

PÅ JAKT ETTER SIGDCELLEANEMI

Hensikt

Hensikten med forsøket er å utvikle en grunnleggende forståelse av mutasjoner i DNA og hvordan slike mutasjoner kan lede til genetiske sykdommer, samt å se hvordan bioteknologiske metoder kan benyttes i medisin.

Bakgrunn

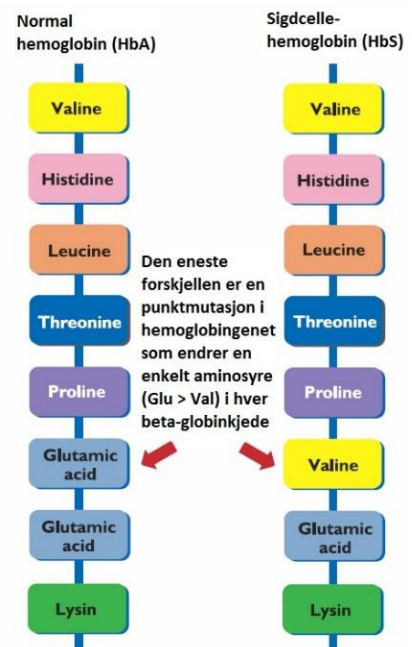
Flere genetiske sykdommer skyldes en mutasjon i en enkelt nukleotid (punktmutasjon) i et bestemt gen. Flere arvelige kreftformer skyldes mutasjoner i gener som regulerer celledvekst, og en type arvelig brystkreft forårsakes av en mutasjon i DNA-reparasjonsgenet *Brca2*.

Sigdcelleanemi er et annet eksempel på en arvelig, genetisk sykdom. Denne skyldes en punktmutasjon i et av genene som koder for hemoglobin, et protein som finnes i røde blodceller og frakter oksygen til cellene i kroppen. Hemoglobin består av fire subenheter, to α -globinkjeder og to β -globinkjeder. I den normale hemoglobinvarianten HbA koder følgende sekvens for aminosyre 5, 6 og 7 (Pro-Glu-Glu) i β -globinkjedene: CCT-GAG-GAG. I hemoglobinvarianten HbS som forårsaker sigdcelleanemi er det en substitusjonsmutasjon (A→T) slik at DNA-sekvensen (CCT-GTG-GAG) i stedet koder for Pro-Val-Glu (se figuren til høyre). Dette resulterer i at hemoglobin binder oksygen dårligere og gjør de røde blodcellene sigdformet slik at oksygentransporten i kroppen blir redusert. For å teste om en person har sigdcelleanemi brukes et restriksjons-enzym, *Mst II*, som kutter DNA i sekvensen CCTNAGG (N kan være hvilken som helst av de fire nukleotidene A, C, T og G). Dette enzymet kjenner altså igjen den normale β -globinsekvensen CCT-GAG-G (N er her G), men ikke den muterte formen hos sigdcelleanemipasienter (CCT-GTG-G).

I dette forsøket brukes elektroforese til å analysere DNA-prøver fra et barn som har symptomer som kan tyde på sigdcelleanemi, samt prøver fra barnets foreldre og kontroller, for å bekrefte/avkrefte diagnosen. Prøvene er allerede behandlet med restriksjonsenzymet *Mst II*.

Aktuelle læringsmål

Biologi 2, genetikk. Forklar genetiske sykdommer ved å bruke kunnskaper om arv og mutasjoner, og gjør greie for hvordan samspillet mellom arv, miljø og livsstil kan påvirke helsen hos mennesket.



Naturfag VG1, bioteknologi. Gi en oversikt over ulike former for medisinsk bruk av bioteknologi og diskuter muligheter og utfordringer ved slik bruk.

LÆRERNOTATER

Utstyr

Forsøkssettet inneholder materialer til 6 elevgrupper.

Oppbevaring: Alle komponenter er stabile ved romtemperatur. Dersom forsøket ikke skal utføres innen en måned etter mottakelse bør imidlertid DNA-prøvene oppbevares i kjøleskap.

Medfølgende innhold

Ferdig alikvoterte DNA-prøver klare til elektroforese, agarose, konsentrert elektroforesebuffer (50 x TAE), konsentrert (25 x) FlashBlue DNA-farge, engangspipetter (plast).

