

OSNOVNA ŠOLA LAVA CELJE

# LAKTOZA, LAKTAZA IN GENI

raziskovalna naloga

Področje: biologija

Avtorica:

Eva Nina Magdalenc, 9. A

Mentor:

mag. Bojan Poznič, prof. kem. in bio.

Mestna občina Celje, Mladi za Celje

Celje, 2019

## KAZALO

<b>KAZALO</b> .....	<b>I</b>
<b>1.1 Kazalo shem</b> .....	<b>II</b>
<b>1.2 Kazalo fotografij in slik</b> .....	<b>II</b>
<b>1.3 Kazalo preglednic</b> .....	<b>III</b>
<b>1.4 Kazalo grafov</b> .....	<b>III</b>
<b>ZAHVALA</b> .....	<b>IV</b>
<b>IZVLEČEK</b> .....	<b>V</b>
<b>POVZETEK</b> .....	<b>V</b>
<b>1 TEORETIČNI UVOD</b> .....	<b>6</b>
<b>1.1 LAKTOZA</b> .....	<b>6</b>
<b>1.2 LAKTAZA</b> .....	<b>6</b>
<b>1.3 LAKTOZA, LAKTAZA IN MLEKO</b> .....	<b>8</b>
<b>1.4 LAKTOZNA INTOLERANCA IN ALERGIJO NA MLEKO</b> .....	<b>10</b>
<b>1.5 METABOIZEM LAKTOZE</b> .....	<b>11</b>
<b>1.6 ZDRAVLJENJE LAKTOZNE INTOLERANCE</b> .....	<b>14</b>
<b>1.7 IZOLACIJA DNA</b> .....	<b>14</b>
<b>1.8 ELEKTROFOREZA</b> .....	<b>15</b>
<b>1.9 CRISPR JE NARAVNI BAKTERIJSKI SISTEM</b> .....	<b>16</b>
<b>2 OPREDELITEV RAZISKOVALNEGA PROBLEMA, CILJEV, RAZISKOVALNIH VPRAŠANJ IN HIPOTEZ</b> .....	<b>19</b>
<b>2.1 RAZISKOVALNI CILJI</b> .....	<b>19</b>
<b>2.2 RAZISKOVALNA VPRAŠANJA</b> .....	<b>19</b>
<b>2.3 HIPOTEZE</b> .....	<b>19</b>
<b>2.4 IZBOR IN PREDSTAVITEV RAZISKOVALNIH METOD TER POTEK RAZISKOVANJA</b> .....	<b>21</b>
<b>3 PREDSTAVITEV REZULTATOV</b> .....	<b>22</b>
<b>3.1.1 Saccharomyces Genom Database</b> .....	<b>22</b>
<b>3.1.2 Gene ontology GO enrichment analysis</b> .....	<b>23</b>
<b>3.1.3 Benchling</b> .....	<b>24</b>
<b>3.2 IZLOACIJA DNA</b> .....	<b>26</b>
Pri poskusu, smo si olajšali delo tako, da smo vsakemu poskusu določili kratice, in sicer: .....	<b>26</b>
<b>3.2.1 Pripomočki</b> .....	<b>26</b>
<b>3.2.2 Postopek</b> .....	<b>28</b>
<b>3.2.3 Rezultati</b> .....	<b>37</b>
<b>3.3 ELEKTROFOREZA</b> .....	<b>40</b>
<b>4 SKLEP</b> .....	<b>48</b>
<b>5 LITERATURA</b> .....	<b>51</b>
<b>5.1 VIRI FOTOGRAFIJ</b> .....	<b>53</b>

## 1.1 Kazalo shem

Shema 1: Laktaza razgradi laktozo (Wikipedia, Edgar181, 2011). .....	7
Shema 2: Metabolizem ogljikovih hidratov (Kolarič, 2016).....	12
Shema 3: Bakterijska fermentacija neprebavljene laktoze v debelem črevesju (Kolarič, 2016).....	13
Shema 4: Litični in lizogeni cikl (povzeto po Horvat, 2015). .....	16
Shema 5: Prikaz metode dela.....	21
Shema 6: Povezava ključnih pojmov. ....	25

## 1.2 Kazalo fotografij in slik

Slika 1: Formula disaharida laktoze (LifeGenetics, 2012). .....	6
Slika 2: Molekula laktoze (Graunar et al, 2016). .....	6
Slika 3: Model laktaze Escherichia coli (Wikipedia, 2017). .....	7
Slika 4: Tablete z encimom laktaze (Viškova, 2019).....	7
Slika 5: Mleko in mlečni izdelki (Jelovšek, 2014) .....	9
Slika 6: Prikaz oseb z laktozno intoleranco po svetu v odstotkih (Larry Li, 2014). .....	11
Slika 7: Rezultat genetskega testa za laktozno intoleranco (Upton, 2009). .....	15
Slika 8: Značilne ponovitve in vmesniki/distančniki (spacer) (Lee S., et al, Journal of Cellular Biotechnology). .....	17
Slika 9: Saccharomyces Genome Database (SGD, <a href="https://www.yeastgenome.org">https://www.yeastgenome.org</a> ). .....	22
Slika 10: aktivnost laktaze.....	23
Slika 11: Iskanje podatkov v bazi Gene ontology (GO) enrichment analysis < <a href="http://geneontology.org">http://geneontology.org</a> >.....	23
Slika 12: Benchling < <a href="https://benchling.com/enterprise/our-mission">https://benchling.com/enterprise/our-mission</a> >. .....	24
Slika 13: Primer sekvence DNA iz programa Benchling.....	24
Slika 14: Uporabljeni pripomočki (Magdalenc, 2019). .....	27
Slika 15: Uporabljeni pripomočki (Magdalenc, 2019). .....	27
Slika 16: Uporabljeni pripomočki (Magdalenc, 2019). .....	27
Slika 17: Priprava pripomočkov (Magdalenc, 2019).....	28
Slika 18: Zatehtano sadje in zelenjava (Magdalenc, 2019). .....	28
Slika 19: Priprava slanah raztopin (Magdalenc, 2019). .....	29
Slika 20: Pretlačili smo biološki material (Magdalenc, 2019). .....	29
Slika 21: Dodajanje detergenta (Magdalenc, 2019). .....	30
Slika 22: Dodajanje alkohola (Magdalenc, 2019) .....	30
Slika 23: Opazovanje (Magdalenc, 2019). .....	31
Slika 24: Odstranjevanje DNA (Magdalenc, 2019). .....	31
Slika 25: Sušenje na sobni temperature (21 °C) – izhlapevanje vode in alkohola (Magdalenc, 2019).....	32
Slika 26: Rezultat BKE in BCaP (Magdalenc, 2019). .....	32
Slika 27 Rezultat REK in RPCa (Magdalenc, 2019). .....	33
Slika 28: Rezultat JEK in JPCa (Magdalenc, 2019).....	33
Slika 29: Rezultat AKE in ACaP (Magdalenc, 2019).....	34
Slika 30: Rezultat pred sušenjem za banano (Magdalenc, 2019). .....	34

Slika 31: Rezultat pred sušenjem za rdečo čebulo (Magdalenc, 2019). .....	35
Slika 33: Rezultat pred sušenjem za jagodo (Magdalenc, 2019) .....	35
Slika 33: Rezultat pred sušenjem za avokado (Magdalenc, 2019). .....	36
Slika 34: Rezultati izolacije DNA pred sušenjem (Magdalenc, 2019). .....	36
Slika 35: Tehtanje (Magdalenc, 2019). .....	40
Slika 36: Priprava gela (Magdalenc, 2019). .....	41
Slika 37: Priprava aparatov (Magdalenc, 2019). .....	41
Slika 38: Elektroforeza (Magdalenc, 2019). .....	42
Slika 39: Aparati za elektroforezo (Magdalenc, 2019). .....	42
Slika 40: Odčitavanje rezultatov (Magdalenc, 2019). .....	43
Slika 41: Opazovanje rezultata pod UV svetlobo (Magdalenc, 2019). .....	43
Slika 42: Odčitavanje rezultatov na računalniku (Magdalenc, 2019). .....	44
Slika 43: Prenos dela DNA v epico (Magdalenc, 2019) .....	44
Slika 44: Rezanje dela DNA iz gela (Magdalenc, 2019) .....	45
Slika 45: Odčitavanje rezultatov na računalniku (Magdalenc, 2019). .....	45
Slika 46: Sterilizirane erlenmajerice (Magdalenc, 2019) .....	46
Slika 47: Pripomočki v laboratoriju (Magdalenc, 2019) .....	46
Slika 48: Aparat za gojenje organizmov (Magdalenc, 2019). .....	47
Slika 49: Aparat za gojenje organizmov (Magdalenc, 2019). .....	47

### 1.3 Kazalo preglednic

Preglednica 1: Primeri živil, ki vsebujejo laktozo (Swallow, 2016). .....	9
Preglednica 2: Uporabljene kratice za označevanje poskusov. ....	26
Preglednica 3: Rezultati poskusa izolacije DNA. ....	37

### 1.4 Kazalo grafov

Graf 1: Rezultati izolacije DNA. ....	38
Graf 2: Rezultati primerjave uporabe etanola ali propanola. ....	38
Graf 3: Rezultati primerjave uporabe raztopine kalcijevega ali kalijevega klorida. ....	39

## **ZAHVALA**

Raziskovalno nalogo sem pripravila s pomočjo mentorja, mag. Bojana Pozniča, prof. biologije in kemije, za kar se mu iskreno zahvaljujem. Zahvaljujem se tudi družini in prijateljem za podporo in pomoč pri izdelavi raziskovalne naloge. Zahvaljujem se tudi gospe ravnateljici Marijani Kolenko in učiteljem, ki so nam pomagali pri izdelavi te raziskovalne naloge. Zahvaljujem se komisiji za pregled dela. Posebno pa se moram zahvaliti gospe Niki Lendero Krajnc in njenim sodelavcem, ki so bili pripravljeni predstaviti njihovo delo in ker so mi pomagali najti pot do uspešnega raziskovanja.

## IZVLEČEK

Za razgradnjo laktoze v mleku je odgovoren encim laktaza, ki je v otroštvu zelo aktiven, vendar se pri večini sesalcev, vključno z večino ljudi, aktivnost laktaze zmanjšuje. Pri drugih zdravih ljudeh aktivnost laktaze traja na visoki ravni v odrasli dobi, kar jim omogoča prebavo laktoze. Ko je človek začel piti mleko drugih živali, je to privedlo do mutacije gena. Tisti, ki lahko brez posledic uživajo mleko in mlečne izdelke, v sebi nosijo mutacijo, ki je našim prednikom omogočila uživanje tega živila. Različice gena MCM6 (gen MCM6 se nahaja v 2. kromosomu pri ljudeh) so močno povezane z izražanjem gena za laktazo.

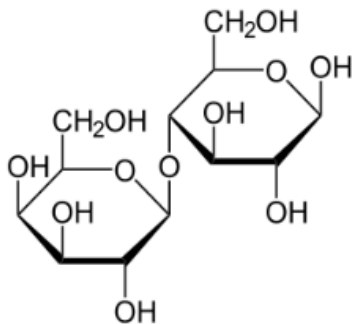
## POVZETEK

Laktoza je glavni sladkor v mleku, sestavljena iz glukoze in galaktoze, povezana z  $\beta$ -galaktozidno vezjo. Nezmožnost prebavljanja mlečnega sladkorja zaradi pomanjkanja encima laktaze imenujemo laktozna intoleranca, za katero trpi 65 % prebivalstva po celotnem svetu. Pojavnost je pogojena z etničnimi skupinami in pogostostjo uživanja mlečnih živil. Če se laktoza ne razgradi, jo črevesne bakterije fermentirajo v različne pline, kot so ogljikov dioksid, metan, vodik. Ti plini povzročajo napihnjenost, diarejo in abdominalne bolečine. Če pa se encim laktaza ohrani, se v tankem črevesju laktoza razgradi na glukozo in galaktozo, ki ju naše telo izkoristi za energijo in v drugih procesih. Ljudem, katerim je bila diagnosticirana laktozna intoleranca se ponavadi predpiše dieta brez mleka in mlečnih izdelkov, vendar ob izogibanju teh živil lahko pride do pomanjkanja kalcija ter vitamina D. V današnjih časih izogibanje mlečnim izdelkom ni več potrebno, saj vemo, da hidrolizirano mleko in fermentirani mlečni izdelki vsebujejo bistveno manj laktoze, ki jih lahko prebavljajo tudi intolerantni ljudje. Tehnologija je tako napredovala, da encim laktazo v večjih količinah proizvajajo v mikroorganizmih, zato ga v obliki kapsul lahko ponudijo kot zdravilo. Posamezniki si lahko lajšajo simptome tudi tako, da mlečne izdelke uživajo skupaj z drugimi živali. Potrdili smo hipotezo, da so pojmi laktoza, laktaza in geni med seboj povezani. Aktivnost laktaze se spreminja s starostjo in je pri različnih populacijah ljudi različna. Potrdili smo hipotezo, da bomo iz banane izolirali največ DNA. Ovrgli smo hipotezo, da bo iz raztopina kalcijevega klorida najbolj primerna za izolacijo DNA. Ovrgli smo hipotezo, da se bo v etanolu DNA najboljše izoborila. Potrdili smo hipotezo, da bomo pri jagodi bodili najbolj belo DNA.

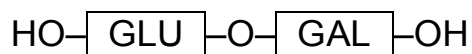
## 1 TEORETIČNI UVOD

### 1.1 LAKTOZA

Laktoza latinsko lac, lactis pomeni mleko. Laktoza oziroma mlečni sladkor je naravni sladkor, ki ga vsebujejo mleko in mlečni izdelki in je glavni vir energije v mleku. Sestavljen je iz dveh monosaharidov, glukoze in galaktoze, ki ju povezuje galaktozidna vez v disaharid (Graunar et al, 2016).



Slika 1: Formula disaharida laktoze (LifeGenetics, 2012).

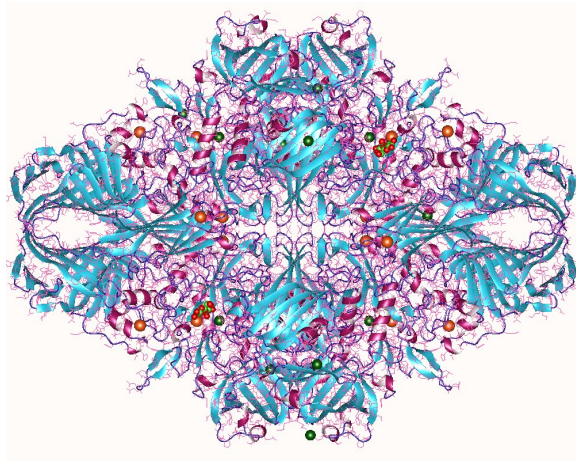


Slika 2: Molekula laktoze (Graunar et al, 2016).

