metode basert på real-time PCR med Fluorescens Resonance Energy Transfer (FRET) prober og deteksjon av villtype C og mutert type T i MCM6 genen (C/T-13910). Metoden skal være til bruk ved Sentralsykehuset Østfold.

3.1 Materiale

Prøvematerialet er EDTA-blod fra 69 personer. Prøvene ble anonymiserte i forhold til navn og alder. Hos fire av disse 69 personene var det tidligere påvist laktoseintoleranse enten ved hjelp av tynntarmsbiopsi eller genteknologisk analyse ved et annet laboratorium. Prøvemateriale fra disse fire personene fikk prøve nr. 1, 4, 5 og 6.

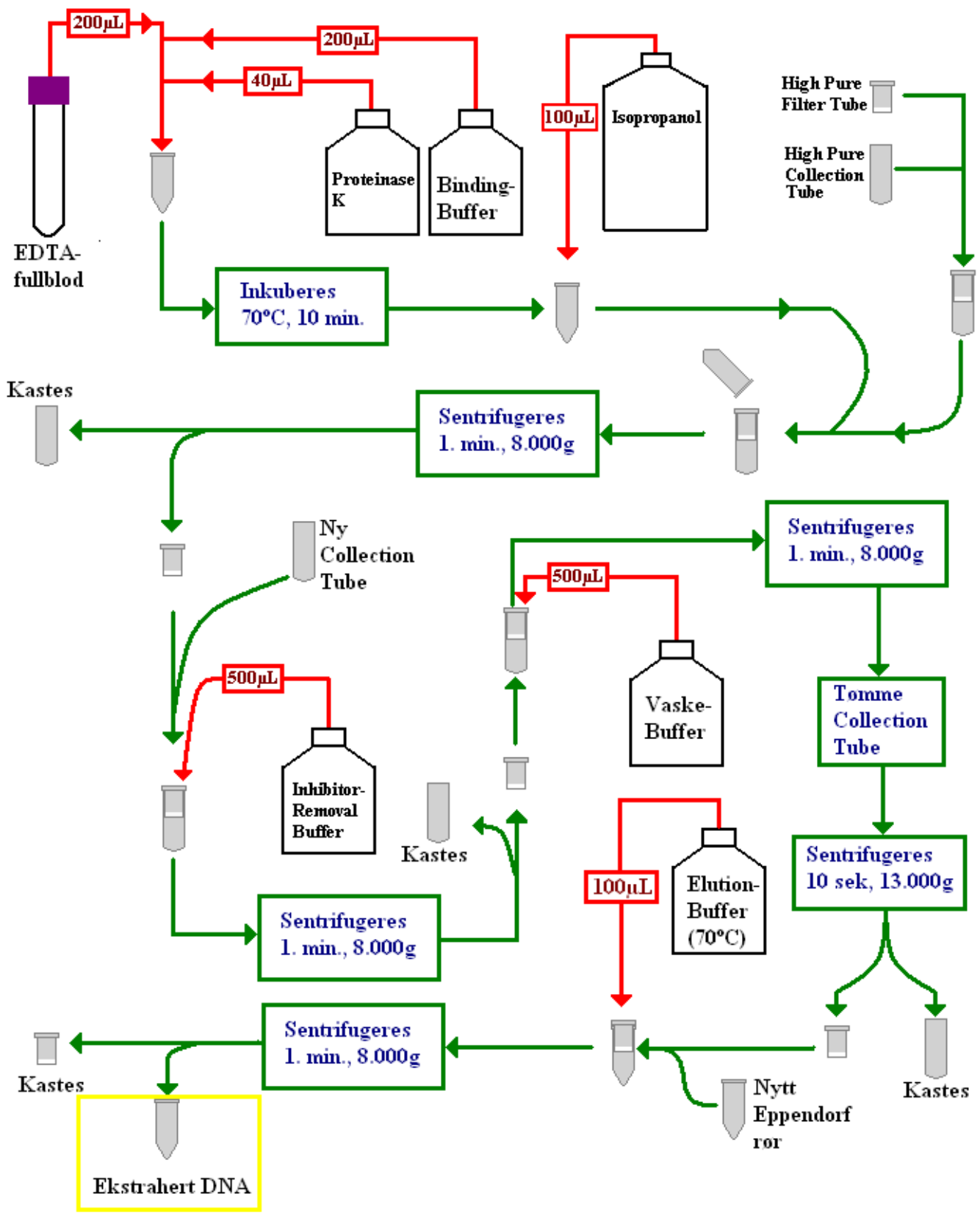
3.2 Metode

3.2.1 Ekstraksjon av DNA

For å ekstrahere DNA ble det benyttet et kit, High Pure PCR Template Preparation Kit, (Roche). Før selve ekstraksjonen av DNA starter, tilsettes to av reagensene i kitet absolutt alkohol (Arcus). Inhibitor Removal Buffer tilsettes 20 ml absolutt alkohol (Arcus) og vaskebufferen tilsettes 80 ml absolutt alkohol (Arcus). Proteinase K løses opp med 4,5 ml sterilt vann (Fresenius Kabi) og blandes godt.

For å ekstrahere DNA ble 200 µl EDTA-blod pipettert i et autoklavert 1,5 ml Eppendorfrør. I det samme røret tilsettes 200 µl Binding Buffer og 40 µl Proteinase K, blandes godt hjelp av opp og ned pipettering, og inkuberes på vannbad ved 70 °C i 10 minutter. Proteinase K lyserer cellene og dermed frigjøres DNA. Binding Bufferen inneholder Guandine HCl, som deaktiverer nukleaser. Proteinase K bidrar til å fjerne proteiner som kan ødelegge DNAet. Etter inkubering tilsettes 100 µl isopropanol (Arcus), og dette blandes godt ved hjelp av opp og ned pipettering. Et filterrør (High Pure Filter Tube) settes oppi et samlerør (High Pure Collection Tube), og det lyserte prøvematerialet overføres til filterrøret. Filterrøret med samlerøret sentrifugeres ved 8.000g i 1 min. Dette gjør at DNA som befinner seg i prøven binder seg til glassfibere lokalisert i filteret i bunnen av filterrøret. Væsken i prøven vil sentrifugeres rett igjennom filteret, og ned i samlerøret. Filterrøret med DNA overføres til et nytt samlerør og det gamle samlerøret med løsning kastes i egnet beholder. 500 µl av Inhibitor Removal Buffer tilsettes røret og sentrifugeres på nytt ved 8,000g i 1 min. Filterrøret overføres til et nytt samlerør og det gamle kastes. Inhibitor Removal Bufferen fjerner PCR-hindrende kontaminanter, og gjør det blant annet mulig å benytte heparin-blod. Etter sentrifugeringen overføres igjen filterrøret til ett nytt samlerør, før man begynner vaskeprosessen. Det tilsettes da 500 µl vaskebuffer, før man gjentar prosessen med sentrifugering ved 8.000g i 1 min., og med påfølgende bytte av samlerør. Dette gjøres to ganger. Etter vasking for andre gang kastes ikke samlerøret, men vaskebufferen som har samlet seg i det helles ut. Deretter sentrifugeres rørene på nytt ved 13,000g i 10 sekunder. Denne ekstra sentrifugeringen sørger for at rester av vaskebuffer filtreres ned i samlerøret slik at det kan kastes og erstattes med et autoklavert 1,5 ml eppendorfrør.