Nødvendig tilleggsutstyr (foreslåtte varenumre i parentes)

Elektroforeseapparat (5441.50/5441.60/5441.65), spenningskilde (5441.22/5441.24), vekt (1028.90), erlenmeyerkolbe 250 ml (0079.10), målesylindre (0118.20, 0118.21, 0118.24)/pipettefyller og pipetter (0153.30, 0140.84), mikrobølgeovn/gassbrenner (0051.11)/kokeplate (0668.10), destillert vann (8903.00-6), plastkar/veieskip (570050/0973.20).

Anbefalt tilleggsutstyr (foreslåtte varenumre i parentes)

Hansker (0860.46-49), mikropipetter (0144.06/0134.06) og pipettespisser (0134.06), mikrosentrifuge (0677.00), vippebrett (5442.50), visualiseringsutstyr (5444.20).

Forberedelser

Agarosegelene kan støpes på forhånd for å korte ned forsøks tiden. Ferdigstøpte geler kan forsegles med plastfolie og oppbevares i kjøleskap i inntil 1-2 uker. Elektroforese-bufferen (TAE) og FlashBlue-fargeløsningen kan evt. fortynnes på forhånd.

Forsøks tid

ca. 90 minutter.

Resultatanalyse – fasit

1. Barnet har sigdcelleanemi. Se under for detaljert brønn-for-brønn-forklaring av gelbildet, Bilde og skjematisk fremstilling av forventet resultat i Figur 2 finnes på neste side.

Brønn 1: Kontroll-prøve med DNA fra pasient med sigdcelleanemi. I en person med sigdcelleanemi vil begge kopiene av genet ha mutasjonen, og restriksjonsenzymet vil ikke kutte noen av genkopiene fordi restriksjonssetet er endret. Dermed er det kun ett bånd på gelen.

Brønn 2: Kontroll-prøve med DNA fra frisk bærer av sigdcellegenet. Hos bærere er det ene allelet normalt og inneholder restriksjonssetet som kjennes igjen av restriksjonsenzymet *Mst II*. Dette allelet vil kuttes i to mindre biter ved behandling med *Mst II*. Det andre allelet har mutasjonen i gjenkjennelsessekvensen til enzymet, som dermed ikke kutter den muterte genkopien. Elektroforese

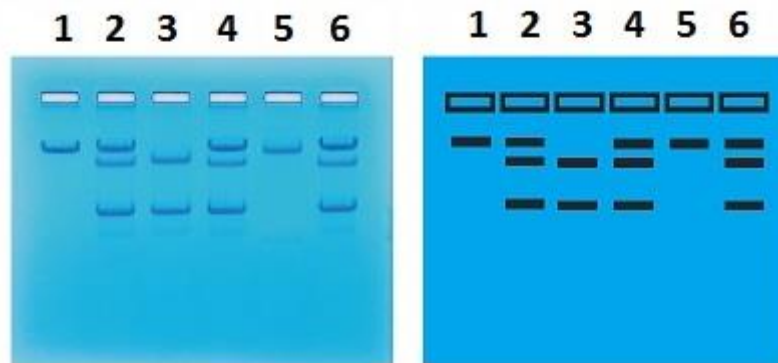
gir derfor tre bånd på gelen. Det lengste av disse tilsvarer det ukuttede, muterte allelet, mens de to kortere båndene til sammen svarer til den normale genvarianten kuttet i to av enzymet *Mst II*.

Brønn 3: Kontroll-prøve med DNA fra frisk, homozygot person. Begge allelene har *Mst II*-restriksjonssetet intakt og vil derfor kuttes i to mindre biter slik at man ser to bånd på gelen.

Brønn 4: DNA-prøve fra barnets mor. Tre bånd som alle tilsvarer størrelsen på båndene i kontrollen fra en person som er heterozygot for sigdcellegenet (brønn 2). Altså er moren bærer av sigdcelleanemi og en normal og en mutert genkopi.

Brønn 5: DNA-prøve fra barnet. Her ses kun ett bånd som tilsvarer båndet i kontrollen fra en person med sigdcelleanemi (brønn 1). Altså har ikke *Mst II*-enzymet kuttet noen av de to β -globinallelene. Det vil si at begge allelene har mutasjonen og barnet har sigdcelleanemi.

Brønn 6: DNA-prøve fra faren. Tre bånd som tilsvarer ett normalt og ett mutert β -globinallel. Faren er derfor, i likhet med moren, heterozygot og bærer av sigdcelleanemi.



