

Hvordan laver man en genekspressionsanalyse?

Af: *Kresten Cæsar Torp, Aalborghus Gymnasium*

Indhold

Hvordan laver man en genekspressionsanalyse?.....	1
Hvordan virker en DNA-microarray?.....	1
Opgave.....	3
Forsøgsprocedure.....	2
Opgave.....	Fejl! Bogmærke er ikke defineret.
Tolkning af resultaterne.....	3
Opgave.....	4

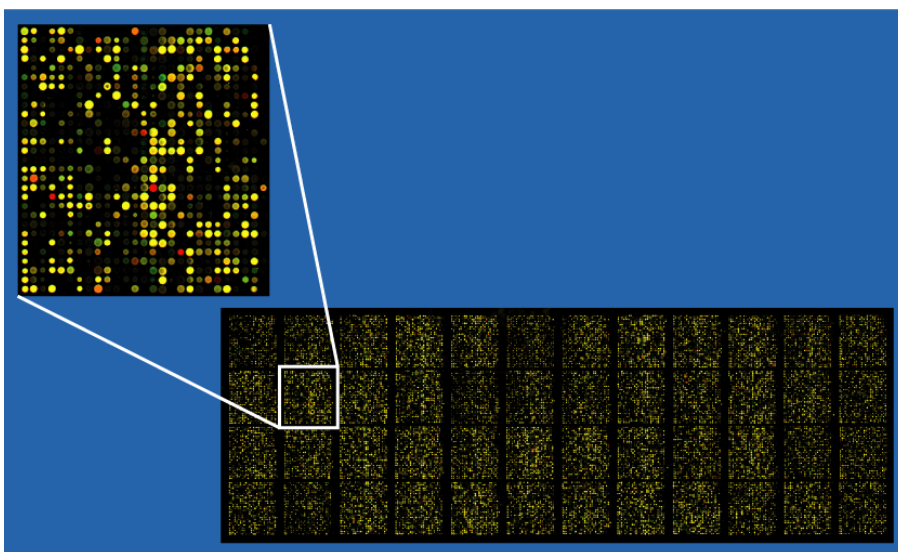
Genekspressions-analyse (Gene Expression Analysis) er en metode til at sammenligne hvilke gener der udtrykkes under forskellige forhold. Et gens ekspression vil sige, hvor meget det udtrykkes. Dvs. hvor meget RNA eller protein der dannes fra genet. Det gør man ved hjælp af en såkaldt microarray-analyse. Herefter undersøger man statistisk, hvilke gener der udtrykkes anderledes under de givne forhold.

Ved at undersøge nærmere hvilke funktioner de gener der udtrykkes anderledes har i kroppen, kan man fx blive klogere på *årsagssammenhænge* der er mellem bestemte gener og en lidelse eller virkningen af et medicinsk præparat.

- Lav evt. opgaven: "Hvad er genekspression?"

Hvordan virker en DNA-microarray?

Man undersøger hvor kraftigt gener udtrykkes ved hjælp af en såkaldt DNA-microarray, se figur 1.