Ved neste trinn ble DNA samlet opp i Eppendorfrøret. Dette gjøres ved å tilsette 200 μ l av en forvarmet Elution Buffer, som holder ca. 70 °C. Rørene sentrifugeres så ved 8,000g i 1 min. DNA vil nå ha løsnet fra filteret og ha blitt filtrert sammen med bufferen gjennom filteret og ned i eppendorfrøret. Dette DNA eluatet kan enten benyttes med en gang videre i en PCR-reaksjon eller lagres i kjøleskap eller fryser avhengig av ønsket lagringstid.



Figur 9. Skisse av fremgangsmåte for ekstrahering av DNA med High Pure PCR Template Kit (Roche).

3.2.2 Real-time PCR med Roche LightCycler 2.0

Til oppsett av real-time PCR med påfølgende smeltepunktanalyse, ble optimalisert in-house prosedyre for påvisning av Laktose MCM6-13910T benyttet, som er beregnet for bruk med instrumentet LightCycler 2.0 (Roche). PCR-mix lages ved å pipettere opp, sterilt vann og prober, primere og mastermix i et nytt eppendorfrør. Per prøve pipetteres 7 µl sterilt vann, 1 µl av hver primer og hver probe og 4 µl mastermix. Det tillages nok PCR-mix til antall prøver som skal analyseres, pluss to. For å holde kapillærene avkjølt under tilsetting av PCR-mix og prøvemateriale, overføres de til metallformer som er forhåndsavkjølt i kjøleskap. Deretter pipetteres det 15 µl PCR-mix og 5 µl DNA-templat opp i hver av kapillærene. Deretter påføres hvert av kapillærene en kork, før man setter dem i et sentrifugestativ for kapillærer og spinner ned løsningen med en spesiallaget sentrifuge. For kjøring av Real time PCR med LightCycler 2.0 ble følgende program programmert og benyttet til analysering av prøver. Preinkubering skjer ved 95 °C i 10 minutter. Fase to er amplifisering. Denne er igjen delt opp i de tre segmentene denaturering, annealing og ekstensjon. Denaturering skjer ved 95 °C i 15 sek., annealing ved 41 °C i 15 sek. og ekstensjon ved 72 °C i 15 sek. Antall sykluser er 45. Det gjøres en avlesning av fluorescensen i slutten av hvert annealing segment. Fase tre er smeltekurven. Denne er delt opp i 3 faser: denaturering, annealing og smelting. Denaturering gjøres på 95 °C over 20 sekunder og annealing på 40 °C over 20 sekunder. Smeltingsfasen settes til gradvis å øke med 0,2 °C/s opp til 85 °C. Under smelting leses fluorescensen av kontinuerlig. Siste fase er avkjøling. Dette gjøres på 40 °C over 30 sekunder. Dette gir en total analysetid på omtrent 70 min.

4.0 Resultater

I resultatdelen 4.1 vil de ulike analysetrinnene fra in-house prosedyren bli omtalt og med henvisning til vedlegg hvor praktiske opplysninger eller fremgangsmetode er beskrevet. Den kliniske valideringen blir beskrevet i punkt 4.2 med resultatene satt opp i vedlegg. Noe av prøvematerialet ble sekvensert ved Oslo Universitetssykehus, Oslo, og resultatene fra dette er satt opp i punkt 4.3.

4.1 Resultater fra utvikling av in-house metoden

Ekstraksjon: Det ble prøvd ut to ulike kit for å ekstrahere DNA fra EDTA-blod.

Metode 1: Lysering med bruk av kit:

NucliSENS®Magnetic Extraction Reagents, bioMérieux.

Metode 2: Lysering med bruk av kit HighPure PCR

Template Preparation Kit, Roche.

Etter utprøving av disse to ekstraheringskitene ble det valgt å benytte kitet HighPure PCR Template Preparation Kit, Roche i det videre arbeidet. Dette kitet ga mer stabile produkter, og det var enklere i bruk.

Vedlegg 1: Reagenser til ekstraksjon

Vedlegg 2: Ekstrahering av DNA fra EDTA blod

Target: Valg av target var mutasjonen Y (C/T) som har lokalisasjon 13910 baser oppstrøms fra laktasegenet.

gnl|dbSNP|rs4988235|allelePos=301|totalLen=601|taxid=9606|snpclass=1|alleles='C/T'|mol=Genomic|build=131

```
AGAGCAGAGA TAAACAGATT TGTTGCATGT TTTTAATCTT TGGTATGGGA CATACTAGAA
TTCACCTGCAA ATACATTTTT ATGTAAC TGT TGAATGCTCA TACGACCATG GAATTCCTCC
CTTTAAAGAG CTTGGTAAGC ATTTGAGTGT AGTTGTTAGA CGGAGACGAT CACGTCATAG
TTTATAGAGT GCATAAAGAC GTAAGTTACC ATTTAATACC TTTCATTCAG GAAAAATGTA
CTTAGACCCCT ACAATGTACT AGTAGGCCCTC TCGCCTGGCA ATACAGATAA GATAATGTAG
Y
CCCTGGCCTC AAAGGAACTC TCCTCCTTAG GTTGCATTTG TATAATGTTT GATTTTTAGA
TTGTTCTTTG AGCCCTGCAT TCCACGAGGA TAGGTCAGTG GGTATTAACG AGGTAAAAGG
GGAGTAGTAC GAAAGGGCAT TCAAGCGTCC CATCTTCGCT TCAACCAAAG CAGCCCTGCT
TTTTCCCTAGT TTTATTAATA GGTTTGATGT AAGGTCGTCT TTGAAAAGGG GGTTTGGCTT
TTTTTTTACAG TGTGACTGAG GTATAATTTA TAAAAAGGGA AATGTATGGC ATGGTGAGTT
```

Mastermix: Protokoll for Roche035 15 567001 LightCycler® FastStart DNA Master^{PLUS} HybProbe.