### 1.2 LAKTAZA

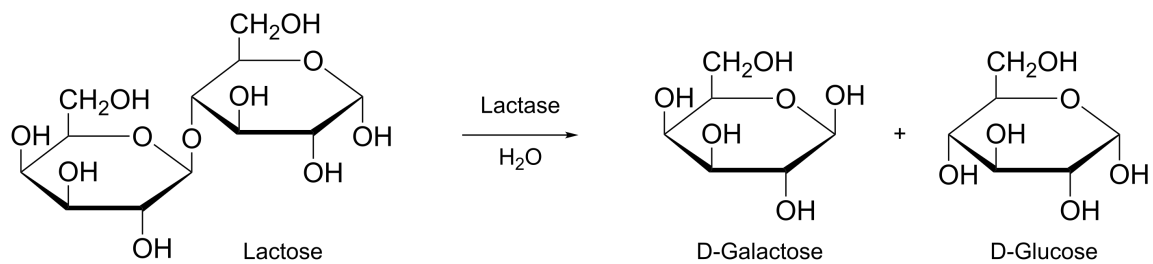
Encimi pospečujejo procese v celicah. So biološki katalizatorji reakcij, ki omogočajo, da kemijske reakcije v celicah potekajo oziroma, da potekajo dovolj hitro za normalno delovanje celice. Laktaza je encim, ki razgradi laktozo v glukozo in galaktozo. Številka EC (iz angleščine Enzyme Commission number) je numerična klasifikacijska shema za encime. Številka je osnovana na vrsti kemične reakcije, ki jo katalizirajo. Za laktozo je število EC: 3.2.1.23. Laktaza ima temperaturni optimum delovanja približno pri 48 °C. Za njeno delovanje je najboljši pH 6,5 (Graunar et al, 2016; Wikipedia, 2017; Starčič Erjavec et al, 2013).

Spodnja slika prikazuje model laktaze pri bakteriji Escherichia coli.



Slika 3: Model laktaze Escherichia coli (Wikipedia, 2017).

Spodnja shema prikazuje hidrolizo disaharida laktoze v monosaharida.



Shema 1: Laktaza razgradi laktozo (Wikipedia, Edgar181, 2011).

Industrijsko proizvedena laktaza je lahko pridobljena iz gliv kvasovk. Primarni namen je razgraditi laktozo v mleku in jo narediti primerno za ljudi z laktozno intoleranco. Laktaza se uporablja tudi v proizvodnji sladoledov ter kot pretvornik sirotke v sirup (Wikipedia, 2017).



Slika 4: Tablete z encimom laktaze (Viškova, 2019).



Pred manj kot desetimi leti so odkrili gensko kristalografijo, s pomočjo katere lahko zelo zanesljivo napovemo, ali bo odrasla oseba lahko presnavljala laktozo ali ne. V primeru mutacije gre običajno za spremembo nukleotida C (citozin) v T (timin) v intronu gena MCM6. Gen MCM6 vpliva na delovanje gena, ki kodira encim laktazo in lahko ob prisotnosti tega genskega polimorfizma prepreči nastajanje tega encima. Alel C je povezan z nizko, alel T pa z visoko aktivnostjo laktaze v odrasli dobi. Ljudje z genotipom CC po petem letu starosti ne morejo več normalno prebavljati mlečnega sladkorja laktoze in so torej laktozno intolerantni. Ljudje z genotipom TT ali TC pa laktozo navadno normalno prebavljajo, pravimo, da imajo laktazno persistenco (Wikipedia, 2017).

### 1.3 LAKTOZA, LAKTAZA IN MLEKO

Mleko je izključno običajni izloček mlečnih žlez. Pri sesalcih je osnovna hrana vsakega mladiča in poleg sladkorja vsebuje še beljakovine in maščobe, ki so prav tako zelo pomembne za pravi razvoj mladiča. Laktoza predstavlja v mleku med 2 do 8 % suhe snovi.

Ker je laktoza disaharid, se mora najprej razgraditi na enostavne monosaharide (glukozo, galaktozo), da jih lahko telo uporabi za vir snovi in energije. Encim laktaza, ki ga tvorijo črevesne celice v telesu mladiča laktozo hidrolizira. Nastalo glukozo hitro absorbirajo enterociti in jo prenesejo v krvni obtok in postane vir energije v procesu celičnega dihanja. Enterociti so celice, ki tvorijo površino črevesnih resic. Medtem ko nastala galaktoza postane sestavni del glikolipidov in glikoproteinov (Suarez et al, 1995; Rienzo et al, 2003; LifeGenetics, 2012; Graunar et al, 2016).

Sestava mleka je odvisna predvsem od vrste živali. Na primer kravje mleko ima v povprečju 87,5 % vode in 12,5 % suhe snovi, v kateri je (povzeto po Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano [online]):

- 3,6 do 4,2 % mlečne maščobe,
- 3,3 % beljakovin,
- 4,7 % mlečnega sladkorja - laktoze,
- 0,7 % mineralov (predvsem kalcija in fosforja) ter vitaminov (A, D, E, K ter vitamini B kompleksa).

Vsebnost laktoze v mleku in mlečnih izdelkih je različna. Največ je najdemo v človeškem mleku. Človeško mleko vsebuje več laktoze kot kravje, in sicer kar 5-8 % laktoze, medtem ko jo je v kravjem nekoliko manj, in sicer 4-6 % običajno 4,7% (Lukito et al, 2015; povzeto po Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano [online]).

Laktozo najdemo v mleku, jogurtih, sirih, maslu, sladoledu, različnih kremnih namazih in drugih živilih. Ne najdemo pa je le v mlečnih izdelkih, ampak tudi v nekaterih zmrznjenih, konzerviranih in pakiranih živilih, kamor uvrščamo kruh, kosmiče, piškote, zmrznjene predpripravljene večerje, margarine, solatne prelive, sladkarijah, čokoladah, juhah in še marsikje drugje, kjer je ena izmed sestavin mleko, mlečni derivati, laktoza, kaziinati (FDA, 2009).

Izdelki	Vsebnost laktoze (g / 100 g)
Manj mastno mleko v prahu	52,0
Polnomastno mleko v prahu	38,0
Rikota	0,2 – 5,1
Manj mastno mleko	5,0
Polnomastno mleko (3,5%)	4,8
Ovčje mleko	4,8
Skuta	3,3
Kisla smetana	3,3
Sladka smetana	3,3
Navadni jogurt	3,2
Sir	0,05 – 3,2
Sladoled	1,9
Mozzarella	0,1 – 1,1
Maslo	0,6
Ovčji sir	0,1

Preglednica 1: Primeri živil, ki vsebujejo laktozo (Swallow ,2016).



Slika 5: Mleko in mlečni izdelki (Jelovšek, 2014)

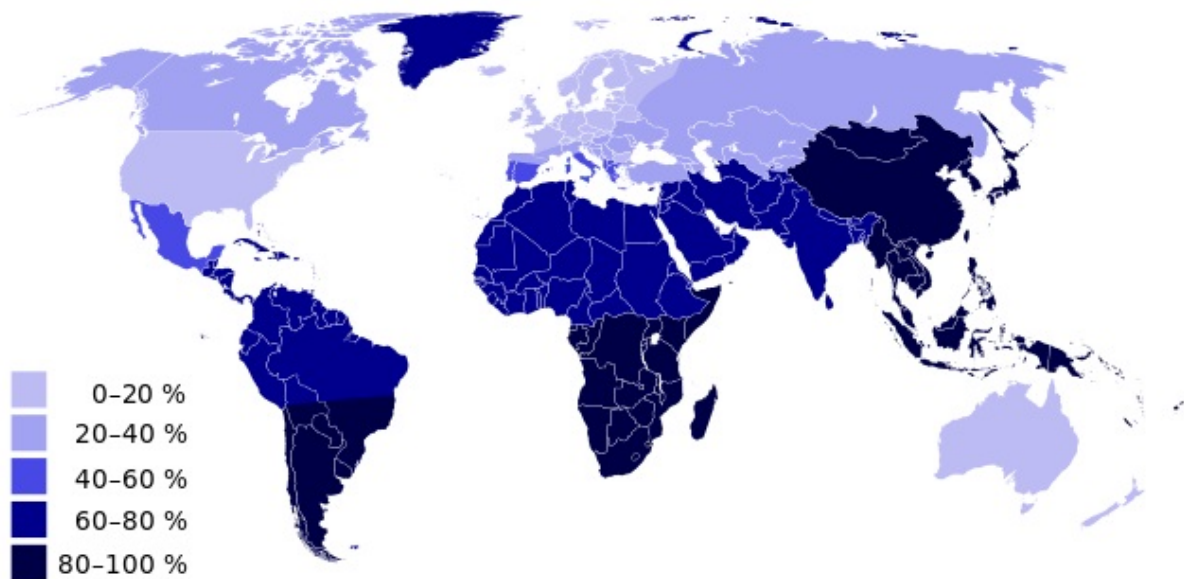
Laktoza spodbudi rast koristnih bakterij (na primer Bifidobakterij) v tankem črevesju sesalcev. Večina otrok po rojstvu razvije sposobnost izločanja encima laktaze. Vendar pa otrok za rast in razvoj kmalu potrebuje več energije in hranilnih snovi, ki jih v materinem mleku ni več dovolj. Uživati prične druge vrste hrane, kot so zelenjava, sadje, ribe, meso in podobno, pri čemer se posledično v črevesju količina laktoze zmanjša, obenem pa se zato zmanjša tudi izražanje gena za encim laktazo in laktaze je v črevesju postopno vse manj. Pri nekaterih ljudeh se količina tega encima tako zmanjša, da človeku prične povzročati črevesne težave, ki največkrat nakazujejo na laktozno intoleranco (LifeGenetics, 2012).

Laktaza se pri ljudeh razvije že v 8. tednu nosečnosti in narašča vse do 34. tedna. Prebava laktoze je nujno potrebna za zdravje v času dojenja, v nasprotnem primeru je pomanjkanje laktoze lahko usodno, če se ne prepozna stanja pomanjkanja že zgodaj. Velika večina otrok laktozo prebavlja, po osmih letih pa se lahko razvije primarna laktozna intoleranca (Di Rienzo in sod., 2013). Vedno manj zaužijemo mleka in vedno več ostale hrane. S tem se encim v črevesnih celicah postopoma preneha izločati. Zmanjševanje laktazne aktivnosti je genetsko pogojeno. Pri nekaterih posameznikih pa laktozna aktivnost ostane visoka in lahko brez težav prebavljajo laktozo (Swallow, 2003).

#### **1.4 LAKTOZNA INTOLERANCA IN ALERGIJO NA MLEKO**

Pomembno je, da ne zamenjujemo laktozne intolerance z alergijo na mleko, saj gre za popolnoma različni bolezni, čeprav so si nekateri simptomi podobni.

Alergija na mleko je bolezen, kjer pride do imunskega odgovora običajno na beljakovine v mleku. Laktozna intoleranca pa ni bolezen, kajti gre le za pomanjkanje encima laktaze, ki je potreben pri metabolizmu hidrolize laktoze. Laktozna intoleranca oziroma hipolaktazija je zelo pogosta. Po raziskavah ima kar 65% populacije znižano sposobnost predelave laktoze. V nekaterih skupnostih, na primer v vzhodni Aziji, je na laktozo intolerantne kar 90 % populacije. Med simptome laktozne intolerance sodijo napihnjenost, driska in trebušni krči. Za razliko od alergije, intoleranca ne povzroča kožnih in dihalnih težav. Simptomi se pojavijo med 30 minutami do 2 ur po zaužitju mleka (Dasha, 2017).



Slika 6: Prikaz oseb z laktozno intoleranco po svetu v odstotkih (Larry Li, 2014).

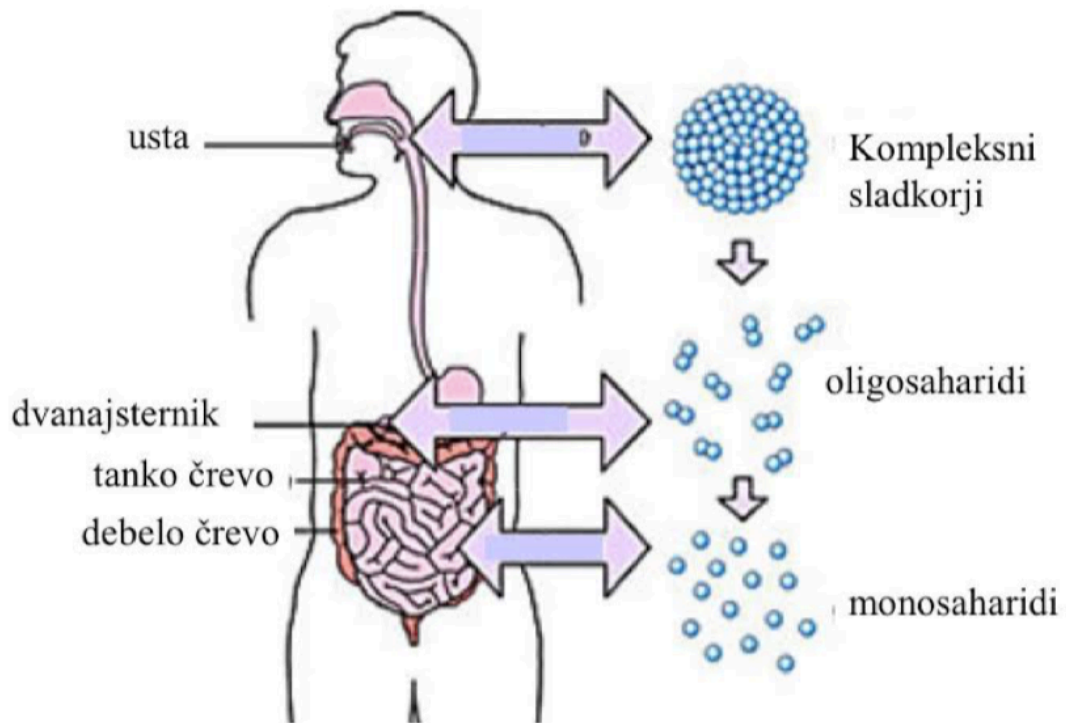
Alergija na mlečne beljakovine je ena izmed najpogostejših alergij na hrano. Otroci do enega leta starosti kravjega mleka sploh ne bi smeli piti. Alergija na mleko je najbolj pogosta pri dojenčkih, 90 % novorojenčkov z alergijo na mlečne beljakovine, se je znebi v treh letih. Alergija je prekomerna reakcija imunskega sistema na mlečne beljakovine. Nekaj ur do nekaj dni po zaužitju mlečnega izdelka se lahko pojavijo simptomi alergije. To so težave s prebavo (bruhanje, krči, driska), težave s kožo (izpuščaji, ekcem, koprivnica), težave z dihanjem (nahod, astma), v nekaterih primerih pa se lahko zaužitje mleka pri alergiku veže z motnjami rasti pri otrocih (Dasha, 2017).

