



A DNA microarray
Guillaume Paumier
Wikimedia Commons

Leta efter gener med microarray - ett modellförsök

Modellförsöket har utarbetats av Ulrika Wedding,
Rudbecksgymnasiet, Örebro.

DNA → RNA → protein

Gener innehåller den kodade informationen för produktion av proteiner i cellen. När DNA transkriberas förs informationen vidare till mRNA och vid translationen översätts informationen i mRNA till en aminosyrasekvens som bildas i ribosomerna. I detta sammanhang används begreppet genuttryck och med det menas processen från gen till biologiskt aktivt protein.

Alla celler i organismen innehåller samma genetiska information, men olika gener kommer till uttryck i olika celler, vid olika tidpunkt och under olika förhållanden. Cellstrukturer kan ändras och cellens funktion förändras när genen eller genuttrycket slås på, ökar, minskar eller stängs av. Det medför också att genuttrycket kan regleras beroende på omvärldsfaktorer som påverkar cellen. Genmutationer leder till förändringar av gener och genuttryck.

Microarray är en metod som används för att analysera genuttryck. Man kan med ett enda chip (genchip) analysera transkripten från tusentals gener, vid ett visst tillfälle, i särskilda celler och under särskilda förhållanden. Microarray används för en mängd olika frågeställningar inom biologi och medicin, till exempel: Hur ändras genuttrycket i en cell som utsätts för UV-ljus? Vad händer med aktiviteten i olika gener i en jästcell om temperaturen höjs från 25 °C till 37 °C? Vilka gener uttrycks i fiskembryon som inte uttrycks i vuxna fiskar? Vilka gener får ökad aktivitet i cancerceller jämfört med vanliga celler?

DNA-sekvenser från de gener man är intresserad av placeras på separata ställen på en platta. Det finns programvara som håller ordning på koordinaterna för var de olika DNA-sekvenserna placeras. Antalet olika sekvenser kan uppgå till 2 000-5 000.

Från de celler man vill undersöka extraheras allt förekommande mRNA, som sedan används som mall för att bilda cDNA-sekvenser med hjälp av enzymet omvänt transkriptas. Man använder antingen gröna eller röda fluorescerande baser vid tillverkning av cDNA. I en jämförande analys, som i vårt fall, låter man ena celltypen bilda grönt fluorescerande c-DNA och den andra rött fluorescerande c-DNA

Därefter blandas allt cDNA från de båda celltyperna och får hybridisera med de bundna DNA-sekvenserna på plattan. cDNA som inte hybridiserar sköljs bort. Därefter belyser man plattan med rött och grönt laserljus. Där DNA hybridiserat får man fluorescens. Beroende på vilken celltyp cDNA kommer ifrån generas grön eller röd fluorescens. Gul färg bildas om cDNA från båda celltyperna hybridiserar på samma plats. Om inget cDNA hybridiserar blir det färglöst.

Laborationen nedan visar exempel på en frågeställning där microarray kan vara en framgångsrik metod för att visa sambandet mellan genuttryck och en sjukdom. Genuttrycket från vissa gener från njurvävnad som inte fungerar normalt jämförs med genuttrycket från samma gener i normal vävnad. På detta sätt hoppas forskare förstå vilken betydelse dessa gener har för utveckling av njursvikt. Möjligheter att behandla och förebygga njursvikt kan därmed öppnas.

Laborationen är en simulering och bygger på en hypotetisk studie. I tabell 1 finns gener som forskare funnit är aktiva i andra njursjukdomar. Vårt forskningsteam har valt dessa gener för att se om de har betydelse också för vår typ av njursvikt. Vår laboration är ett modellförsök som efterliknar det som sker vid en microarray-test, men vi använder brunnar som fylls med vätskor. Du ska applicera tolv gener. Dessa gener har valts för att man tror att de har betydelse för uppkomsten av vår typ av njursvikt.

Microarray. Elevinstruktion

Tre patienter (A, B, C) har ombetts att ge vävnadsprov för att undersöka vilka gener som är aktiva i njurvävnaden.

I vårt försök kommer en positiv signal för basparning att visas med fluorescens och en negativ signal utan basparning innebär att det inte blir någon fluorescens.

Utrustning

- 3 rör med cDNA från vävnadsprover från olika personer A, B, C.
- Microarrayplatta
- Pipett 100µl
- Spetsar
- Avfallsburk
- UV-lampa

Uppgift

Din uppgift är att undersöka om någon av patienterna är en högriskpatient eller en lågriskpatient beroende på vilka gener som transkriberas i det aktuella vävnadsprovet. Läs nedan vilken funktion de olika generna har och diskutera vilka av generna ni uppfattar har betydelse för att utveckla njursvikt beroende på om de transkriberas eller inte.

Gener

1. Bryter signalvägar
2. Producerar enzym för DNA reparation
3. Höjer blodtrycket
4. Reglerar transport av vatten
5. Producerar enzymer för blockering av transport
6. Producerar protein som aktiverar D-vitamin

Person	Gen 1	Gen 2	Gen 3	Gen 4	Gen 5	Gen 6
A						
B						
C						

Tillsätt 100µl cDNA från vävnadsprov till alla brunnar för patienterna A, B och C.

Belys din platta med UV-ljus. I de brunnar där fluorescens uppträder är den aktuella genen påslagen. Diskutera dina resultat och dra slutsatser kring konsekvenserna av vilka gener som är påslagna i de olika vävnadsproven.

Microarray. Lärarinstruktion

Syftet med laborationen är att med en enkel laboration ge insikter i möjligheterna att analysera rna för att förstå vilka gener som transkriberas och därmed olika cellprocesser, såsom cellens utveckling och differentiering,

Utrustning

- 3 st 12 brunnars remsa eller 96 brunnars platta för 200 μ l
- UV-lampa (Använd en enkel UV-lampa med enbart UVA-strålning avsedd för exempelvis kontroll av sedlar)
- Tonic water
- CaCl_2 - lösning 0,015 mol/dm³
- Mikropipetter 100 μ l
- Mikroprovror 3 st per grupp
- Destvatten

Förberedelser:

Tonic water kan man köpa i livsmedelsaffärer. Det innehåller kinin som fluorescerar i UV-ljus. När kloridjoner finns i lösningen upphör fluorescensen. Detta används för att påvisa om genen är påslagen eller inte.

1. Fyll de tre mikroprovören med tonic water. Märk rören A, B och C.
2. Fyll brunnarna i 12 brunnars remsan med destvatten eller kalciumkloridlösning.
3. Välj vilka gener som ska vara påslagna. I de brunnarna tillsättes 100 μ l destvatten. I de övriga tillsättes 100 μ l kalciumklorid. En idé kan vara att patient A är högrisk medan B och C inte är det, men har olika gener påslagna.
4. Elevernas resonemang om vilka gener som har betydelse är viktigt att ta tid med.

Mer läsning om microarray och hur man använder det:

Science in school:

Fishing for genes: DNA microarrays for the classroom.

<http://www.scienceinschool.org/2009/issue12/microarray>

Rochester University:

<https://www.urmc.rochester.edu/life-sciences-learning-center.aspx>

<http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/genomics.html>