Vedlegg 3: Preparering av mastermix

Primer/prober: Valg av primere og prober ble foretatt etter artikkelsøk (16).

Andre primere og prober (17) ble også utprøvd, men ble forkastet.

Primere (TibMolbiol, Berlin) ble mottatt på tørrstoff, og ble løst i 100 µl sterilt vann til en Stockløsning på 50 pmol/µl. Stockløsning ble fortynnet videre til en 10 pmol/µl bruksløsning ved å fortynne stockløsningen.

Prober (TibMolbiol, Berlin) ble mottatt på tørrstoff, og ble løst i 20 μ l sterilt vann til en Stockløsning på 50 pmol/ μ l. Stockløsning ble fortynnet videre til en 3 pmol/ μ l bruksløsning ved å fortynne stockløsningen.

Vedlegg 4: Stock- og bruksløsning av primere og prober

Primer-

optimalisering: Optimaliserte forward og revers primere ved å variere konsentrasjonen av de respektive primerne i PCR-mix.

Vedlegg 5: Protokoll for tillaging av PCR-mix

Cycle-

optimalisering: Optimaliserte syklusene ved å variere temperatur og antall sykluser.

Vedlegg 6: Amplifiseringstemperaturer og tider

4.2 Resultater fra klinisk validering

Prøvemateriale: 4 prøver med kjent genotype i MCM6-C/T-13910
genet: villtype CC.

65 prøver uten kjent genotype i MCM6-C/T-13910
genet.

Protokoll: Ekstrahering og oppformering ble utført i henhold til de protokoller som ble utprøvd under teknisk validering, og som er vedlagt denne rapporten.

Utstyr: LightCycler 2,0 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Kontroller: Positiv kontroll: Prøve 1
Negativ kontroll: Prøve 24
Reagens kontroll (H₂O, Fresenius Kabi)

Sensitivitetstest: Den andel av positive prøver som identifiseres som positive i en test.

n=4

Sensitivitet i % ad. genotype CC ble:

$$4/4 * 100 \% = \underline{100 \%}$$

Vedlegg 7: Sensitivitet

Spesifisitetstest: Spesifisitetstest angir den andel av negative prøver som er negative i en test. Spesifisitetstest kunne ikke utføres da ingen prøver var verifiserte som negative i dette prosjektet.

Repeterbarhets-

test: For å validere stabilitet og repeterbarhet ble alle prøvene kjørt tre ganger over tre dager av to stk. analysepersonell.

Resultatet ble 100% repeterbarhet mellom de tre kjøringene.

Vedlegg 8: Repeterbarhet

Vedlegg 9: Repeterbarhet for 2 kontroller

Presisjonstest: Presisjonstest angir overensstemmelse mellom uavhengige målinger.

Presisjonstest ble utført på fire prøver (1, 5, 46 og 65) som ble satt opp med 10 repetisjoner i samme serie og over 2 dager.

Prøve 1 ble 100% typet til CC innen serien.

Smeltemp. for CC varierte mellom 62,25°C - 62,59°C

Prøve 5 ble 100% typet til CC innen serien.

Smeltemp. for CC varierte mellom 61,80°C – 61,96°C

Prøve 46 ble 100% typet til TC innen serien

Smeltemp. for T varierte mellom 52,88°C – 52,99°C

Smeltemp. for C varierte mellom 62,35°C - 62,58°C

Prøve 65 ble 100% typet til TT innen serien.

Smeltemp. for CC varierte mellom 53,27 °C – 53,46 °C

Prøve 1 ble 100% typet til CC mellom serier.

Smeltemp. for CC varierte mellom 62,25 °C - 62,77 °C

Prøve 5 ble 100% typet til CC mellom serier.

Smeltemp. for CC varierte mellom 61,80 °C – 62,06 °C

Prøve 46 ble 100% typet til TC mellom serier.

Smeltemp. for T varierte mellom 52,88 °C – 53,21 °C

Smeltemp. for C varierte mellom 62,35 °C - 62,77 °C

Prøve 65 ble 100% typet til TT mellom serier.

Smeltemp. for CC varierte mellom 53,27 °C – 53,72 °C

Vedlegg 10: Presisjon

Robusthetstest: Robusthetstest ble utført ved å benytte PCR-mix som hadde vært utsatt for romtemperatur og direkte lys i henholdsvis 2 og 12 timer. Resultatene ble identiske med resultater fra kjøring hvor PCR-mix var tillaget og oppbevart på is og beskyttet mot direkte lys.

Vedlegg 11: Robusthet

Relativ

nøyaktighet: Resultatene fra genotyping med kittet (TibMolbiol) ble satt som de nøyaktige verdiene, og relativ nøyaktighet for In-house metoden ble beregnet ut fra antall prøvesvar som ble

likt med de nøyaktige verdiene. Prøve nr. 53 og 54 avvok fra resultatene fra kittet.

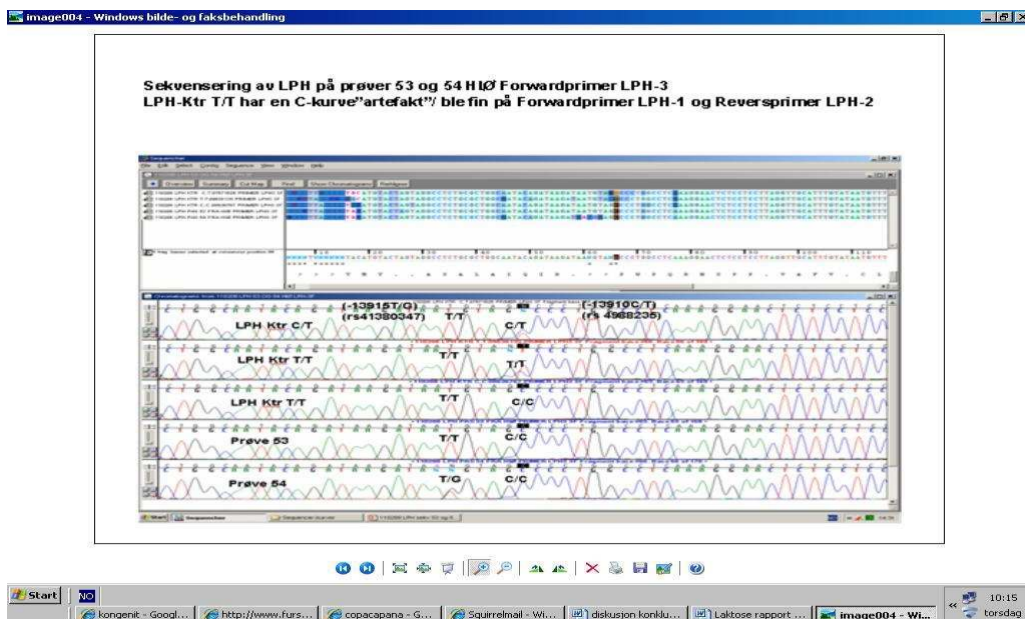
Den relative nøyaktigheten for In-house metoden ble:

$$\frac{67 \times 100 \%}{69} = 97 \%$$

Vedlegg 12: Relativ nøyaktighet

4.3 Resultater fra sekvensering

Det var to prøver (nr. 53 og 54) som ble typet til genotype TC med denne in-house metoden, og til genotype CC med kitet fra TibMolbiol. Disse to prøvene ble sekvensert (Oslo Universitetssykehus, Rikshospitalet), og resultatet ble genotype C/C for begge prøvene.



Figur 10. Bildet viser kromatogrammer fra sekvensering av 3 ulike LPH kontroll C/T, T/T, C/C og pasientprøvene 53 og 54 hvor det påvises C/C i pasientprøvene.

5.0 Diskusjon

Laktoseintoleranse skyldes lav eller ingen laktase aktivitet i tynntarmen, og det er vanlig at laktaseaktiviteten reduseres fra 5-7 års alderen (Welsh 1978). Dette fører etter hvert til laktoseintoleranse i voksen alder, men i noen befolkninger i Nord-Europa har voksne fortsatt laktaseaktivitet. Dette skyldes at nukleotidet Thymin (T) befinner seg i en intronsekvens i Minichromosome Maintenance 6 gen (MCM6) (rs4988235), nærmere bestemt 13910 baser oppstrøms for genet laktasephlorizinhydrolase (4).

Målsetningen med dette prosjektet har vært å utarbeide og validere en in-house real-time PCR metode for deteksjon av laktoseintoleranse. Det vil si at metoden skulle påvise homozygot Cytosin (C) ved laktoseintoleranse og homozygot T eller heterozygot CT ved laktosetoleranse.

Etter innsamling av prøvematerialet ble to ulike ekstraheringsmetoder utprøvd. Den ene var basert på rensing av DNA ved bruk av magnetisme, men det viste seg at den ga ustabile resultater. Denne metoden ble ikke benyttet videre i prosjektet. Den andre ekstraheringsmetoden var ved bruk av minikolonner. Den var forholdsvis rask og enkel i bruk og ble valgt videre i prosjektet. En ulempe ved bruk av kolonne var at EDTA-blodet enkelte ganger koagulerte i det første trinnet i prosedyren. Det ble dermed vanskelig å få sentrifugert prøvematerialet gjennom kolonnen. Det ble etter hvert erfart at EDTA-blod ikke koagulerte når prøvene hadde blitt oppbevart noen timer i kjøleskap før de ble ekstraherte. I midlertidig burde ikke prøvene ekstraheres etter 24 timer, selv om de var oppbevarte i kjøleskap, etter anbefalinger av produsenten av kolonnene (Roche).

Etter ekstrahering ble det satt opp real-time PCR med etterfølgende smeltekurve. Primer og probevalg var basert på søk i publiserte artikler, i genbanker og ved BLAST-søk. Det første primer- og probesettet som ble utprøvd, var i følge studien til Bodlaj et al. (16) med en modifikasjon på forward primer slik at den stemte overens med baserekkefølgen i MCM6 genen. Det ble også prøvd ut primere og prober fra en annen studie (17), men det viste seg at det var vanskeligere å få et optimalt resultat. Dermed ble det videre benyttet primerne og prober fra studien til Bodlaj et al. (16). Det ble deretter prøvd ut ulike temperaturer og tider i de ulike trinnene i Real-time PCR syklusen for å få real-time PCR- og smeltekurver uten støy.

Deteksjon av enkelt nukleotidet C/T i posisjonen -13910 oppstrøms var ved bruk av smeltekurver hvor det fremkom ulike smeltepunkttopper for de ulike allel variantene. Ved homozygot TT ga den deriverte av smeltepunktet en topp ved ca. 53,5 °C, ved heterozygot TC ble det en topp for T ved 52,6 °C og en topp for C ved 62,7 °C. Ved homozygot CC ble det en topp ved 62,3 °C og en skjev, lav topp med bred båndvidde ved ca. 51 °C. For å avlese homozygot CC trengs det noe erfaring for å kunne skille denne "ikke toppen" fra en topp forårsaket av T basen.

Etter at in-house real-time PCR metoden var optimalisert, skulle den valideres. Ved etablering av en ny metode er det ønskelig å ha prøvemateriale med sann verdi. I dette prosjektet var det som nevnt tidligere vanskelig å skaffe til veie prøvemateriale med tilhørende opplysninger om laktose-toleranse eller intoleranse. Det hadde vært en fordel i forhold til validering av metoden om antallet hadde vært større enn 10. Prøvene fra de 4 personer med laktoseintoleranse ble analysert til å være homozygote CC. Det ble også samme resultat i ulike analyseserier over ulike dager og ved oppsett av ulikt

analysepersonell. Det betyr at analysesvarene var i samsvar med diagnosen. Av de resterende 65 prøvene ble 26 prøver typet til homozygot CC, det vil si positive med denne in-house real-time PCR metoden. 39 prøver ble typet til negative, det vil si enten homozygot for T eller heterozygot TC.

De 69 prøvene ble også analyserte med ukjente primer og prober tilhørende et kit fra TibMolbiol, Berlin. De 69 prøvene ble analysert en gang og det ble samsvar mellom in-house metoden og kitet i 67 av de 69 prøvene. Kitet påviste at prøvematerialet i de to prøvene var homozygot CC, mens in-house real-time PCR metoden detekterte at de var heterozygote TC. Disse to prøvene som avvek ble også sekvenserte ved Oslo Universitetssykehus, Rikshospitalet. Resultatet av sekvenseringen ble villtype C/C samme som det ble ved bruk av kitet. Det var også åtte tilfeldig utvalgte prøver av de 67 som har blitt typet ved Oslo Universitetssykehus. Disse fikk samme resultat som ved denne in-house metoden.

Kitet fra TibMolbiol, Berlin inneholdt tre ulike kontroller (C/C, C/T og TT) som ble analyserte med primere og prober tilhørende kitet. Dette ga entydige analysesvar som stemte overens med oppgitte verdier på kontrollene.