## 1.5 METABOIZEM LAKTOZE

Metabolizem laktoze pri ljudeh in pri ostalih organizmih je zelo podobno. Večina ljudi je mnenja, da je skodelica osvežilnega mleka idealna v prehrani mačk. A je to prepričanje zmotno. Večina mačk namreč mleka ne prenaša. Zanje bo najboljša skodelica sveže vode, zlasti v toplejših dneh (Ferjan Hvalc, 2016).

Veliko psov ima – podobno kot ljudje – laktozno intoleranco, zaradi česar sira strokovnjaki na pasjem jedilniku ne priporočajo. Sir je mlečni izdelek, zato ni najprimernejša hrana za pse. Veliko štirinožcev ima podobno kot ljudje laktozno intoleranco, zaradi česar se morajo popolnoma izogibati mleku in mlečnim izdelkom. Psi, ki imajo laktozno intoleranco, imajo,

po zaužitju mlečnih izdelkov težave z vetrovi in prebavo. Nekateri odrasli psi pa imajo lahko težave tudi s prebavljanjem mlečnih beljakovin, saj so te v prvi vrsti namenjene mladičem (G.Z., 2018).

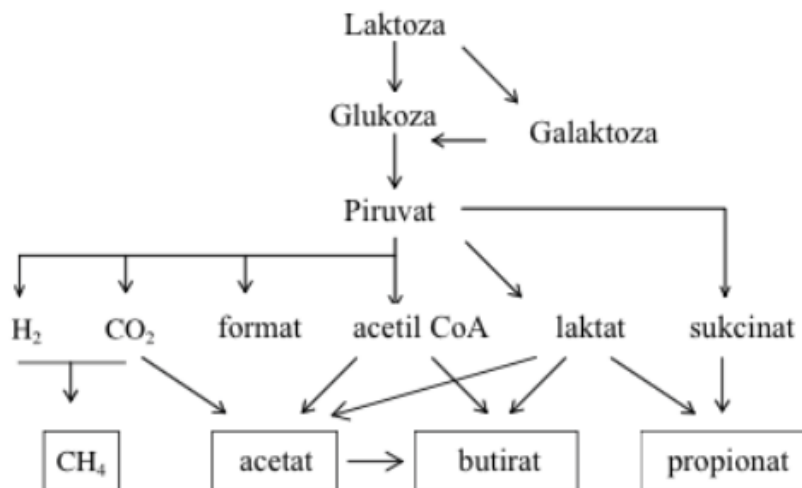


Shema 2: Metabolizem ogljikovih hidratov (Kolarič, 2016).

## 1.5 LAKTAZA IN GENI

Razvojni raziskovalci in genetiki so razvozlali vprašanje, zakaj nekateri sploh ne prenesejo mleka. Zelo verjetno je, da praljudje niso prenašali laktoze. To se je spremenilo najprej v Evropi v mlajši kameni dobi. Neolitski Evropejci so sicer lahko jedli goveje meso, niso pa prenesli mleka. In tedaj, pred približno 7000 leti, je evolucija začela z velikim poskusom, katerega poskusni zajčki so bili prebivalci Evrope, za njimi pa so prišli na vrsto Afričani. Narava je ta poskus sprožila z razvojem poljedelstva in živinoreje (F.S., 2007).

Ko je človek začel piti mleko drugih živali, je to privedlo do mutacije gena. Tisti, ki lahko brez posledic uživajo mleko in mlečne izdelke, v sebi nosijo mutacijo, ki je našim prednikom omogočila uživanje tega visokoenergijskega živila. Pri mutaciji ohranjanja produkcije laktaze v telesu, gre za spremembo v genskem zapisu, ki se je, podobno kot določena barva oči, plavi lasje ali krvna skupina razširila med človeško populacijo (R.G., 2018).



Shema 3: Bakterijska fermentacija neprebavljene laktoze v debelem črevesju (Kolarič, 2016).

Mutageni dejavniki so fizikalni (sevanje UV žarkov, rengen, jedrske nesreče, X žarki...) in kemični (težke kovine) (Wikipedija, 2015).

Pri organizmih, ki se lahko razmnožujejo bodisi spolno bodisi nespolno, pa lahko okolje vpliva tudi na to, kateri tip razmnoževanja bo uspešnejši. Nespolno razmnoževanje, ki ne omogoča raznolikosti, saj se večinoma nespremenjena dedna snov samo enega starša prenese v naslednjo generacijo, ima prednost v okolju s stabilnimi razmerami. Nespolno razmnoževanje je namreč hitrejšo in energijsko manj zahtevno ter tako omogoča pojav večjega števila okolju že prilagojenih potomcev. V okolju z nestabilnimi razmerami pa ima prednost spolno razmnoževanje, pri katerem potomci nastajajo z združitvijo ženske in moške spolne celice. Spolno razmnoževanje namreč omogoča nastanek potomcev, ki imajo nove kombinacije dedne snovi in se torej po genotipu med seboj od staršev razlikujejo. Tako obstaja bistveno večja verjetnost, da bo kateri izmed njih prilagojen nestabilnim razmeram v okolju in bo tako preživel. Tudi v nestabilnih okoljskih razmerah bi bilo večje število potomcev sicer ugodnejše, a je v tem primeru pomembnejše, da pride do novih kombinacij DNA in tako do večje raznolikosti med potomci (Erjavec et al., 2013).

MCM6 je eden od zelo ohranjenih mini-kromosomskih vzdrževalnih proteinov, ki so bistveni za uvajanje evkariotske replikacije genoma. Različice gena MCM6 so močno povezane z izražanjem gena za laktazo (Wikipedia, 2017).

## 1.6 ZDRAVLJENJE LAKTOZNE INTOLERANCE

Pri zdravljenju laktozne intolerance nimamo ravno veliko izbire, zato se poslužujemo diete z upoštevanjem vrednosti laktoze po zgornji tabeli ali uživanju na tržišču dosegljivimi izdelki brez laktoze. Ljudje, ki ne uživajo mleka in mlečnih izdelkov morajo biti še posebej pozorni na zadosten vnos kalcija iz drugih virov. Med najboljše rastlinske vire kalcija uvrščamo mandlje, lešnike, zeleno listnato zelenjavo in sojo (Dasha, 2017).

## 1.7 IZOLACIJA DNA

Švicarski zdravnik Johannes Friedrich Miescher je leta 1869 kot prvi izoliral snov iz celičnih jeder. Delal je v Nemčiji, na univerzi v Tübingenu, kjer so na fakulteti za naravoslovje raziskovali kemijo tkiv in izolirali molekule iz celic. Miescherjeva naloga je bila izolirati in preučiti sestavo levkocitov – belih krvnih celic. Iz bližnje bolnišnice si je priskrbel poveje bolnikov z gnojnimi ranami, saj je v gnoju ogromno levkocitov. Poveje je za nekaj časa namočil v solno raztopino, tako da so se celice sprale z njih. Nato je poveje odstranil in solni raztopini s celicami dodal šibko bazično raztopino. Celice so se razkrojile in na dnu reakcijske posode se je pojavila usedlina, v kateri so bila jedra celic. Iz celičnih jeder je nato izoliral do takrat še neznano kemijsko snov, ki jo je poimenoval nuklein. Nuklein je našel tudi v drugih celicah, ki jih je raziskoval (npr. v spermi lososa) (Erjavec et al, 2013).

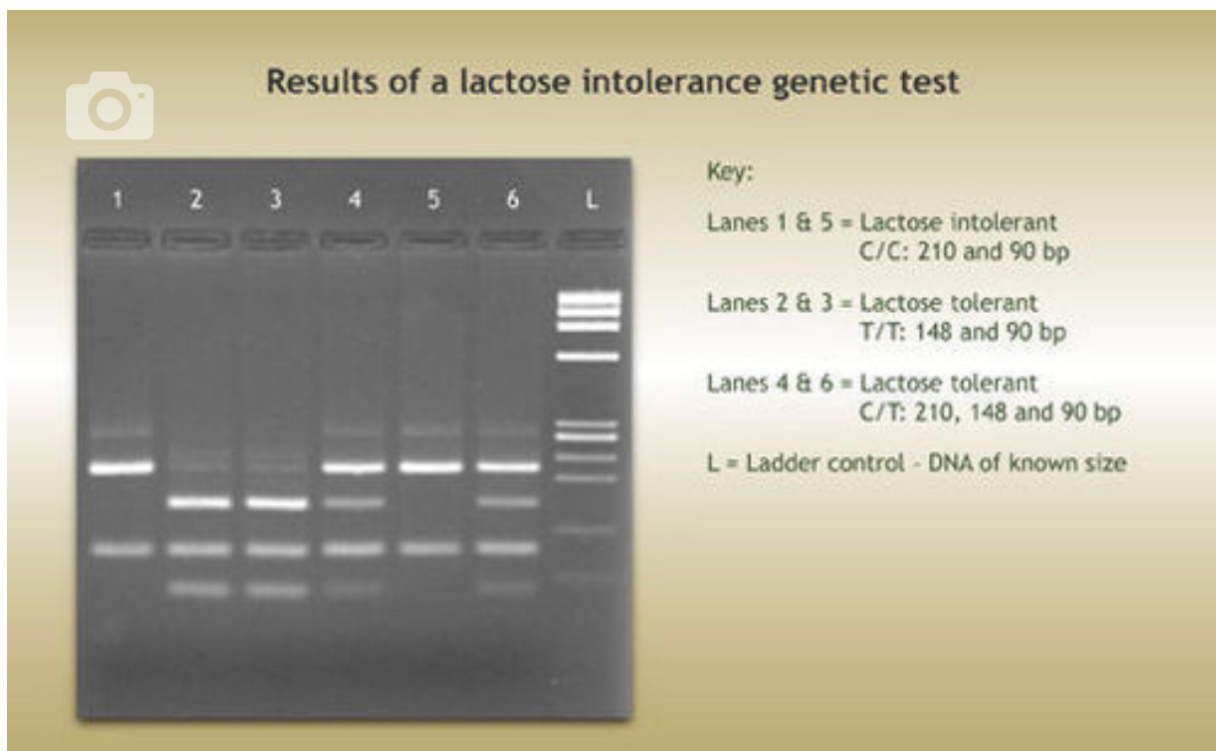
V literaturi zasledimo različna navodila za izolacijo DNA. Spodaj je zapisan primer kako izolirati DNA doma (Erjavec et al., 2013):

1. 100 g čebule ali jeter zreži na koščke, stresi v kuhinjski mešalnik in prelij z 200 ml tople slane vode (1–2-odstotne raztopina NaCl v H<sub>2</sub>O). Koščki naj bodo v celoti prekriti z raztopino NaCl.
2. Kuhinjski mešalnik vklopi za 5–10 sekund (pazi, da materiala ne utekočiniš v celoti). Nato material prelij skozi kuhinjsko cedilo za čaj v svežo 250-mililitrsko čašo. Napolni jo približno do polovice.
3. Odmeri 2–3 čajne žličke tekočega detergenta za pomivanje posode in ga nežno umešaj v zmes v čaši. Pazi, da pri tem ne nastanejo zračni mehurčki.

4. Dolij 100 ml 70-odstotnega alkohola (etanola). Dolivaj ga počasi po steni čaše, tako da nastane ločena plast alkohola nad plastjo tekočega detergenta, vode in ostankov celic.
5. Počakaj 3–5 minut in opazuj, kaj se dogaja. DNA se bo iz spodnjega sloja detergenta, vode in ostankov celic počasi dvignila v vrhnji, alkoholni sloj. Zdaj lahko DNA iz vrhnjega sloja naviješ na zobotrebec.

## 1.8 ELEKTROFOREZA

Izolirano DNA lahko s pomočjo elektroforeze lažje primerjamo med vzorci organizmov. Elektroforeza je gibanje nabitih delcev v tekočini pod vplivom električnega polja (Kolarič, 2013). Prisotnosti določenih genov tako lahko dokažemo z elektroforezo. Spodnja slika prikazuje rezultat genskega testa za laktozno intoleranco.



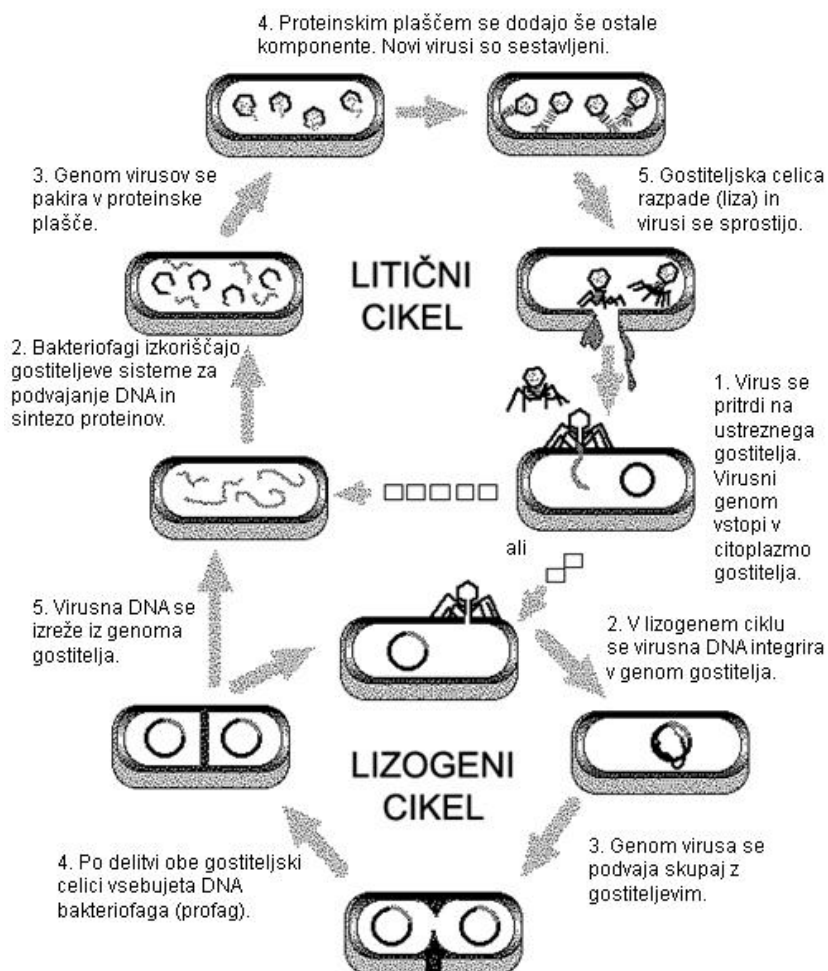
Slika 7: Rezultat genskega testa za laktozno intoleranco (Upton, 2009).