Figur 2. Bilde (venstre) og skjematisk fremstilling (høyre) av forventet resultat. Brønn 1: Kontroll-prøve med DNA fra pasient med sigdcelleanemi, brønn 2: kontroll-prøve med DNA fra frisk bærer av sigdcellegenet, brønn 3: kontroll-prøve fra frisk person, homozygot for den normale genvarianten, brønn 4: DNA fra barnets mor, brønn 5: DNA fra barnet, brønn 6: DNA fra barnets far.

- Sigdcelleanemi skyldes en punktmutasjon i genet som koder for proteinet hemoglobin som transporterer oksygen i blodet. Mutasjonen er en substitusjon der en enkelt adenin (A) er byttet med en tymin (T). Dette fører igjen til at den sjette aminosyren (glutamat, Glu) i β -globinkjeden i den normale hemoglobinvarianten HbA er erstattet av valin (Val) i sigdcelle-varianten HbS. Siden glutamat er negativt ladet, mens valin er nøytral, vil strukturen endres slik at hemoglobin binder oksygen dårligere. Videre vil HbS-varianten polymerisere og felle ut, slik at de røde blodcellene blir sigdformet og tetter kapillærene. Oksygentransporten til cellene blir derfor redusert, noe som fører til utmattelse og organskader hos pasientene.

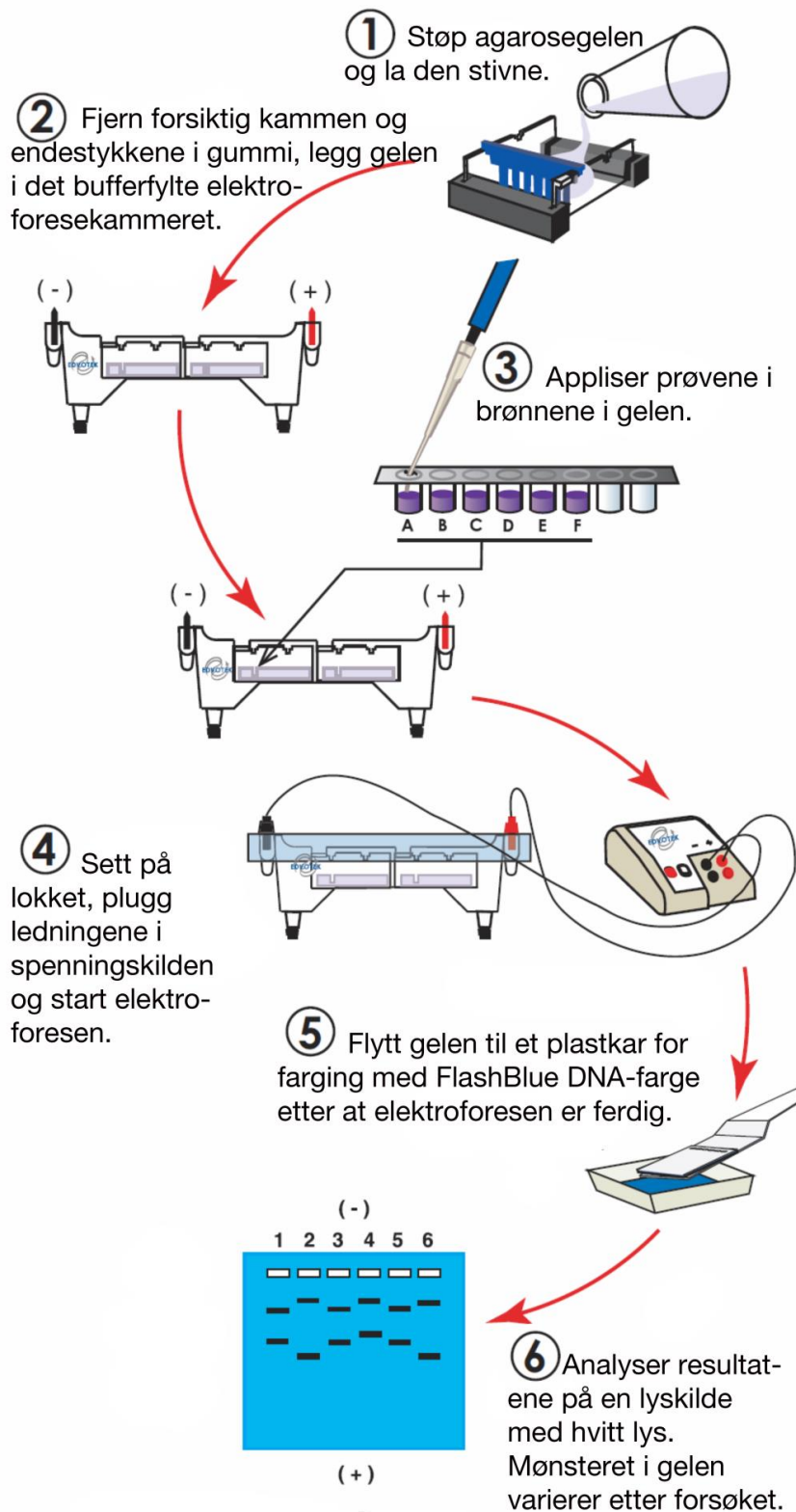
Sigdcelleanemi er en recessiv sykdom, dvs at man må ha to muterte alleler for å være syk. I områder med høy forekomst av malaria er det imidlertid fordelaktig å være bærer av HbS (heterozygot for HbS-allelet) fordi disse er mer resistente mot malariaparasitten som ikke klarer å formere seg optimalt i de sigdformede røde blodcellene. Derfor forekommer sigdcelleanemi hyppigere i enkelte deler av Afrika hvor det er mye malaria.