Kontrollene ble også forsøkt analysert med in-house metoden, men det resulterte i ingen eller ubrukelige real-time kurver og smeltepunkter. I dette prosjektet ble det benyttet to ulike pasientprøver og sterilt vann til 3 kontroller som ble satt opp i de ulike analyseseriene. En av kontrollene med genotype C/C hadde sann verdi, men kontroll T/C hadde ingen sann verdi. Selv om resultatet på denne kontrollen ble det samme i alle oppsett, så vil dette være en svakhet med metoden. Det er dermed ønskelig å utvikle in-house real-time PCR-kontroller som inneholder de ulike allel variantene av basene C og T. Slike PCR-kontroller blir sekvenserte for å være sikker på hvilke baser som er

i sekvensen. Når det gjelder utvikling av in-house PCR-kontroller så skal 4 bioingeniørstudenter ha dette som oppgave i sin avsluttende Bachelorprosjekt våren 2011. Det å få utviklet en prosedyre og videre kontroll materiale vil være til stor nytte for denne metoden og for andre PCR analyser hvor slikt materiale ikke er tilgjengelig.

6.0 Konklusjon

Det er imidlertid viktig å påpeke at genotyping i forhold til laktoseintoleranse, kun gir svar på om en person har primær laktoseintoleranse. Ved sekundær eller kongenital laktoseintoleranse, vil det være mulig å få genotype assosiert med toleranse, selv om en person er beviselig laktoseintolerant. Det er også viktig å påpeke at etnisitet kan ha betydning, ettersom mutasjonen C/T-13910 ikke er den gjeldende mutasjonen i forbindelse med toleranse av laktose i voksen alder for alle folkegrupper.

In-house real-time PCR metoden som er utviklet i dette prosjektet vurderes til å være en forholdsvis rask metode. Total analysetid med ekstrahering, oppformering av DNA og smeltepunktanalyse tar ca. fire timer. Det vil være en styrke for metoden hvis det blir utviklet in-house real-time PCR kontroller med genotypene C/C, T/T og T/C, da det ikke finnes kommersielle kontroller for denne in-house prosedyren.

Vedlegg

Vedlegg 1: Reagenser til ekstraksjon

Vedlegg 2: Ekstraksjon av DNA fra EDTA blod

Vedlegg 3: Preparering av mastermix

Vedlegg 4: Stock- og bruksløsning av primere og prober (16)

Vedlegg 5: Protokoll for PCR mix tillaging

Vedlegg 6: Amplifiseringstemperatur og tid

Vedlegg 7: Sensitivitet

Vedlegg 8: Repeterbarhet

Vedlegg 9: Repeterbarhet for 2 kontroller

Vedlegg 10: Presisjon

Vedlegg 11: Robusthet

Vedlegg 12: Relativ nøyaktighet

Vedlegg 13: Repeterbarhet på kommersielle kontroller

Vedlegg 14: Sammenligning av resultater fra

Oslo Universitetssykehus og MBL

Vedlegg 1: Reagenser til ekstraksjon

Produkt nr.	Produktnavn	Leverandør
11796828001	HighPure PCR Template Preparation Kit	Roche, Oslo + 47 23 37 33 48
	Absolutt etanol	Arcus, Oslo

Vedlegg 2: Ekstraksjon av DNA fra EDTA-blod

Ved bruk av nytt kit "High Pure PCR Template Preparation Kit"

tilsett 20 ml absolutt alkohol til Inhibitor Removal Buffer og

tilsett 80 ml absolutt alkohol til vaskebuffer.

Proteinase K løses opp med 4,5 ml sterilt vann (Fresenius Kabi) og blandes

godt. Sett på vannbad på 70°C og forvarm Elution Buffer til 70°C.

1. Pipetter 200 µl EDTA-blod i et autoklavert 1,5 ml eppendorfrør.
Tilsett 200 µl Binding Buffer og 40 µl Proteinase K, blandes godt hjelp av opp og ned pipettering.
2. Inkuberes på vannbad ved 70 °C i 10 minutter. Etter inkubering tilsettes 100 µl isopropanol (Arcus), og dette blandes godt ved hjelp av opp og ned pipettering.
3. Et filtterrør (High Pure Filter Tube) settes oppi et samlerør (High Pure Collection Tube). Det lyserte prøvematerialet overføres til filtterrøret.
4. Filtterrøret med samlerøret sentrifugeres ved 8.000g i 1 min.
Filtterrøret med DNA overføres til et nytt samlerør og det gamle samlerøret med løsning kastes i egnet beholder.
5. Tilsett 500 µl Inhibitor Removal Buffer til røret.
Sentrifugeres ved 8,000g i 1 min.
Filtterrøret overføres til et nytt samlerør og det gamle kastes.
6. Tilsettes 500 µl vaskebuffer.
Sentrifuger ved 8.000g i 1 min.
Bytt eller tøm samlerør.
7. Gjenta vaskeprosedyren.
8. Sentrifugeres 13,000g i 10 sekunder.
Plasser filtterrøret i et autoklavert 1,5 ml eppendorfrør.

9. Tilsett 200 μ l forvarmet Elution Buffer på 70 °C.
Sentrifuger ved 8,000g i 1 min.
10. DNA eluatet kan enten benyttes videre i en PCR-reaksjon eller lagres i kjøleskap eller fryser ved – 20 °C, avhengig av ønsket lagringstid.

Vedlegg 3: Preparering av mastermix

035 15 567001 LightCycler® FastStart DNA Master^{PLUS} HybProbe

- 1: Tinn opp et eppendorfrør merket: Reaksjonsmix (kopp 1b, rødt lokk).
- 2: Sentrifuger et eppendorfrør merket: Enzym (kopp 1a, hvitt lokk).
- 3: Pipetter 10 µl enzym (bland godt før pipettering) fra 1a til Reaksjonsmix i rør i 1b (eppendorfrør med enzym holdes på is).
- 4: Bland godt ved å pipettere opp og ned (ikke vorteks).
- 5: Sett på ny merkelapp på 1b eller tusj med rødt på det hvite feltet på .