## 1.9 CRISPR JE NARAVNI BAKTERIJSKI SISTEM

CRISPR (angleško Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) je naravna zaščita bakterij (tudi arhej), pred virusi (bakteriofagi) in preprostimi horizontalnimi prenosi DNA, ki za bakterije niso vedno koristni.

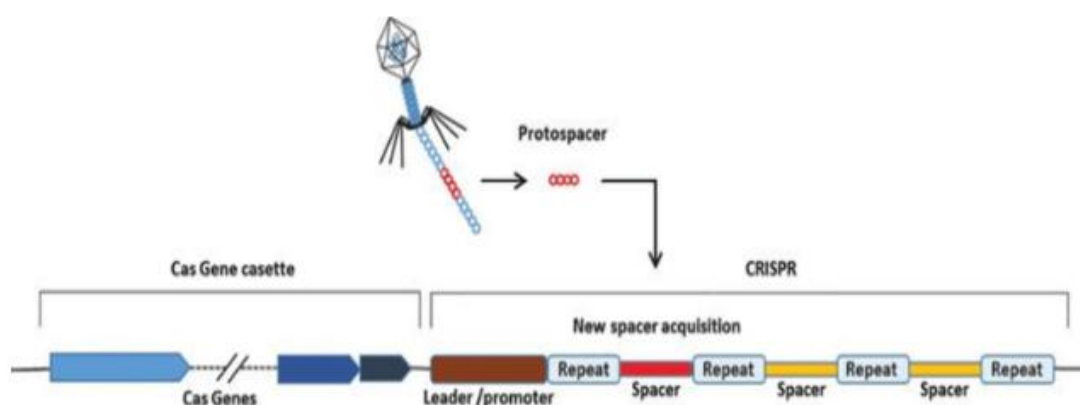
Bakteriofagi so virusi, ki okužijo bakterije. Ko bakteriofag naleti na ustrezno bakterijo in se uspešno adsorbira nanjo, so možne tri nadaljnje strategije pomnoževanja virusa: litični cikel, lizogeni cikel ali pa psevdogenija. Pri litičnem ciklu se pričnejo bakteriofagi graditi takoj po vstopu genoma v gostiteljsko celico in nato sledi liza (razpad) celice, po kateri se novi bakteriofagi sprostijo v okolico. Pri lizogenem ciklu in psevdogeniji, pa lahko genom bakteriofaga nekaj časa miruje, dokler ne dobi ustreznega dražljaja za pomnoževanje (Sauvageau, 2010). V spodnji shemi lahko preberemo o litičnem in lizogenem ciklu.



Shema 4: Litični in lizogeni cikel (povzeto po Horvat, 2015).

CRISPR je družina zaporedij DNA v genomih prokariotskih organizmov, kot so bakterije in arheje. Izvirajo iz fragmentov DNA virusov, ki so okužili določen organizem in ga ta organizem uporablja, da zazna in uniči DNA podobnih virusov ob kasnejših okužbah. Našli so ga v približno polovici do zdaj razvozlanih bakterijskih genomov in skoraj 90% genomov arhej, kjer ima poleg obrambe pred bakteriofagi tudi vlogo kontrole prepisovanja genov in verjetno še druge (Hille, 2018).

Spodnja shema ponazarja zgradbo sistema CRISPR.



Slika 8: Značilne ponovitve in vmesniki/distančniki (spacer) (Lee S., et al, Journal of Cellular Biotechnology).

V bližini CRISPR zaporedja so Cas geni (s CRISPR povezani geni). Ko se ti geni aktivirajo, omogočijo nastanek posebnih encimov, ki so se v evoluciji najverjetneje razvili skupaj s CRISPR. Pomembna lastnost teh Cas encimov je njihova sposobnost delovanja v vlogi »molekularnih škarij«. Cas encimi režejo DNA molekulo. To pomeni, da v primeru novega napada virusa na bakterijo, CRISPR regiji, ki od prejšnjega napada virusa nosi informacijo o zaporedju virusa, lahko takoj reže DNA virusa s pomočjo Cas encimov. Ta »spomin« bakterije torej sproži serijo reakcij, ki Cas encim usmeri k virusu, ta pa ga takoj uniči (Strgar, 2018).

Bakterije torej razvile posebni genetski »spomin« o preteklih okužbah, ki jim omogoča zaščito pred novimi okužbami. Gre za preprosti »imunski« sistem, za obliko protivirusnega imunskega sistema prokariotov, ki daje organizmu pridobljeno imunost (Hille, 2018).

Raziskave CRISPR/Cas9 sistema, ki so pokazale, da lahko sistem deluje kot osnova za enostavne in učinkovite metode izvajanja urejanja genskega materiala v bakterijah, kvasovkah in človeških celicah (Strgar, 2018).

Genom organizma je tako mogoče spreminjati tudi namerno, tako, da izbrani del DNA spremenimo. Poznamo več dostopnih sistemov / tehnologij urejanja genoma, kot na primer ZNF, TALEN, CRISPR-Cas9 in drugi. S temi sistemi bi tako lahko popravili mutiran gen za laktazo.

## **2 OPREDELITEV RAZISKOVALNEGA PROBLEMA, CILJEV, RAZISKOVALNIH VPRAŠANJ IN HIPOTEZ**

Laktozna intoleranca je vsebolj pogosta. V delu želimo raziskati povezavo med laktozo, laktazo in geni ter ugotoviti, kako bi lahko mutirane gene popravili.

### **2.1 RAZISKOVALNI CILJI**

Z raziskovalno nalogo želimo raziskati predvsem povezavo med laktozo in laktazo, laktazo in geni, laktozo in laktozno intoleranco ter poiskati morebitne rešitve za laktozno intoleranco. V raziskovalno delo želimo vključiti praktično delo – poskus in obisk laboratorija.

### **2.2 RAZISKOVALNA VPRAŠANJA**

Zastavili smo si naslednja raziskovalna vprašanja:

- Čemu služi laktoza v telesu sesalcev?
- Kakšna je naloga laktoze v prehrani ljudi?
- Kako so povezani laktoza, laktaza in geni?
- Zakaj pride do mutacij na genu za laktazo?
- Kaj vemo o laktozni intoleranci?
- Kako pogosta je laktozna intoleranca?
- Kako jo zdravimo?
- Kaj vemo o alergiji na mleko?
- Kakšne so razlike in podobnosti v metabolizmu laktoze pri ljudeh in ostalih organizmih?
- Katera živila vsebujejo največ laktoze?
- Kakšne barve je DNA, ki jo izoliramo doma?
- Kateri biokemijske procese, ki so povezani z laktozo in laktazo poznamo?

### **2.3 HIPOTEZE**

Zastavili smo si naslednje hipoteze:

- Laktoza, laktaza in geni so med seboj povezani.
- Aktivnost laktaze se spreminja s starostjo.

- Aktivnost laktaze je pri različnih populacijah ljudi različna.

Hipoteze, ki se nanašajo na poskus:

- Iz banane bomo izolirali največ DNA.
- Raztopina kalcijevega klorida bo najbolj primerna za izolacijo DNA.
- V etanolu se bo DNA najbolj izoborila.
- Pri jagodi bomo dobili najbolj belo DNA.

## 2.4 IZBOR IN PREDSTAVITEV REZISKOVALNIH METOD TER POTEK RAZISKOVANJA

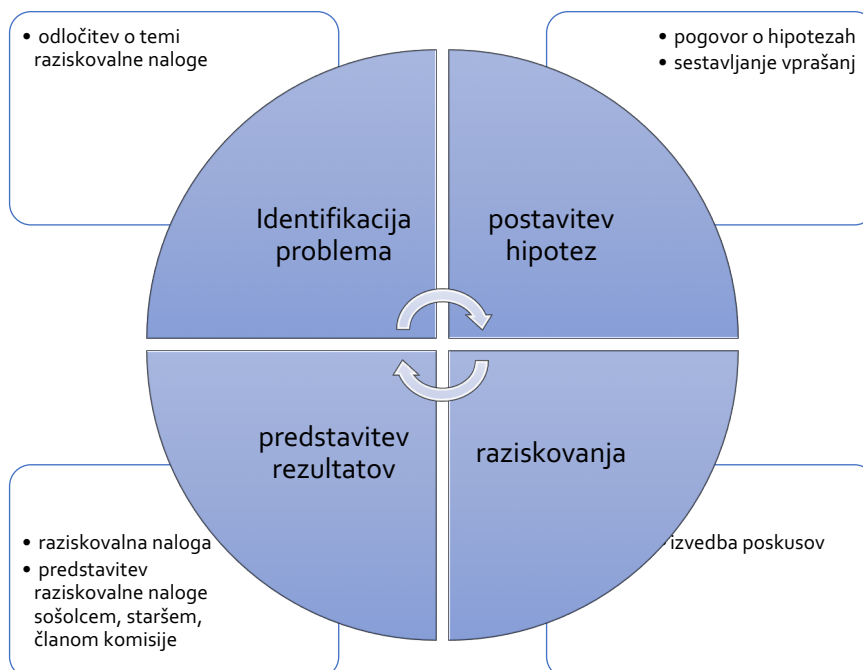
V prvem delu smo se posvetili podatkom, ki smo jo našli v knjigah, na internetu in v različnih člankih. Po pregledu virov in literature smo si zastavili raziskovalni problem in izpeljali raziskovalna vprašanja in hipoteze. Nato smo pripravili vprašalnik in vprašanja za intervjuje. Opravili smo intervju s strokovnjaki z različnih področij. Načrtovali in izvedli smo eksperimentalni del – poskuse. Obiskali smo laboratorij ACIES BIO v Ljubljani. Podatke smo obdelali s programom Microsoft Excel. V spodnji shemi lahko preberete faze raziskovanja.

Uporabljene so bile tehnike kvantitativnega raziskovanja:

- eksperiment,
- opazovanje in fotografiranje,
- statistična obdelava podatkov,
- pridobivanje informacij iz baz podatkov (<https://benchling.com>, <https://www.yeastgenome.org>, <https://benchling.com>).

Uporabljene so bile tehnike kvalitativnega raziskovanja:

- pogovor s strokovnjaki in obisk laboratorija,
- statistična obdelava podatkov.



Shema 5: Prikaz metode dela.

### 3 PREDSTAVITEV REZULTATOV

Po pregledu dostopne literature smo oblikovali pojmovno mrežo, saj smo želeli ugotoviti kako so ključni pojmi povezani med seboj. Uporabili smo tudi navedene baze podatkov o genomih nekaterih vrst organizmov.

#### 3.1.1 Saccharomyces Genom Database

Saccharomyces Genome Database (SGD, <https://www.yeastgenome.org>) je baza podatkov za kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*. Omogoča nam iskanje zaporedij nukleotidov, če poznamo ime proteina ali gena. Uporabna je za načrtovanje gensko spremenjenih organizmov (GSO) z namenom pridobivanja novih snovi (na primer insulin). Prikazuje tudi rezultate nekaterih metabolnih procesov. V bazi podatkov smo iskali s ključnimi pojmi. Spodnja slika prikazuje primer uporabniškega vmesnika na spletnem mestu <<https://www.yeastgenome.org/>>.

The screenshot shows the SGD website interface for the Gene Ontology Term: lactase activity. The top navigation bar includes 'Analyze', 'Sequence', 'Function', 'Literature', and 'Community'. A search bar on the right contains the text 'search: actin, kinase, glucose'. The main content area displays the following information:

- Gene Ontology Term: lactase activity**
- GO ID:** GO:0000016
- Aspect:** Molecular Function
- Description:** Catalysis of the reaction: lactose + H<sub>2</sub>O = D-glucose + D-galactose.
- Synonyms:** lactase-phlorizin hydrolase activity, lactose galactohydrolase activity

Below the description is an **Ontology Diagram** showing a hierarchy of terms:

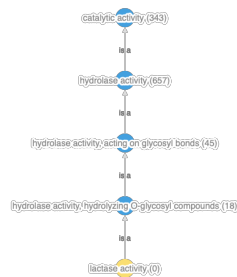
- catalytic activity (343)
- IS A
- hydrolase activity (667)
- IS A
- hydrolase activity, acting on glycosyl bonds (45)
- IS A
- hydrolase activity, hydrolyzing D-glycosyl compounds (18)
- IS A
- lactase activity (0)

The diagram also includes a 'Reset' button and a 'Download (.png)' button. The 'Annotations' section is empty, indicating no manually curated, high-throughput, or computational annotations for lactase activity.

Slika 9: Saccharomyces Genome Database (SGD, <https://www.yeastgenome.org>).

Za ključni pojem laktaze (angleško lactase) smo dobili naslednje rezultate:

Laktaza katalizira reakcijo razgradnje laktoze v glukozo in galaktozo. Prav tako so dostopni ontološki diagrami, ki prikazujejo laktazno aktivnost.



SGD 2019-03-03

Slika 10: aktivnost laktaze.

### 3.1.2 Gene ontology GO enrichment analysis

Gene ontology (GO) enrichment analysis je baza podatkov. V njej lahko iščemo gene in njihove funkcije. Spodnja slika prikazuje primer uporabniškega vmesnika na spletnem mestu ki je dostopna na spletnem mestu <<http://geneontology.org>>.