- Hemoglobin består av fire polypeptidkjeder, to like α -globinkjeder og to like β -globinkjeder.
- Sigdcelleanemi forårsakes av en punktmutasjon (**A \rightarrow T substitusjon**) i β -globinkjeden av hemoglobin.

5. Testen baserer seg på bruken av et restriksjonsenzym som gjenkjenner en spesifikk sekvens i DNA og kutter DNA-tråden i denne sekvensen. **I genet for β -globinkjeden** av den normale hemoglobinvarianten HbA er koder basesekvensen CCT-GAG-GAG for aminosyre 5, 6 og 7 (Prolin-Glutamat-Glutamat). Restriksjonsenzymet *Mst II* kutter målsekvensen CCTNAGG (N **kan være A, T, C eller G**) og dermed β -globingenet (N er G). Mutasjonen som leder til sigdcelleanemi endrer denne sekvensen til CCT-GIG-GAG som ikke gjenkjennes av *Mst II*. DNA får man fra en blodprøve fra pasienten eller fra en fostervannsprøve. DNA fra noen få celler er nok siden PCR kan benyttes til å lage tilstrekkelig mange DNA-kopier for analyse. DNAet behandles med restriksjonsenzymet og resultatet analyseres ved elektroforese.

ELEVVEILEDNING

Flytskjema – oversikt over forsøket



Utførelse

Laboratoriesikkerhet

Bruk hansker og vask hendene godt med såpe og vann etter å ha jobbet i laboratoriet.

Støping av 0.8 % agarosegeler

1. Sett et gelkar i støpekammeret eller forsegl karet med endestykker/tape og sett i en kam med 6 tenner (se punkt 1 i flytskjemaet). Vei inn 0.39 g agarose og overfør til en 250 ml erlendmeyerkolbe. Tilsett 1.0 ml 50x konsentrert TAE-buffer og 49.0 ml destillert (deionisert/demineralisert) vann (eller 50 ml 1x TAE-buffer). Dette er nok til 1 stk 0.8 % agarosegel.
2. Kok opp i mikrobølgeovn (høy effekt i ca 1 min). Kok opp gjentatte ganger (høy effekt i ca 25 s) til agarosen er fullstendig oppløst og løsningen er klar som vann. Roter kolben innimellom for å få en jevn agaroseløsning. Følg nøye med for å unngå at det koker over. Sjekk at det ikke er uløst agarose eller klumper i løsningen.
3. Avkjøl agaroseløsningen under rennende vann mens du roterer kolben til temperaturen er ca 60 °C (når du kan holde kolben i hånden uten å brenne deg). Sett gelkaret på et horisontalt underlag og hell i agaroseløsningen. La stå til gelen har stivnet (20-30 min).