Vedlegg 4: Stock- og bruksløsning av primere og prober

Tabellen nedenfor angir konsentrasjon av primere og prober

Syntese skala 0,01 μmol

Primere: Condition 5 nmol frysetørret TibMolbiol, Berlin

Prober: Condition 1 nmol frysetørret TibMolbiol, Berlin

Sekvens nr.	Nukleotidsekvensen Bodlaj et. Al. 2006	Stockløsning	Bruksløsning
1191272	tgagtgtagttgtagacgg	FWLAC -1.6 tilsatt 100 μl PCR vann i tilsendt rør: dermed 50 $\text{pmol}/\mu\text{l}$	Fortynn stockløsning 1+4 med PCR vann, dermed 10 $\text{pmol}/\mu\text{l}$
1191273	caacctaaggaggagagt	REVLAC -1.6 tilsatt 100 μl PCR vann i tilsendt rør: dermed 50 $\text{pmol}/\mu\text{l}$	Fortynn stockløsning 1+4 med PCR vann, dermed 10 $\text{pmol}/\mu\text{l}$
1191274	gcctctgcgctggcaatacagat a—FL	LACFL-1.6 tilsatt 20 μl PCR vann i tilsendt rør: dermed 50 $\text{pmol}/\mu\text{l}$	Fortynn stockløsning 1+17 med PCR vann, dermed 2,9 $\text{pmol}/\mu\text{l}$
1191275	LC 640 ataatgtagcccctggcct—ph	LAC640-1.6 tilsatt 20 μl PCR vann i tilsendt rør: dermed 50 $\text{pmol}/\mu\text{l}$	Fortynn stockløsning 1+17 med PCR vann, dermed 2,9 $\text{pmol}/\mu\text{l}$

Vedlegg 5: Protokoll for PCR-mix tillaging pr. prøve

7 μ l H₂O
1 μ l FWLAC-1.6
1 μ l REVLAC-1.6
1 μ l LACFL-1.6
1 μ l LAC640-1.6
4 μ l mastermix

Vedlegg 6: Program for real-time PCR og smeltekurve

Antall sykluser	Program	Delprogram	Temperatur	Tid
1	Preinkubering	Denaturering	95°C	10 min
45	Amplifisering	Denaturering	95°C	15 sek
		Annealing	41°C	15 sek
		Ekstensjon	72°C	15 sek
1	Avkjøling		40°C	
1	Smeltekurve	Denaturering	95°C	20 sek
		Annealing	40°C	20 sek
		Smelting	0,2°C/sek til 85°C	
1	Avkjøling		40°C	30 sek

Vedlegg 7: Sensitivitet

	In- house			In- house			In - house		
Prøve nr	1. t =T	2.t =C	Geno type	1. t =T	2.t =C	Geno type	1. t =T	2.t =C	Geno type
1		62,67	CC		61,99	CC		62,57	CC
4		62,58	CC		62,24	CC		62,51	CC
5		61,62	CC		61,61	CC		61,92	CC
6		62,49	CC		62,34	CC		62,49	CC

Vedlegg 8: Repeterbarhet

	In-house		Utf. CF	In-house		Utf. CF	In-house		Utf. IKA
Pr nr	1.t =T	2.t =C	Geno type	1.t =T	2.t =C	Geno type	1.t =T	2.t =C	Geno type
1		62,67	CC		61,99	CC		62,57	CC
2	52,77	62,82	TC	53,13	61,72	TC	53,07	62,54	TC
3	53,58		TT	53,80		TT	53,45		TT
4		62,58	CC		62,24	CC		62,51	CC
5		61,62	CC		61,61	CC		61,92	CC
6		62,49	CC		62,34	CC		62,49	CC
11	53,01	62,44	TC	53,07	62,79	TC	52,97	62,57	TC
12	52,74	62,63	TC	52,96	62,32	TC	52,95	62,38	TC
13	52,58	62,75	TC	52,75	62,41	TC	53,04	62,51	TC
14	52,83	62,53	TC	52,67	62,34	TC	52,82	62,54	TC
15	52,41	62,76	TC	52,48	62,41	TC	53,07	62,63	TC
16	53,48		TT	53,10		TT	53,53		TT
17	53,58		TT	53,26		TT	53,61		TT
18	53,48		TT	53,14		TT	53,42		TT
19	54,23		TT	53,67		TT	53,50		TT
20	54,77		TT	53,39		TT	53,53		TT
21	54,17		TT	53,42		TT	53,30		TT
22	53,31	62,84	TC	52,76	62,31	TC	52,70	62,59	TC
23	53,98		TT	53,48		TT	53,42		TT
24	53,10	62,74	TC	52,63	62,10	TC	52,93	62,64	TC
25	53,48		TT	53,39		TT	53,58		TT
26	53,39		TT	53,42		TT	53,52		TT

27	52,80	62,68	TC	52,97	62,57	TC	52,86	62,58	TC
28		62,18	CC		62,03	CC		62,43	CC
29		62,31	CC		62,03	CC		61,96	CC
30		61,96	CC		62,03	CC		61,96	CC
31		61,85	CC		61,84	CC		62,08	CC
32		61,55	CC		61,34	CC		61,77	CC
33		61,99	CC		62,18	CC		62,11	CC
34		62,44	CC		62,46	CC		62,51	CC
35		61,90	CC		61,77	CC		61,08	CC
36		61,05	CC		60,93	CC		61,24	CC
37		61,43	CC		61,34	CC		61,77	CC
38		61,23	CC		61,62	CC		61,55	CC
39		61,06	CC		61,27	CC		61,21	CC
40	51,39	61,18	TC	51,33	61,21	TC	52,17	61,68	TC
41	51,04	60,68	TC	51,06	60,74	TC	51,33	61,09	TC
42	52,83		TT	52,73		TT	53,08		TT
45	52,89	62,49	TC	52,64	61,77	TC	53,11	62,46	TC
46	52,95	62,74	TC	52,70	62,59	TC	53,02	62,49	TC
47		62,27	CC		62,41	CC		62,49	CC
48	53,30		TT	53,66		TT	53,59		TT
49	52,70	62,59	TC	53,11	62,77	TC	53,01	62,81	TT
51		62,29	CC		62,46	CC		61,99	CC
53	52,70	62,38	TC	52,76	62,15	TC	52,37	62,17	TC
54	52,88	62,08	TC	52,92	61,81	TC	53,12	62,05	TC
55		62,47	CC		62,21	CC		62,35	CC
56		62,00	CC		61,87	CC		61,96	CC
57		62,25	CC		62,15	CC		62,14	CC
58		61,53	CC		61,62	CC		61,71	CC