AmiGO 2 Home Search Browse Tools & Resources Help Feedback About AmiGO 1.8 Quick search Search

Information about Genes and gene products search

Filter results  
Total gene product(s): 35  
lactase  
No current user filters.  
Your search is pinned to these filters  
- document\_category: bioentity

Source  
Organism  
Type  
PANTHER family  
Direct annotation  
Inferred annotation

Total gene product(s): 35; showing: 1-10  
Results count 10

Gene/product	Gene/product name	Organism	PANTHER family	Type	Source	Synonyms
<input type="checkbox"/> lct	Lactase	Danio rerio	glycosyl hydrolase pthr10353	protein	UniProtKB	UniProtKB:AA0G2KIT0 PTN002233441
<input type="checkbox"/> lctlb	lactase-like b	Danio rerio	glycosyl hydrolase pthr10353	protein	ZFIN	si:rp71-14b1.1
<input type="checkbox"/> lctla	lactase-like a	Danio rerio	glycosyl hydrolase pthr10353	protein	ZFIN	zgc:101102
<input type="checkbox"/> Lct	lactase	Rattus norvegicus	glycosyl hydrolase pthr10353	gene	RGD	
<input type="checkbox"/> Lctf	lactase-like	Rattus norvegicus	glycosyl hydrolase pthr10353	gene	RGD	
<input type="checkbox"/> LCTL	Lactase-like protein	Homo sapiens	glycosyl hydrolase pthr10353	protein	UniProtKB	KLPH UNQ3022/PRO9820
<input type="checkbox"/> LCT	Lactase-phlorizin hydrolase	Homo sapiens	glycosyl hydrolase pthr10353	protein	UniProtKB	LPH
<input type="checkbox"/> LCT	Lactase	Canis lupus familiaris	glycosyl hydrolase pthr10353	protein	UniProtKB	
<input type="checkbox"/> Lctf	lactase-like	Mus musculus	glycosyl hydrolase pthr10353	protein	MGI	E130104I05Rik KLPH
<input type="checkbox"/> Lct	lactase	Mus musculus	glycosyl hydrolase pthr10353	protein	MGI	LOC226413 LPH Lphi

Cite this data • Terms of use • GO helpdesk  
Copyright © 1999-2018 the Gene Ontology

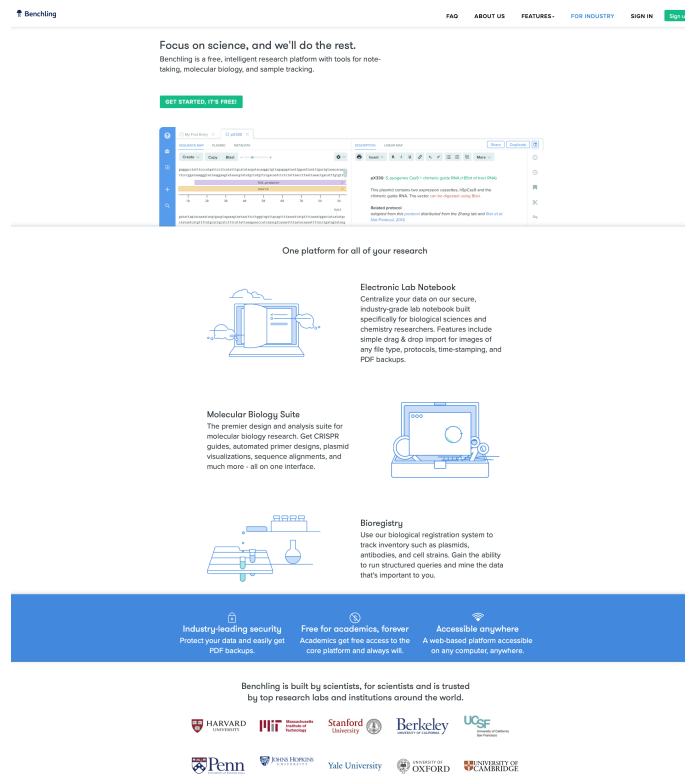
DOI: 10.5381/zenodo.2555603  
Last file loaded on 2019-02-02, see full details  
AmiGO 2 version: 2.5.12 (ami-go-production)

Slika 11: Iskanje podatkov v bazi Gene ontology (GO) enrichment analysis <<http://geneontology.org>>.

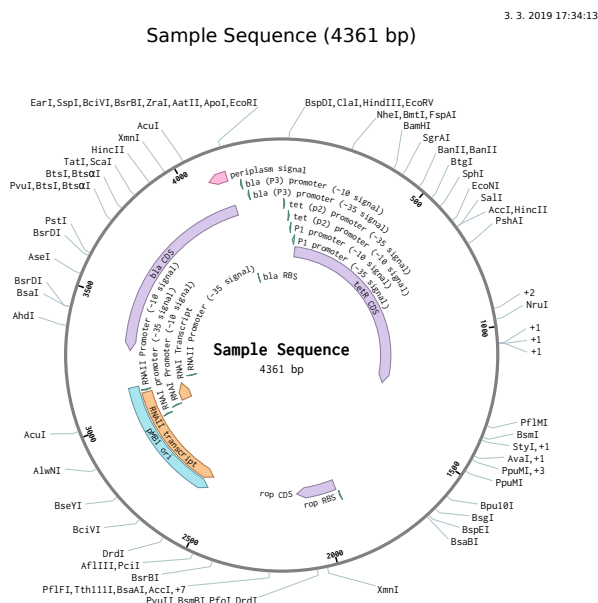


### 3.1.3 Benchling

Benchling je program, s katerim lahko načrtujemo urejanje genoma. Spodnja slika prikazuje primer uporabniškega vmesnika na spletnem mestu ki je dostopna na spletnem mestu <<https://benchling.com/enterprise/our-mission>>.



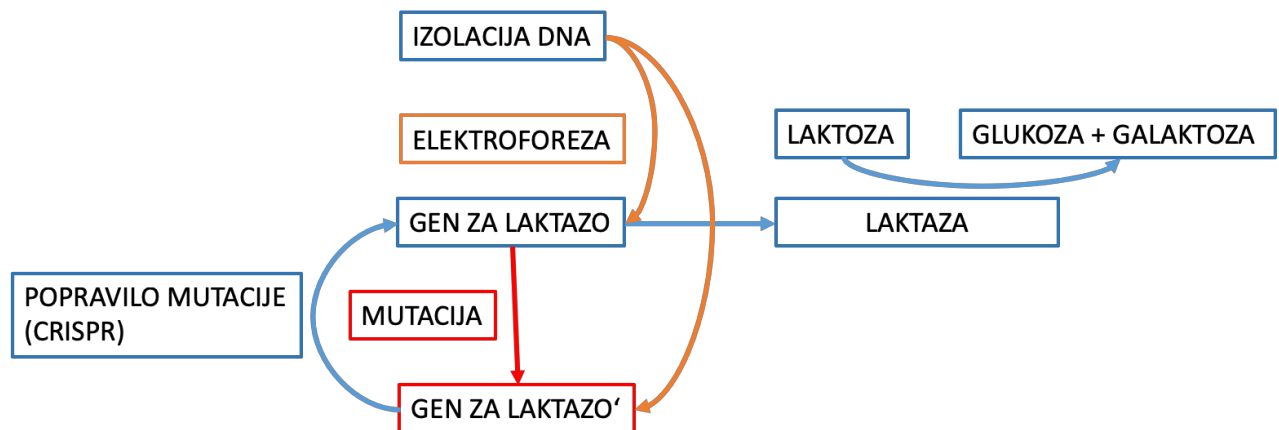
Slika 12: Benchling <<https://benchling.com/enterprise/our-mission>>.



Slika 13: Primer sekvence DNA iz programa Benchling.

Če želimo genom ciljno spreminjati, moramo poznati zaporedja nukleotidov. Poznati moramo posamezne gene.

Ugotovili smo, da so pojmi laktoza, laktaza in geni povezani. V dednem zapisu lahko imajo organizmi gen za encim laktazo, ki sladkor laktozo razgradi v monosaharida glukozo in galaktozo.



Shema 6: Povezava ključnih pojmov.

Ali ima organizem gen za encim laktazo ali ne lahko ugotovimo tako, da dedni material izoliramo (izolacija DNA). Nato s pomočjo elektroforeze primerjamo naš vzorec z vzori v bazah podatkov. Obstajajo še druge metode, ki natančneje določijo zaporedja nukleotidov. Rezultate pa primerjamo v bazah podatkov. Morebitne negativne mutacije gena za laktazo lahko popravimo. Poznamo več dostopnih sistemov / tehnologij urejanja genoma, kot na primer ZNF, TALEN, CRISPR-Cas9 in drugi.

V nadaljevanju bomo predstavili rezultate izolacije DNA pridobljene na vzorcih iz rastlin. Rastline smo izbrali zaradi lažjega dela z biološkim materialom.

### 3.2 IZLOACIJA DNA

Za izolacijo DNA smo izbrali rastline, zaradi lažje obdelave v šolskem laboratoriju. Uporabili smo 100 g banan (označeno z B), 100 g rdeče čebule (označeno z R), 100 g avokada (označeno z A) in 100 g jagod (označeno z J). Za 1-2% vodno raztopino smo uporabili kalcijev klorid (označeno s Ca) ali pa kalijev klorid (označeno s K). Za bazo smo uporabili brezbarvni detergent za pomivanje posode znamke DM. Za oboritev DNA v alhoholu smo uporabili etanol (označeno s E) ali pa propanol (označeno s P).

Pri poskusu, smo si olajšali delo tako, da smo vsakemu poskusu določili kratice, in sicer:

		kratica
sadje/zelenjava	banana	B
	rdeča čebula	R
	avokado	A
	jagoda	J
solna raztopina	kalcijev klorid	Ca
	kalijev klorid	K
alkohol	etanol	E
	propan-2-ol	P

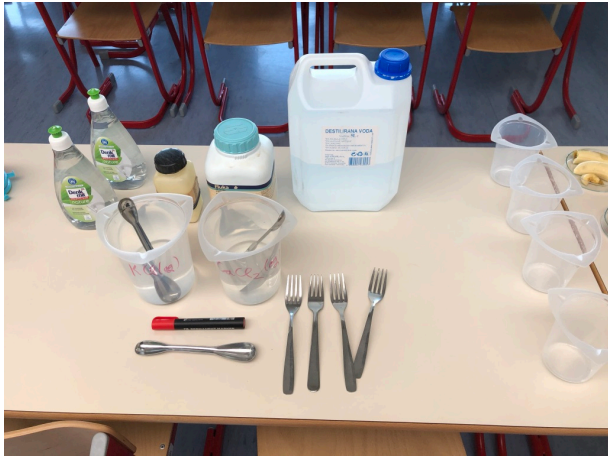
Preglednica 2: Uporabljene kratice za označevanje poskusov.

#### 3.2.1 Pripomočki

Pri izolaciji DNA smo uporabili naslednje kemikalije, pripomočke in biološki material:

- čaše,
- plastični lončki,
- petrijevke,
- urna stekla,
- steklene palčke,
- tehtnica,
- nož,
- vilica,
- zobotrebcji,
- spatula,
- ura (za merjenje časa mešanja),
- pladnji,
- kapalke,
- cedilo,
- pisala,
- etanol,
- propanol,
- detergent,
- raztopina kalijevega klorida,
- raztopina kalcijevega klorida,
- biološki material (sadje in zelenjava).

Spodaj je navedenih nekaj fotografij na katerih so pripomočki, ki smo jih uporabili za izlolacijo DNA.



Slika 14: Uporabljeni pripomočki (Magdalenc, 2019).



Slika 15: Uporabljeni pripomočki (Magdalenc, 2019).



Slika 16: Uporabljeni pripomočki (Magdalenc, 2019).



Slika 17: Priprava pripomočkov (Magdalenc, 2019).

### 3.2.2 Postopek

V prvi fazi smo pripravili vzorce biološkega materiala (sadja/zelenjave). Banane in jagode smo pretlačili. Avokado in čebulo smo narezali, ker sta bila pretrda. Biološkega materiala nismo želeli zmleti z mešalnikom. S tehtnico smo zatehtali štirikrat po 100 g vsakega sadja/zelenjave v petrijevki.



Slika 18: Zatehtano sadje in zelenjava (Magdalenc, 2019).

V drugi fazi smo dodali 1-2% vodno raztopino soli. Sadje smo presipali v čaše in dolili slano raztopino. Uporabili smo slano raztopino kalcijevega klorida ali pa raztopino kalijevega klorida.



Slika 19: Priprava slanih raztopin (Magdalenc, 2019).



Slika 20: Pretlačili smo biološki material (Magdalenc, 2019).

V tretji fazi smo vmešali prozoren detergent. Dodali smo 3 žlice detergenta ter mešali 3 minute. Nato smo precedili v drugo čašo. Uporabili smo 50 mL tekočine, ostalo smo odlili v stran.



Slika 21: Dodajanje detergenta (Magdalenc, 2019).

V četrti fazi smo dodali Etanol (96%) ali pa propan-2-ol (99,8%). Po stekleni palčki smo počasi dolili 50 mL alkohola.



Slika 22: Dodajanje alkohola (Magdalenc, 2019)



Slika 23: Opazovanje (Magdalenc, 2019).

Počakali smo, da je DNA priplavala na površje in nato smo jo prenesli na petrijevko. Rezultati so se pokazali čez nekaj minut.



Slika 24: Odstranjevanje DNA (Magdalenc, 2019).

Sledilo je opazovanje in zapisovanje rezultatov.



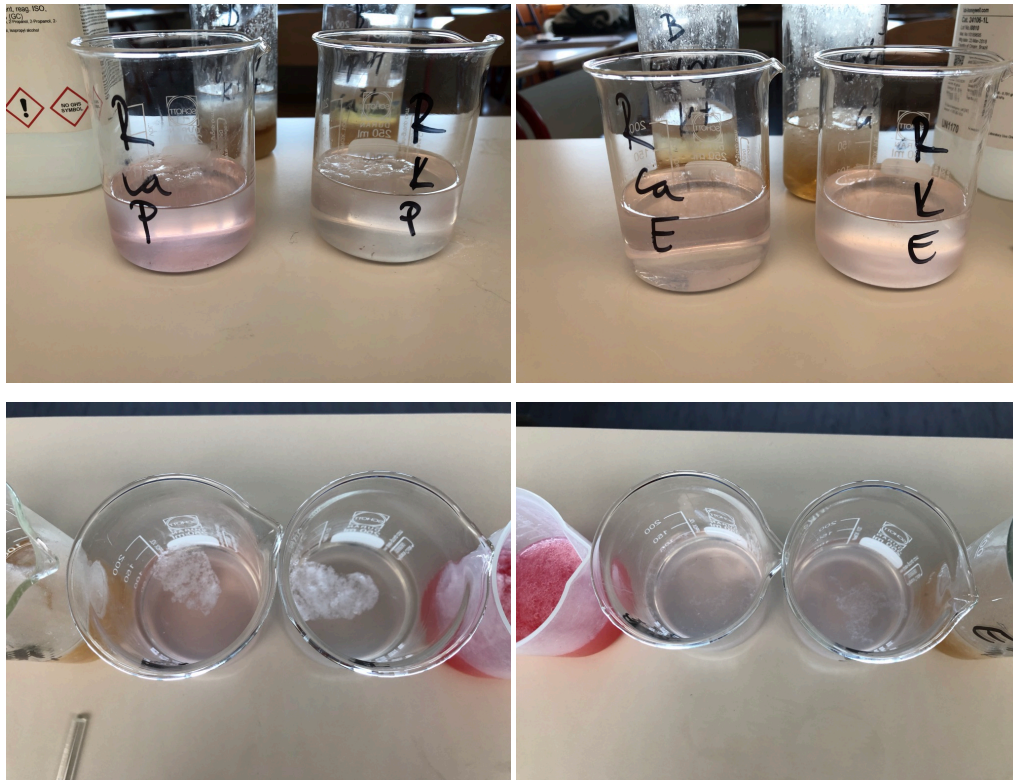


Slika 25: Sušenje na sobni temperature (21 °C) – izhlapevanje vode in alkohola (Magdalenc, 2019).