Applisering av prøvene på gelen

1. Fjern endestykkene/tapen på gelkaret og legg gelen i elektroforesekaret slik at brønnene er nærmest den negative (svarte) elektroden (se punkt 2 i flytskjemaet). Hell 1x TAE-buffer i karet til buffernivået er omtrent 5 mm over gelen. Ta kammen forsiktig ut av gelen. Se til at det er buffer i alle brønnene.
2. Sentrifuger prøvene kort eller dunk dem lett mot bordplaten for å samle hele volumet nederst i røret. Appliser 35 µl av prøvene A-F i brønnene 1-6 på gelen i rekkefølge, fra venstre mot høyre (se punkt 3 i flytskjemaet og tabell 1 under). Pass på at du ikke stikker pipettespissen for langt ned slik at det blir hull i brønnen. Tips: dersom brønnene er vanskelige å se kan det hjelpe å legge et svart/mørkt papirark e. l. under elektroforesekaret.

Tabell 1. Skjema for applisering av DNA-prøvene på gelen.

Brønn	Rør	Beskrivelse
1	A	Kontroll: DNA-prøve fra pasient med sigdcelleanemi
2	B	Kontroll: DNA-prøve fra bærer av sigdcellegenet
3	C	Kontroll: Normal DNA-prøve
4	D	DNA-prøve fra mor
5	E	DNA-prøve fra barnet
6	F	DNA-prøve fra far

Elektroforese

1. Sett lokket på elektroforesekaret og koble til spenningskilden. Kjør gelen på 70-125 V i 30-60 min (se punkt 4 i flytskjemaet). Tiden det tar å separere DNA-molekylene avhenger av spenningen og størrelsen på elektroforeseapparatet. Se tabell 2 under for anbefalte innstillinger av elektroforeseapparatene fra Edvotek. Ikke sett spenningen høyere enn anbefalt da for høy spenning kan resultere i at gelen smelter. Når elektroforesen er i gang dannes små, synlige bobler på elektrodene, og de negativt ladete DNA-molekylene vandrer mot den positive elektroden.
2. Når elektroforesen er ferdig, skrus strømmen av før lokket fjernes.

Tabell 2. Anbefalte innstillinger for Edvoteks elektroforeseapparater. Tids- og spenningsangivelsene kan også brukes som retningslinjer for elektroforeseapparater av de fleste andre merker. Gjengitt med tillatelse fra Edvotek.

Tid og spenning		
Volt	M6Plus	M12 og M36
	Minimum/maksimum	Minimum/maksimum
150	15/20 min	25/35 min
125	20/30 min	35/45 min
70	35/45 min	60/90 min
50	50/80 min	95/130 min

Farging av gelen og visualisering av DNA

1. Fortynn 10 ml av 10x FlashBlue fargeløsning med 90 ml destillert vann og bland godt. Hell 75 ml av fargeløsningen (1x) over i et stort veieskip (eller annet egnet plastkar).
2. Overfør gelen forsiktig til fargekaret (se punkt 5 i flytskjemaet). Tilsett mer fargeløsning dersom gelen ikke er fullstendig dekket. La gelen ligge i fargeløsningen i 5 min.
3. Hell av fargeløsningen og tilsett 250-300 ml destillert vann. Sett avfargingskaret på et vippebrett eller vipp på karet med noen minutters mellomrom. La gelen ligge til avfarging i 20 min. Skift vannet hyppig for raskere avfarging. De mørkeblå DNA-båndene vil etter hvert bli synlige mot den lyseblå bakgrunnen.
4. Fjern gelen forsiktig fra avfargingsløsningen og legg den i en gjennomsiktig plastpose (f. eks. en ziplock-pose eller brødpose). Legg gelen på en lyskilde med hvitt lys for tydelig visualisering av DNA-båndene (punkt 6 i flytskjemaet). Resultatet kan dokumenteres ved å ta bilde av gelen med et digitalkamera. Gelen kan oppbevares i kjøleskap i flere uker hvis den ligger i en forseglet plastpose med litt elektroforesebuffer.

Avfallshåndtering

Fargete geler og plastavfall kan kastes i restavfallet. Elektroforesebuffer (1x TAE-buffer), FlashBlue fargeløsning og avfargingsløsning kan helles ut i vasken. Skyll godt med vann etterpå.

Resultatanalyse

1. Se på agarosegelen og forklar de ulike båndene. Har barnet sigdcelleanemi?
2. Beskriv mekanismen for sykdommen sigdcelleanemi og hvordan den berører pasientene.
3. Hvor mange polypeptider (proteinkjeder) består hemoglobin av?
4. Hvilken punktmutasjon forårsaker sigdcelleanemi? Hvor er denne mutasjonen lokalisert?
5. Beskriv metoden for å detektere sigdcellegenet i pasienter.