59		62,40	CC		62,30	CC		62,48	CC
60		62,59	CC		62,49	CC		62,02	CC
61		62,24	CC		62,27	CC		62,45	CC
62	51,40	61,24	TC	51,39	61,40	TC	51,89	61,40	TC
63	53,36		TT	53,42		TT	53,55		TT
64	53,39		TT	53,58		TT	53,45		TT
65	53,42		TT	53,39		TT	53,55		TT
66	52,63	62,31	TC	52,67	62,56	TC	52,74	62,46	TC
67	53,36		TT	53,45		TT	53,55		TT
68	52,51	62,15	TC	52,58	62,30	TC	52,72	62,14	TC
69	53,60		TT	53,36		TT	53,49		TT
70	52,83		TT	53,14		TT	52,75		TT
71	52,60	62,40	TC	52,55	62,64	TC	53,03	62,58	TC
72		62,55	CC		62,39	CC		62,30	CC
73		61,65	CC		61,27	CC		61,45	CC
74	51,68	61,46	TC	52,00	61,93	TC	52,07	61,74	TC
75		61,71	CC		61,31	CC		61,65	CC
76		62,39	CC		61,96	CC		62,05	CC
77		62,30	CC		62,19	CC		62,47	CC

Vedlegg 9: Repeterbarhet for positiv og negativ kontroll

	Pos. ktr Prøve 1			Neg. ktr Prøve 24		
Analyse serie	1.t =T	2.t =C	Geno type	1.t =T	2.t =C	Geno type
1		62,32	CC	52,70	62,71	TC
2		62,05	CC	52,89	62,27	TC
3		62,39	CC	52,44	62,43	TC
4		62,18	CC	52,33	62,59	TC
5		61,71	CC	52,61	61,87	TC
6		62,30	CC	52,81	62,24	TC
7		62,36	CC	52,62	62,02	TC
8		62,54	CC	52,92	62,43	TC
9		62,43	CC	53,03	62,45	TC
10		62,36	CC	53,09	62,27	TC
11		62,91	CC	52,82	62,45	TC
12						
13						
14						
15		62,46	CC	52,55	62,64	TC
16		62,55	CC	52,76	62,51	TC
17						
Kit, Tibmolb	57,60		CC	58,73	63,20	CT
18						
19		62,54	CC	52,83	62,57	TC
20						

Vedlegg 10: Presisjon

Prøve nr	1.t =T	2.t =C	Geno type	1.t =T	2.t =C	Geno type
1		62,47	CC		62,30	CC
1		62,25	CC		62,26	CC
1		62,41	CC		62,77	CC
1		62,37	CC		62,30	CC
1		62,43	CC		62,39	CC
1		62,59	CC		62,38	CC
1		62,52	CC		62,42	CC
1		62,43	CC		62,35	CC
1		2,39	CC		62,35	CC
1		62,43	CC		62,26	CC
5		61,83	CC		61,73	CC
5		61,96	CC		61,67	CC
5		61,80	CC		62,58	CC
5		61,87	CC		61,98	CC
5		61,91	CC		61,93	CC
5		61,89	CC		91,92	CC
5		61,94	CC		91,97	CC
5		61,83	CC		62,06	CC
5		61,89	CC		61,97	CC
5		61,83	CC		61,96	CC
46	52,99	62,58	TC	52,73	62,69	TC
46	52,89	62,49	TC	52,89	62,72	TC
46	52,93	62,35	TC	52,90	62,68	TC
46	52,99	62,51	TC	52,80	62,71	TC
46	52,96	62,54	TC	53,12	62,65	TC

46	52,91	62,57	TC	53,21	62,74	TC
46	52,88	62,46	TC	52,74	62,77	TC
46	52,90	62,57	TC	52,86	62,46	TC
46	52,96	62,51	TC	52,89	62,68	TC
46	52,83	62,42	TC	52,67	62,71	TC
65	53,40		TT	53,62		TT
65	53,43		TT	53,56		TT
65	53,33		TT	53,62		TT
65	53,37		TT	53,53		TT
65	53,27		TT	53,59		TT
65	53,43		TT	53,72		TT
65	53,37		TT	53,59		TT
65	53,40		TT	53,62		TT
65	53,40		TT	53,62		TT
65	53,46		TT	53,65		TT

Vedlegg 11: Robusthet angående preanalytiske faktorer

	Oppbevart ved optimale forhold			Oppbevart i rom temp, samt lyspåvirket i to timer		
Prøve nr	1.t =T	2.t =C	Geno type	1.t =T	2.t =C	Geno type
1		62,67	CC		62,44	CC
5		61,62	CC		61,81	CC
6		62,32	CC		61,87	CC
27	52,70	62,71	TC	53,12	62,55	TC
28		62,49	CC		62,15	CC
63	52,80	62,68	TC	52,92	62,56	TC
Pos. k: 1		62,18	CC		61,96	CC
Neg. k:24	53,36		TT	53,48		TT

Vedlegg 12: Relativ nøyaktighet

	In-house			Kit		
Pr nr	1.t =T	2.t =C	Geno type	1.t =T	2.t =C	Geno type
1		62,57	CC	55,29		CC
2	53,07	62,54	TC	55,33	61,24	CT
3	53,45		TT		60,96	TT
4		62,51	CC	55,18		CC
5		61,92	CC	57,25		CC
6		62,49	CC	57,26		CC
11	52,97	62,57	TC	55,29	61,22	CT
12	52,95	62,38	TC	55,17	61,21	CT
13	53,04	62,51	TC	55,67	61,11	CT
14	52,82	62,54	TC	55,28	61,12	CT
15	53,07	62,63	TC	55,34	61,14	CT
16	53,53		TT		61,09	TT
17	53,61		TT		61,07	TT
18	53,42		TT		60,98	TT
19	53,50		TT		62,66	TT
20	53,53		TT		63,00	TT
21	53,30		TT		62,99	TT
22	52,70	62,59	TC	58,70	63,22	CT
23	53,42		TT		63,14	TT
24	52,93	62,64	TC	57,45	63,13	CT
25	53,58		TT		63,23	TT
26	53,52		TT		62,95	TT
27	52,86	62,58	TC	57,53	63,13	CT

28		62,43	CC	57,94		CC
29		61,96	CC	57,93		CC
30		61,96	CC	56,46		CC
31		62,08	CC	56,43		CC
32		61,77	CC	56,28		CC
33		62,11	CC	56,57		CC
34		62,51	CC	56,83		CC
35		61,08	CC	56,35		CC
36		61,24	CC	56,30		CC
37		61,77	CC	56,10		CC
38		61,55	CC	52,77		CC
39		61,21	CC	52,71		CC
40	52,17	61,68	TC	56,46	62,29	CT
41	51,33	61,09	TC	55,91	61,79	CT
42	53,08		TT		62,19	TT
45	53,11	62,46	TC	56,72	62,55	CT
46	53,02	62,49	TC	57,61	63,20	CT
47		62,49	CC	58,10		CC
48	53,59		TT		63,56	TT
49	53,01	62,81	TC	58,63	64,03	CT
51		61,99	CC	58,27		CC
53	52,37	62,17	TC	58,47		CC
54	53,12	62,05	TC	57,74		CC
55		62,35	CC	56,50		CC
56		61,96	CC	57,35		CC
57		62,14	CC	57,64		CC
58		61,71	CC	56,44		CC
59		62,48	CC	57,22		CC