Slika 26: Rezultat BKE in BCaP (Magdalenc, 2019).

LAKTOZA, LAKTAZA IN GENI  
Raziskovalna naloga, 2019



Slika 27 Rezultat REK in RPCa (Magdalenc, 2019).

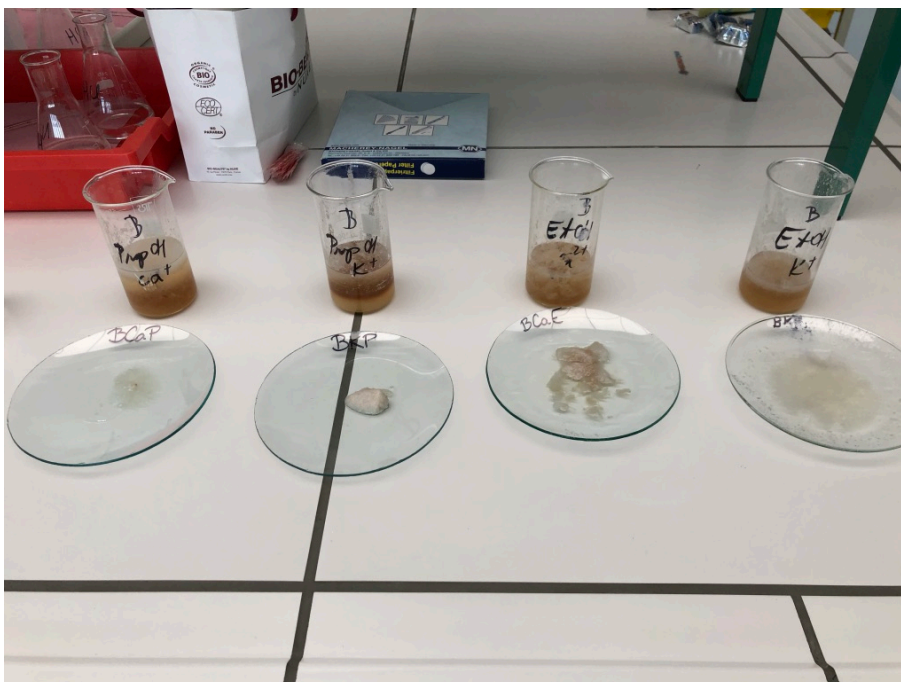


Slika 28: Rezultat JEK in JPCa (Magdalenc, 2019).

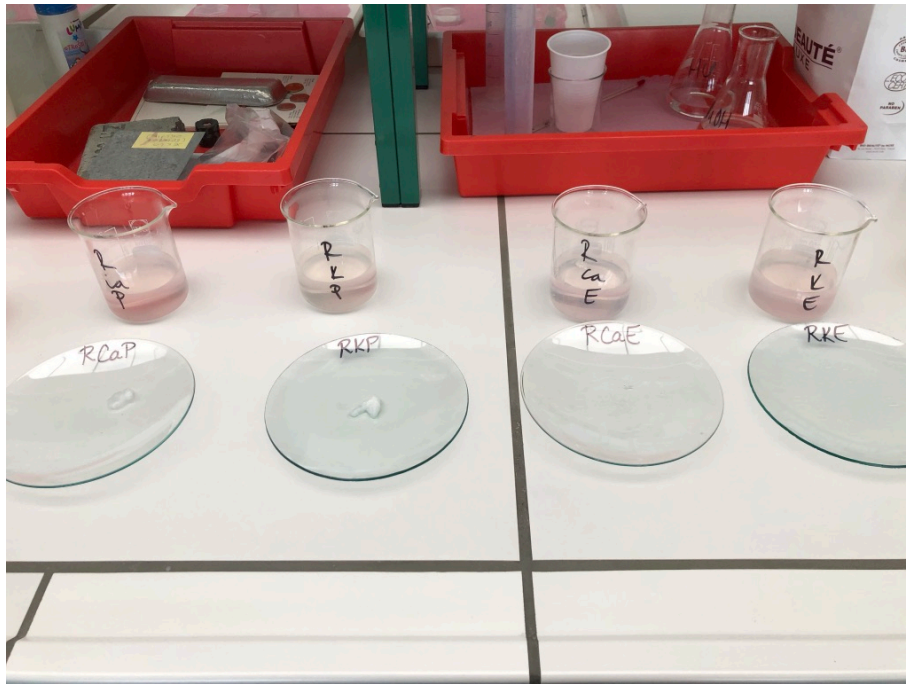


Slika 29: Rezultat AKE in ACaP (Magdalenc, 2019).

Čim več DNA smo poskušali prenesti na petrijevko z zobotrebcom, žličko in s kapalko. Na koncu smo pri vseh poskusih prenesli DNA še s kapalko. Alkohol na petrijevki, pa je čez noč izhlapel.



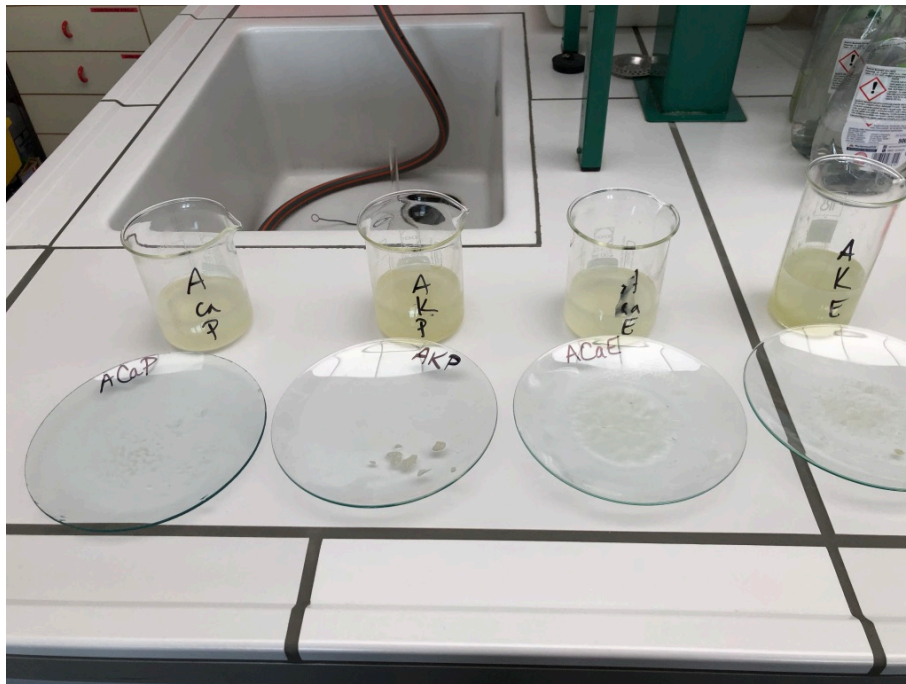
Slika 30: Rezultat pred sušenjem za banana (Magdalenc, 2019).



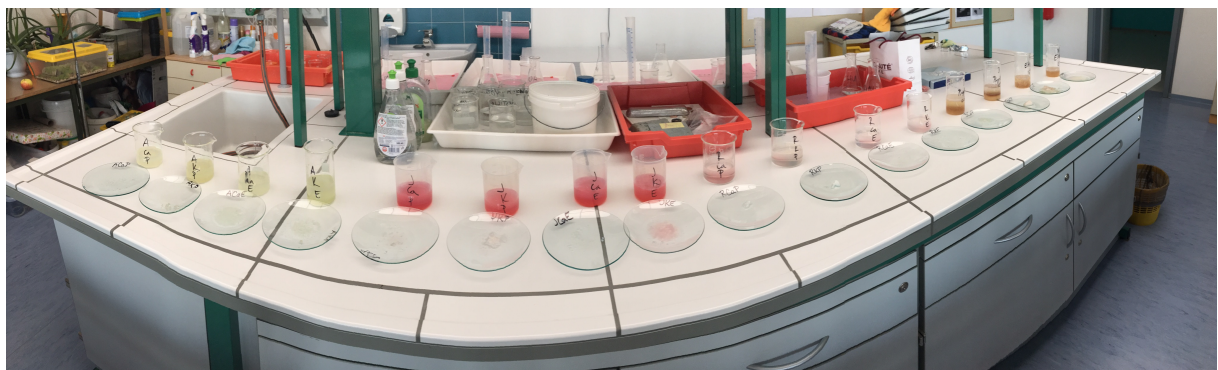
Slika 31: Rezultat pred sušenjem za rdečo čebulo (Magdalenc, 2019).



Slika 32: Rezultat pred sušenjem za jagodo (Magdalenc, 2019)



Slika 33: Rezultat pred sušenjem za avokado (Magdalenc, 2019).



Slika 34: Rezultati izolacije DNA pred sušenjem (Magdalenc, 2019).

### 3.2.3 Rezultati

V preglednici so povzeti rezultati poskusa. Navedena je ocenjena količina izolirane DNA, barva DNA po izolaciji in način prenosa DNA na urno steklo. Zaradi lažje predstavitve za dobljeno količino DNA smo oblikovali naslednjo legendo.

Zelo malo izolirane DNA	Malo izolirane DNA	Srednje veliko izolirane DNA	Veliko izolirane DNA
1	2	3	4

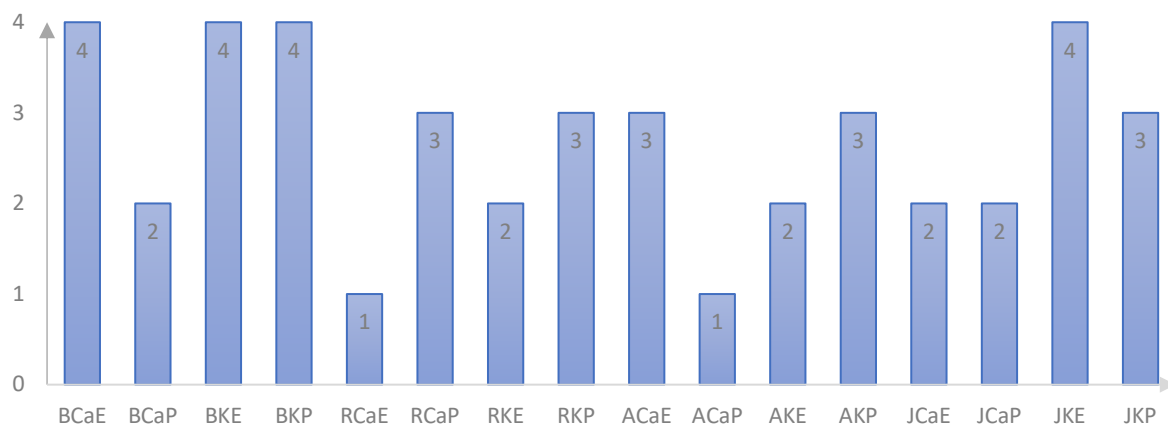
Kratice poskusa	Količina DNA	Barva	Prenos DNA na urno steklo
BCaE	veliko	prozorna	enostavno z žlico
BCaP	malo	prozorna	težko z žlico
BKE	veliko	prozorno-bela	samo s kapalko
BKP	veliko	bela	enostavno z zobotrebce
RCaE	zelo malo	prozorna	težko z žlico
RCaP	srednje veliko	belo-prozorna	enostavno z zobotrebce
RKE	malo	prozorna	samo s kapalko
RKP	srednje veliko	bela	enostavno z zobotrebce
ACaE	srednje veliko	prozorno-zelena	samo s kapalko
ACaP	zelo malo	prozorno-zelena	samo s kapalko
AKE	malo	prozorno-zelena	samo s kapalko
AKP	srednje veliko	belo-zelena	enostavno z zobotrebce
JCaE	malo	bela	enostavno z zobotrebce
JCaP	malo	prozorna	samo s kapalko
JKE	veliko	bela	enostavno z žlico
JKP	srednje veliko	bela	enostavno z zobotrebce

Preglednica 3: Rezultati poskusa izolacije DNA.

V nadaljevanju so rezultati zaradi preglednosti predstavljeni z grafi.

Legenda:

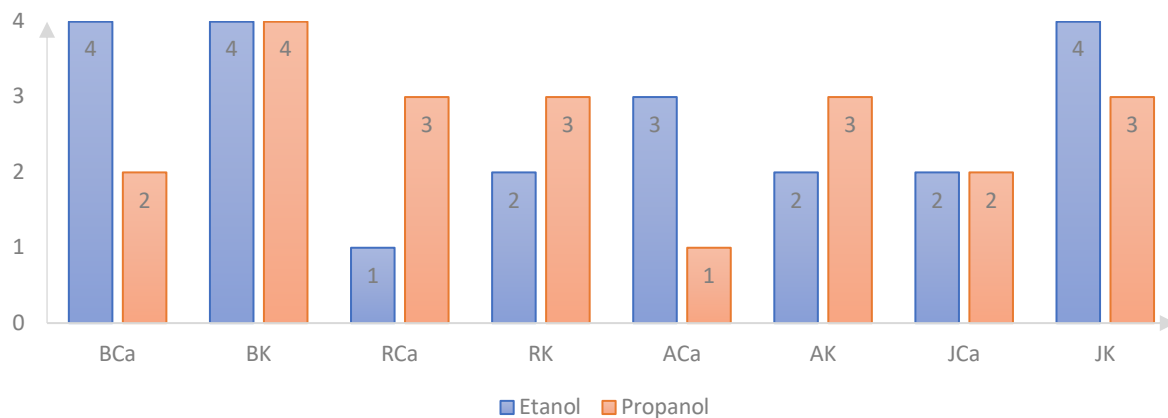
Zelo malo izolirane DNA	Malo izolirane DNA	Srednje veliko izolirane DNA	Veliko izolirane DNA
1	2	3	4



Graf 1: Rezultati izolacije DNA.