60		62,02	CC	57,42		CC
61		62,45	CC	58,22		CC
62	51,89	61,40	TC	55,90	61,33	CT
63	53,55		TT		62,79	TT
64	53,45		TT		62,98	TT
65	53,55		TT		62,98	TT
66	52,74	62,46	TC	58,06	63,34	CT
67	53,55		TT		62,96	TT
68	52,72	62,14	TC	57,72	63,18	CT
69	53,49		TT		63,18	TT
70	52,75		TT		62,16	TT
71	53,03	62,58	TC	58,26	63,68	CT
72		62,30	CC	58,10		CC
73		61,45	CC	56,01		CC
74	52,07	61,74	TC	56,96	62,41	CT
75		61,65	CC	55,88		CC
76		62,05	CC	57,89		CC
77		62,47	CC	58,27		CC

Vedlegg 13: Repeterbarhet av kommersielle kontroller

TibMolbiol, Berlin med in-house prosedyren

Analyse- serie	1.t =T	2.t =C	Geno type	1.t =T	2.t =C	Geno type	1.t =T	2.t =C	Geno type
1				-	-	-			
10	51,46	62,35	CC						
13	-	-	-						
14				51,23	62,89	CC	51,48	62,96	CC
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kit, TibMolb									
16	57,68		CC	57,52	63,10	CT		63,31	TT

Vedlegg 14: Sammenligning av resultat fra
Oslo Universitetssykehus og MBL

Prøve nr	Oslo Universitets- sykehus Genotype	MBL Genotype
1	CC	CC
4	CC	CC
5	CC	CC
6	CC	CC
18	TT	TT
24	CT	CT
53	CT	CC
54	CT	CC
60	CC	CC
61	CC	CC

Litteraturliste

1. Småbrekke L, Braathen P. Legemidler med lactose til pasienter med laktoseintoleranse. Tidsskrift for Den norske legeforening 2000 Aug;120(19);2303-4.
2. Itan Y, Jones BL, Ingram CEJ, Swallow DM, Thomas MG, A Worldwide Correlation of Lactase Persistence Phenotype and Genotypes. BMC Evolutionary Biology. 2010 Feb 9;10:36
3. Heyman M. Lactose Intolerance in Infants, Children and Adolescents. Pediatrics 2006;118(3):1279-86.
4. Enattah NS, Sahi T, Savilahti E, Terwilliger JD, Peltonen L, Järvelä I Identification of a variant associated with adult-type hypolactasia. Nature Genetics. 2002;30(2):233-7.
5. De Vrese M, Stegelmann A, Richter B, Fenselau S, Laue C, Schrezenmeir J. Probiotics-compensation for lactase insufficiency. American Journal of Clinical Nutrition. 2001 Feb;73(2),4215-429.
6. Olds LC, Sibley E. Lactase persistence DNA variant enhances lactase promoter activity in vitro: functional role as a cis regulatory element. Human Molecular Genetics. 2003;12(18);2333-40
7. Wood RA. The Natural History of Food Allergy. Pediatrics. 2003 Jun;111(6):1631-37.
8. Wei Z, Liu C, Wu X, Xu N, Zhou B, Liang C, Zhu G, Shen Z, Qu W. Characterization and structure determination of the Cdt1 binding domain of human minichromosome maintenance (Mcm) 6. The Journal of biological chemistry. 2010 Apr 23;285(17):12469-73.
9. Enattah NS, Jensen TGK, Lewinski R, Kuokkanen M, Rasperina H, El-Shanti H, Seo JK, Alifrangis M, Khalil I.F, Natah A, Ali A, Natah S, Comas D, Mehdi SQ, Groop L, Westergaard EM, Imtiaz F, Rashed MS, Meyer B, Troelsen J, Peltonen L. Independent Introduction of Two Lactase-Persistence Alleles into Human Populations Reflects Different History of Adaptation to Milk Culture. American Journal of Human Genetics 2008 Jan;82(1):57–72.
10. Burtis CA, Ashwood ER, Brunz DE. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. 6. utg St.Louis: Saunders Elsevier; 2008
11. Reinton N, Buchmann M, Moghaddam A. Evaluering av gentest for laktasemangel. Tidsskrift for Den norske legeforening. 2007 Jul;27:3057–60.
12. Deepak S, Kottapalli K, Rakwal R, Oros G, Rangappa K, Iwahashi H, Masuo Y, Agrawal G. Real-Time PCR: Revolutionizing Detection and Expression Analysis of Genes. Current Genomics. 2007 Jun;8(4):234-51.

13. Cooper GM, Hausmann RE. The Cell A molecular approach. 5. utg. Washington DC: ASM press; 2009.
14. Wang W, Lu Y, Wu Y, Li Z, Hang X, Wang X, Zhao D, Zhang C. MPprimer: a program for reliable multiplex PCR primer design. BMC Bioinformatics. 2010. Mar;11;143
15. Osterman HL. The Next Step in Near Infrared Fluorescence: IRDye® QC-1 Dark Quencher. Lincoln, NE: LI-COR Biosciences [Internett] 2009 [hentet 2010-06-02]. Tilgjengelig fra: http://biosupport.licor.com/docs/QC-1DarkQuencher_v5.pdf
16. Validering / Verifisering av klinisk kjemiske analyser. Norsk Klinisk-Kjemisk Kvalitetskontroll; 2002
17. Büning C, Ockenga J, Krüger S, Jurga J, Baier P, Dignass A, Vogel Astrassburg C, Weltrich R, Genschel J, Lochs H, Schmidt H. The C/C (-13910) and G/G(-22018) genotypes for adult-type hypolactasia are not associated with inflammatory bowel disease. Scand J Gastroenterol. 2003 May;38(5):583-42
18. Bodlaj G, Stöcher M, Hufnagl P, Hubmann R, Biesenbach; stekel H, Berg J. Genotyping of the lactase-phlorizin hydrolase -13910 polymorphism by LightCycler PCR and implications for the diagnosis of lactose intolerance. Clin Chem. 2006 Jan;52(1):148-51
19. Welsh JD, Poley JR, Bhatia M, Stevenson DE. Intestinal disaccharides activities in relation to age, race, and mucosal damage. Gastroenterology. 1978 Nov;75(5):847-55