Legenda:

Zelo malo izolirane DNA	Malo izolirane DNA	Srednje veliko izolirane DNA	Veliko izolirane DNA
1	2	3	4

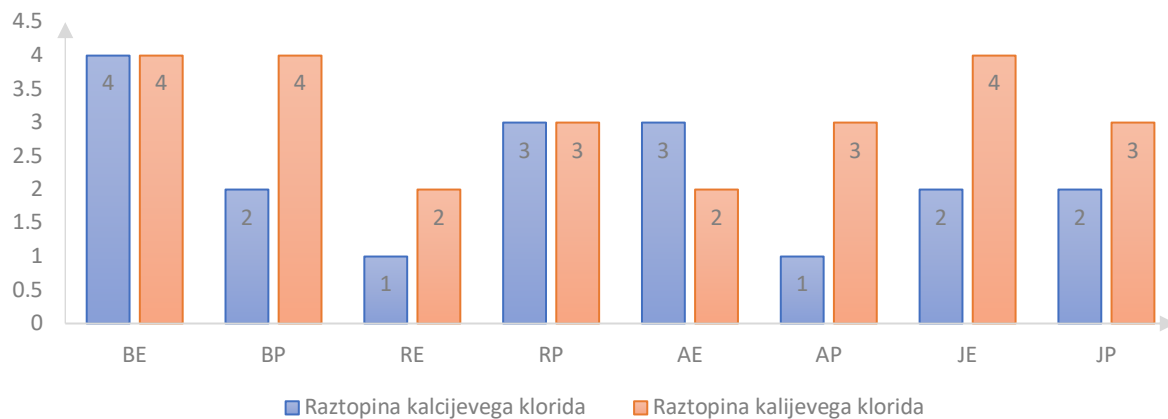


Graf 2: Rezultati primerjave uporabe etanola ali propanola.

Iz grafa je razvidno, da sta oba alkohola primerna za izolacijo DNA. V treh primerih je bil etanol bolj primeren (BCa, ACa, JK), v treh primerih je bil propanol bolj primeren (RCa, RK, AK) in v dveh primerih sta bila enako učinkovita (BK, JCa). Primernost izbire alkohola se nanaša na poskus, ki smo ga izvedli. Morda je za nadaljno obdelavo in uporabo DNA izbira vrste alkohola pomembna. To bi lahko raziskali in preverili v naslednji raziskavi.

Legenda:

Zelo malo izolirane DNA	Malo izolirane DNA	Srednje veliko izolirane DNA	Veliko izolirane DNA
1	2	3	4



Graf 3: Rezultati primerjave uporabe raztopine kalcijevega ali kalijevega klorida.

Iz grafa je razvidno, da smo samo v enem primeru (AE) z uporabo raztopine kalcijevega klorida dobili boljši rezultat. V dveh primerih sta bili obe raztopini enako učinkoviti (BE in RP). V ostali primerih je bila najbolj učinkovita raztopina kalijevega klorida (BP, RE, AP, JE, JP). Najboljša rezultata smo sicer dobili v primeru banane in jagode in uporabe raztopine kalijevega klorida ter propanola (BKP in JKP). DNA smo v obeh primerih najlažje pobrali. Izolirana DNA je bila najbolj bela od vseh vzorcev.



### 3.3 ELEKTROFOREZA

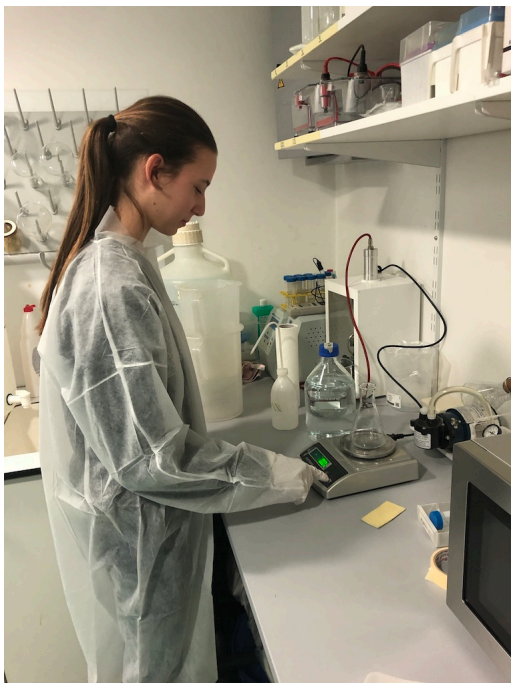
Na ogledu laboratorija v Ljubljani (ACIES BIO) smo se seznanili s predstavitvijo izvajanja postopka elektroforeze. Sledila je priprava gela s pomočjo asistentke.

Faze postopka:

- Tehtanje in priprava gela,
- Priprava aparatur,
- Elektroforeza,
- Aparati za odčitavanje,
- Odčitavanje rezultatov,
- Opazovanje rezultata pod UV svetlobo,
- Odčitavanje rezultatov na računalniku.

Spodaj je navedenih nekaj fotografij, ki prikazujejo faze postopka elektroforeze.

1. Tehtanje vodne raztopine.

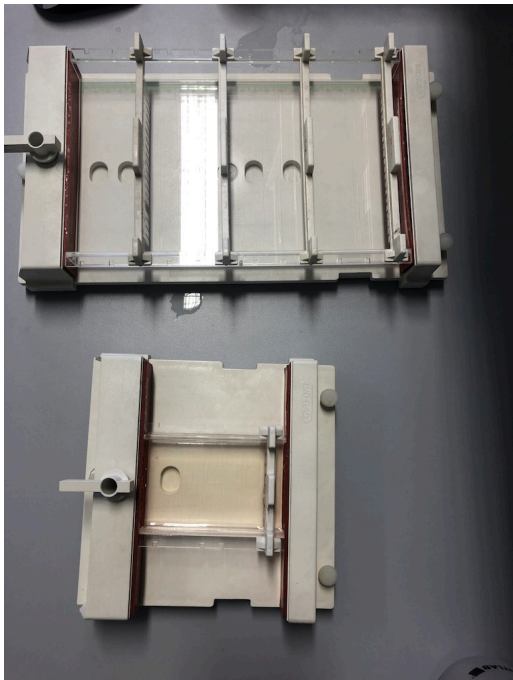


Slika 35: Tehtanje (Magdalenc, 2019).



Slika 36: Priprava gela (Magdalenc, 2019).

2. Priprava modela za oblikovanje gela.



Slika 37: Priprava aparatur (Magdalenc, 2019).

3. Aparature smo priklopili na električni tok. Kasneje smo v te modele vlili gel, ki se je čez nekaj časa strdil.



Slika 38: Elektroforeza (Magdalenc, 2019).

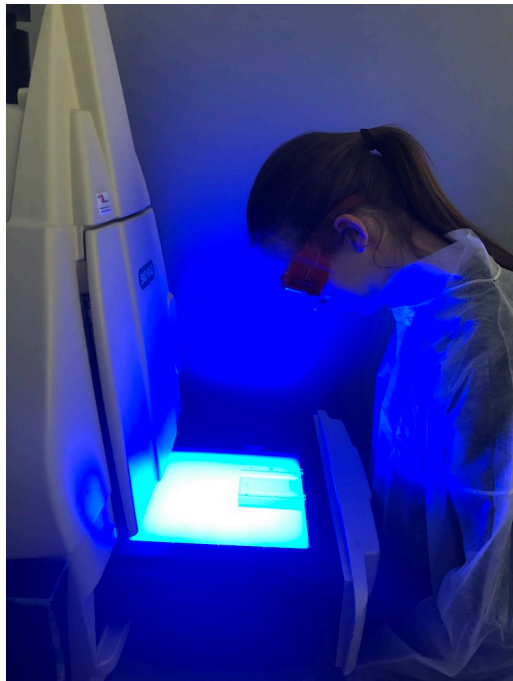


Slika 39: Aparati za elektroforezo (Magdalenc, 2019)

V laboratoriju smo opazovali DNA v gelu pod UV svetlobo.



Slika 40: Odčitavanje rezultatov (Magdalenc, 2019).

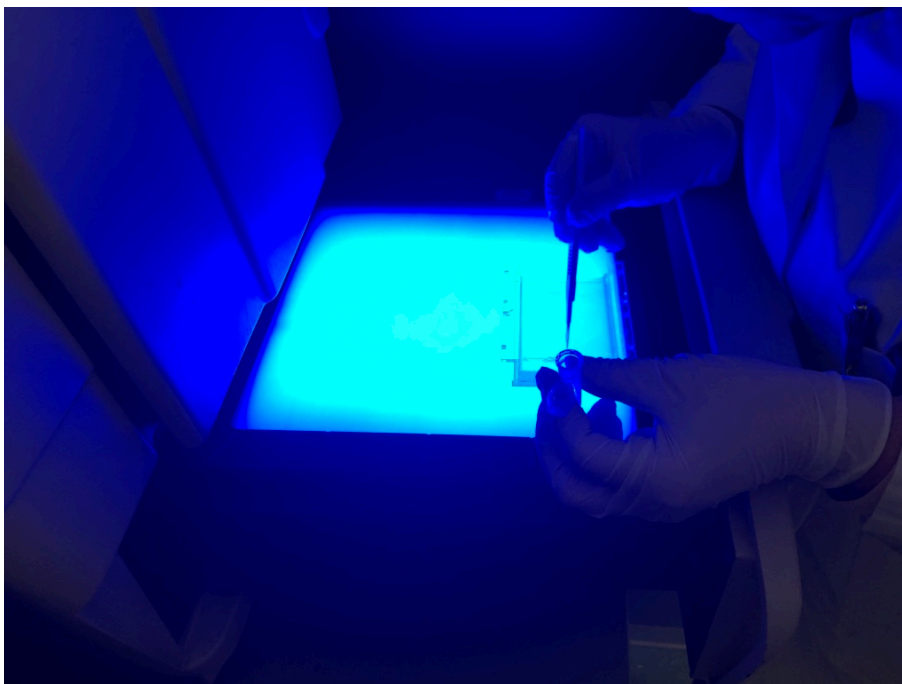


Slika 41: Opazovanje rezultata pod UV svetlobo (Magdalenc, 2019).

Za lažje razumevanje smo si ogledali rezultate tudi na računalniku.

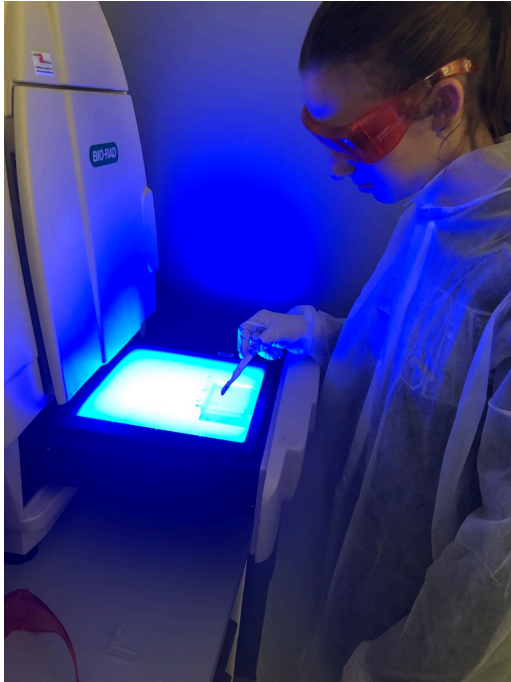


Slika 42: Odčitavanje rezultatov na računalniku (Magdalenc, 2019).



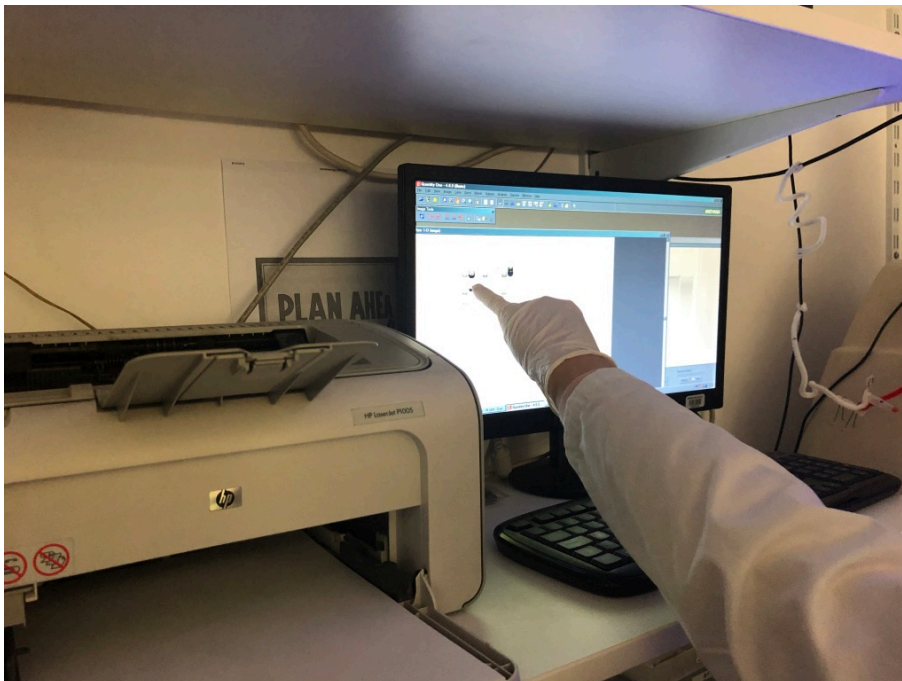
Slika 43: Prenos dela DNA v epico (Magdalenc, 2019)

Iz gela sem izrezala »odsek DNA«, ki bi ga lahko uporabili za nadaljno raziskovanje.



Slika 44: Rezanje dela DNA iz gela (Magdalenc, 2019)

Ponovno smo si ogledali rezultate na računalniku.

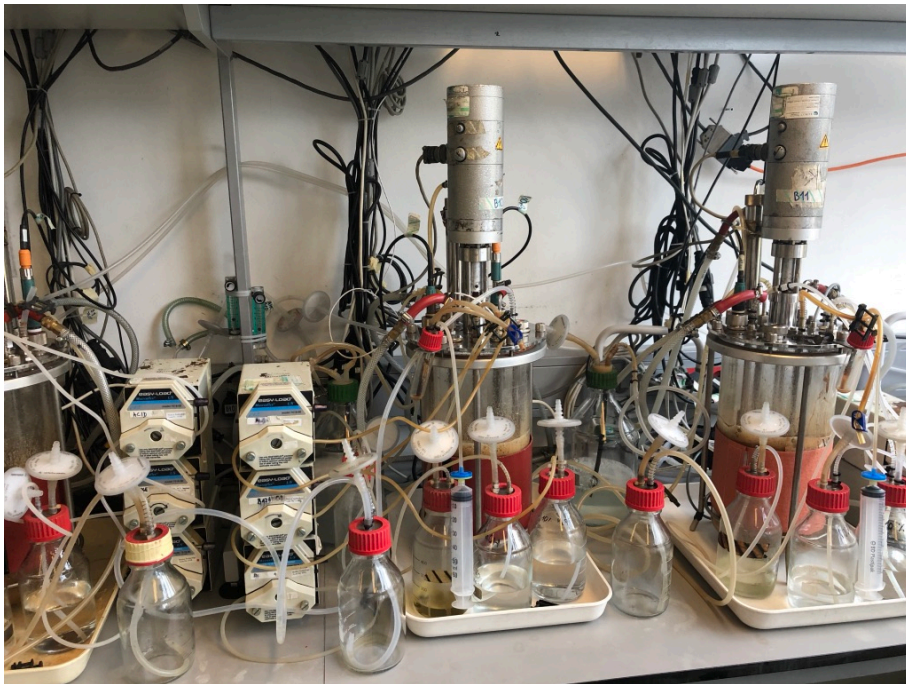


Slika 45: Odčitavanje rezultatov na računalniku (Magdalenc, 2019).

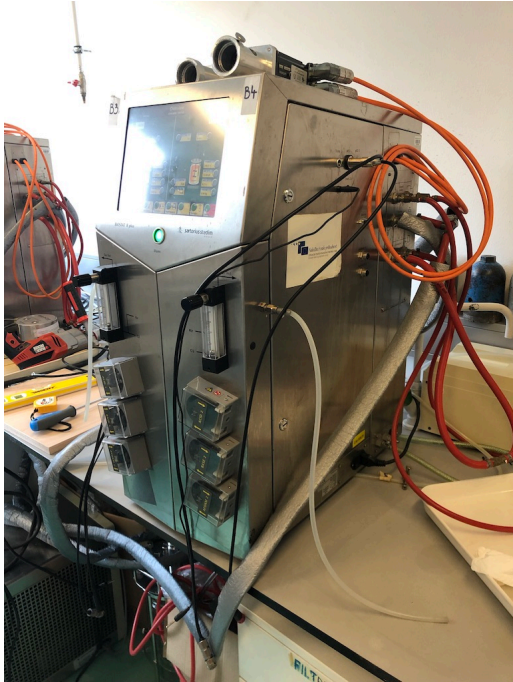
Sledil je ogled laboratorija. Ogledali smo si aparature za gojišča dobljenih GSO.



Slika 46: Sterilizirane erlenmajerice (Magdalenc, 2019)



Slika 47: Pripomočki v laboratoriju (Magdalenc, 2019)



Slika 48: Aparat za gojenje organizmov (Magdalenc, 2019)



Slika 49: Aparat za gojenje organizmov (Magdalenc, 2019)



## 4 SKLEP

Mleko in mlečni izdelki veliko večino ljudi napihuje, povzroča drisko, slabost in druge simptome. Do tega pride, ker v črevo preide zaradi pomanjkanja laktaze nerazgrajena laktoza, katero črevesne bakterije fermentirajo v različne pline.

Laktozna intoleranca je pogost problem v današnjem svetu. Ljudje se velikokrat diagnosticirajo, kar sami doma na podlagi informacij, ki krožijo po spletu. Ko ugotovijo, da jim mleko povzroča težave, ga odstranijo iz svoje vsakodnevne prehrane, s tem pa postanejo ogroženi predvsem zaradi pomanjkanja kalcija.

Osebe, ki ne prebavljajo laktoze, morajo po zdravniškem diagnosticiranju spremeniti prehranske navade. Vendar se posamezniki razlikujejo med seboj glede količine laktaze, ki jo še metabolizirajo v črevesju. Nekateri so manj občutljivi in jim kozarec mleka ne škodi, drugim pa škodi samo en požirek mleka. Kljub temu pa ni potrebno, da iz svoje prehrane oseba izključi mlečne izdelke. Na trgu se prodaja veliko izdelkov, ki ne vsebujejo laktoze. Za rešitev težav obstajajo tudi tablete z encimom laktazo, izolirano iz mikrobnih vrst. Tudi fermentirani mlečni izdelki imajo manj laktoze kot ostali mlečni izdelki, zato jih tudi laktozno intoleranti ljudje lahko uživajo brez večjih problemov. Pri lajšanju simptomov pa pomaga tudi, če mlečnih izdelkov ne zaužijejo samih, vendar v kombinaciji z drugimi živili, z razliko od pozitivno izražene mutacije na genu MCM6, ko določena skupina ljudi brez težav uživa neomejene količine mleka in mlečnih izdelkov.

Vseveč raziskav namanjamo tudi mehanizmom popravljanja oziroma spreminjanja genomov organizmov. Gensko spremenjene organizme uporabljamo v prehrani ali pa za pridobivanje zdravil, hormonov in drugo. Pozdraviti znamo nekatere dedne bolezni. Vseveč terapevtskih aplikacij se kaže tudi z uporabo CRISPR/Cas9 sistema.

Ugotovili smo, da so laktoza, laktaza in geni med seboj povezani, saj je zmanjševanje laktazne aktivnosti, genetsko povezano. Če je v krvi manj laktoze se tudi dejavnost laktaze zmanjša. Povezave smo potrdili tudi s pomočjo baz podatkov (<<https://www.yeastgenome.org>>, <<http://geneontology.org>>, <<https://benchling.com>>). Hipotezo lahko potrdimo.

Aktivnost laktaze se spreminja s starostjo, saj v otroštvu imamo največjo aktivnost laktaze, nato pa ta pada, saj pričnemo uživati tudi drugo hrano. Hipotezo lahko potrdimo, saj viri nakazujejo na to.

Aktivnost laktaze pri populacijah ljudi je različna. V različnih delih sveta, kjer so že pred 10000 leti udomačili živali in so začeli uživati živalsko mleko tudi odrasli ljudje, je manj laktozne intolerance. Najmanj laktozne intolerance imajo ljudje na severni polobli in Avstraliji. Največ laktozne intolerance pa najdemo na območjih Južne Amerike, Južnega dela Afrike, Kitajske, Indonezije in Japonske. Hipotezo lahko potrdimo, saj viri nakazujejo na to.

Ugotovili smo, da lahko iz banane izoliramo največ DNA. Hipotezo lahko potrdimo. Vzrok je verjetno v tem, da smo lahko banano najlažje pretlačili. Vzorec je bil tako dobro pretlačen in s tem je bilo uničeno največ celic.

Predvidevali smo, da bo raztopina kalcijevega klorida najbolj primerna za izolacijo DNA. Hipotezo lahko ovržemo, saj smo v petih primerih od osmih dobili boljše rezultate z uporabo kalijevega klorida. V primeru banane in jagode in uporabe raztopine kalijevega klorida ter propanola smo dobili vizualno boljše rezultate, kot pri uporabi kalcijevega klorida.

Predvidevali smo, da se bo DNA v etanolu najbolj izoborila. Hipotezo lahko ovržemo, saj smo v propanolu tudi dobili izoborino DNA. Sklepamo lahko, da sta oba alkohola primerna za izolacijo DNA. V treh primerih je bil etanol bolj primeren (BCa, ACa, JK), v treh primerih je bil propanol bolj primeren (RCa, RK, AK) in v dveh primerih sta bila enako učinkovita (BK, JCa). Najboljša rezultata smo sicer dobili v primeru banane in jagode in uporabe raztopine kalijevega klorida ter propanola (BKP in JKP). DNA smo v obeh primerih najlažje pobrali. Bila je najbolj bela od vseh vzorcev. Primernost izbire alkohola se nanaša na poskus, ki smo ga izvedli. Morda je za nadaljno obdelavo in uporabo DNA izbira vrste alkohola pomembna. To bi lahko raziskali in preverili v naslednji raziskavi.

Predvidevali smo, da bomo pri jagodi bodili najbolj belo DNA. Hipotezo lahko potrdimo, saj smo pri jagodi opazili najbolj belo oborino DNA. DNA je bele barve. Obarvana je takrat, ko veže nase barvila.

Podatki raziskovalne naloge so lahko uporabni na internetnih straneh, kjer ljudje iščejo podatke o laktozni intoleranci ter o povezavi laktoze, laktaze in genov. Učiteljem so rezultati poskusa lahko v pomoč pri izbiri biološkega materiala za izloacijo DNA.

## 5 LITERATURA

Erjavec M.S. et al.(2013). Dotik življenja 9: Učbenik za biologijo v 9. razredu osnovne šole, Ljubljana, Rokus Klett, str. 43-44

Ferjan Hvalc M. [online]. Laktozna intoleranca (2016) [citirano 19.2.2019]. Dostopno na svetovnem spletu: <<http://www.doktor24.si/component/k2/601-laktozna-intoleranca?highlight=WyJsYWtob3puYSIsImIudG9sZXJhbmNhliwibGFrdG96bmEgaW5ob2xlcuFuY2EiXQ==>>.

Graunar, M. et al. (2016). Kemija danes 2: Učbenik za kemijo v 9. razredu osnovne šole. Ljubljana, DZS, str. 92.

Greenwood M. [online]. Kaj so introni? (2018) [citirano 18.2.2019]. Dostopno na svetovnem spletu: <<https://www.news-medical.net/life-sciences/What-are-introns-and-exons.aspx>>.

G.Z. [online]. Ali psi lahko jejo sir? (2017) [citirano 19.2.2019]. Dostopno na svetovnem spletu: <<https://www.zurnal24.si/vizita-za-zivali/novice/ali-psi-lahko-jejo-sir-287595>>.

F.S. [online]. Samo mutanti pijejo MLEKO (2007) [citirano 19.2.2019]. Dostopno na svetovnem spletu: <<https://www.dnevnik.si/233850>>.

Kolarič, S. [online]. Primerjava različnih testov v diagnostiki laktozne intolerance in možnost njihove uporabe v klinični praksi (2016) [citirano 19.2.2019]. Dostopno na svetovnem spletu: <<http://www-f1.ijs.si/~rudi/sola/seminar-Parkelj.pdf>>.

LifeGenetics, Genelitik [online]. Laktozna intoleranca: Kaj je laktozna intoleranca , kako jo prepoznamo in kaj lahko storimo sami? (2012) [citirano 4. 2. 2019]. Dostopno na svetovnem spletu: <[http://lifegenetics.eu/files/2012/11/LifeGenetics\\_Laktozna-intoleranca.pdf](http://lifegenetics.eu/files/2012/11/LifeGenetics_Laktozna-intoleranca.pdf)>.

Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano [online]. Mleko in mlečni izdelki (2019) [citirano 9. 2. 2019]. Dostopno na svetovnem spletu: <[http://www.mkgp.gov.si/delovna\\_podrocja/kmetijstvo/kakovost\\_pridelkov\\_in\\_zivil/mleko\\_in\\_mlecni\\_izdelki/](http://www.mkgp.gov.si/delovna_podrocja/kmetijstvo/kakovost_pridelkov_in_zivil/mleko_in_mlecni_izdelki/)>.

R.G. [online]. Če lahko brez težav uživate to živilo, ste mutant (2018) [citirano 19.2.2019]. Dostopno na svetovnem spletu: <<https://moski.hudo.com/lifestyle/zanimivosti/preveri-ali-si-mutant/>>.

LAKTOZA, LAKTAZA IN GENI  
Raziskovalna naloga, 2019

Strgar, M. (2018). CRISPR/CAS sistem – genski inženiring...razlaga in podrobnosti. zdravstvena.info [online]. [Citirano 3. 3. 2019]. Dostopno na svetovnem spletu: <https://zdravstvena.info/crisprcas-sistem-genski-inzeniring-razlaga-podrobnosti.html>.

Sauvageau D. (2010). Two-stage, self-cycling process for the production of bacteriophages. Doctor disertation. Montreal, McGill Univerisity, Department of chemical engineering. Str. 175.

Swagerty Jr. (2002). Lactose intolerance: American family physician 65.9, str.1845-1850.

Dasha S. [online]. Poznate razliko med laktozno intoleranco in alergijo na mleko? (2017) [citirano 18.2.2019]. Dostopno na svetovnem spletu: <http://www.medvedkiigrace.si/blog/intoleranca-alergija-mleko/>.

Swallow D. M. Genetics of lactase persistence and lactose intolerance: Annual Review of Genetics (2003).37, str. 197–219.

The spruce eats [online]. The Facts on Lactose and Milk Sugar (2019) [citirano 18.2.2019].

Dostopno na svetovnem spletu: <https://www.thespruceeats.com/what-is-lactose-1000969>

Wikipedia, the free encyclopedia, Wikimedia Foundation [online]. Laktaza (2017) [citirano 9. 2. 2019]. Dostopno na svetovnem spletu: <https://sl.wikipedia.org/wiki/Laktaza>.

Wikipedia, the free encyclopedia, Wikimedia Foundation [online]. CRISPR (2018) [citirano 19.2.2019]. Dostopno na svetovnem spletu: <https://sl.wikipedia.org/wiki/CRISPR>.

Wikipedia, the free encyclopedia, Wikimedia Foundation [online]. MCM6 (2017) [citirano 19.2.2019]. Dostopno na svetovnem spletu: <https://en.wikipedia.org/wiki/MCM6>.

## 5.1 VIRI FOTOGRAFIJ

Biology Dictionary. Lactase definition [citirano 9.2.2019]. Dostopno na svetovnem spletu: <<https://biologydictionary.net/lactase/>>

Lekarnar. Lactanon [citirano 19.2.2019]. Dostopno na svetovnem spletu: <<https://www.lekarnar.com/spree/products/10570/original/lactanon.jpg?1381323155>>

Horvat P. (2015). Študij interakcije med bakterijama C. jejuni in E. coli ter njunima bakteriofagoma. Magistrsko delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije.

Kolarič, 2016. [citirano 19. 2. 2019]. Dostopno na svetovnem spletu: <<https://encrypted-tbno.gstatic.com/images?q=tbn:ANdGcQ7UdOlZcz9x-isLJhLQqzeLJF7J34mzUSfFCOul9M6p1lzzUzJ1A>>.

Lee S., et al. Journal of Cellular Biotechnology. [Citirano 3. 3. 2019]. Dostopno na svetovnem spletu: <<https://zdravstvena.info/crispcas-sistem-genski-inzeniring-razlaga-podrobnosti.html>>.

Moja alergija, Jelovšek, 2014. [citirano 9. 2. 2019]. Dostopno na svetovnem spletu: <<https://www.rheadb.org/compoundImage?dimensions=200&chebild=CHEBI:17716>>.

Upton J. [citirano 19. 2. 2019]. Dostopno na svetovnem spletu: <[https://static.sciencelearn.org.nz/images/images/000/002/524/embed/results\\_of\\_a\\_lactose\\_intolerance\\_genetic\\_test\\_large20161207-11187-1rnm28q.jpg?1522308943](https://static.sciencelearn.org.nz/images/images/000/002/524/embed/results_of_a_lactose_intolerance_genetic_test_large20161207-11187-1rnm28q.jpg?1522308943)>.

Wikipedia, the free encyclopedia, Wikimedia Foundation, Edgar181, 2011. [citirano 9. 2. 2019]. Dostopno na svetovnem spletu: <<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Lactase.png>>.

Wikipedia, the free encyclopedia, Wikimedia Foundation, 2019. [citirano 19. 2. 2019]. Dostopno na svetovnem spletu: <<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/c/cd/LactaseMechanism2.png/500px-LactaseMechanism2.png>>.