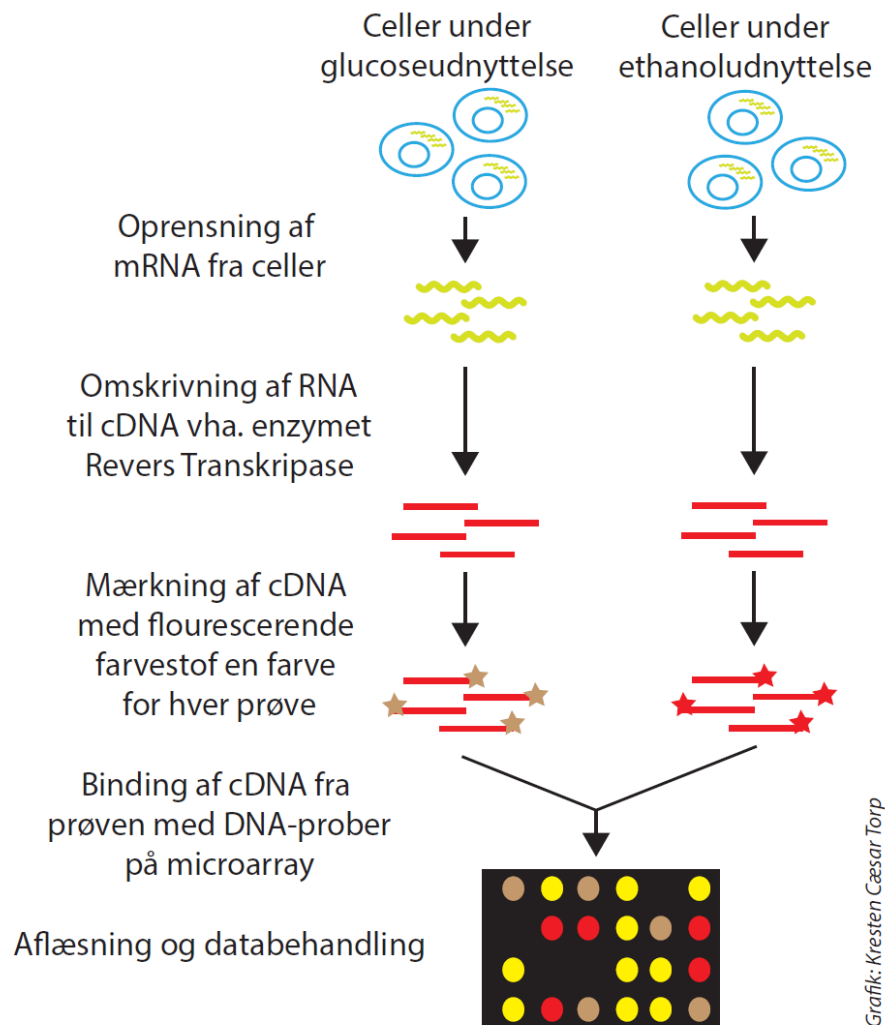
Figur 2. Microarray. I hvert felt viser farveudslaget, om der bindes DNA til feltets probe.

Kilde: By Paphrag at English Wikipedia - Transferred from en.wikipedia to Commons., Public Domain,
<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1612185>

Den består af en plade, hvorpå der er flere tusinde små felter. I hvert felt er der DNA-prober. Dvs. små stykker enkeltstrenget DNA med sekvenser, som er specifikke for de gener, man vi undersøge aktiviteten af. De specifikke sekvenser kaldes også markører for genet.

Man kan på den måde undersøge aktiviteten af flere tusinde gener ad gangen, principielt for alle kendte gener i en organisme.

Forsøgsprocedure



Figur 4. Laboratorieprocedure for genekspressionsforsøg.

En DNA-microarray reagerer på enkeltstrenget DNA. Ved genekspressionsforsøg ønsker man imidlertid at undersøge for forekomsten af mRNA. Derfor skal man først forberede prøverne ved proceduren vist i figur 4. Først oprenser man mRNA fra cellerne. Derefter omskriver man dem til DNA vha. enzymet Revers Transkriptase.

En DNA-kopi af en mRNA kaldes en copy-DNA eller cDNA. Man får herved et cDNA-bibliotek, som viser, hvilke mRNA der var i cellen.

Når DNA-prøverne tilsættes chippen, bindes de ved baseparringsprincippet til proberne i de felter, de matcher.

Ved at mærke DNA fra de to prøver med hver sin fluorescerende farve, kan man sammenligne hvilke gener der udtrykkes i hvilken af prøverne. Felter for gener der overudtrykkes hos prøven mærket med grønt bliver grønne, gener der udtrykkes i prøven mærket med rødt bliver røde, gener der udtrykkes i begge prøver vil optræde som gule felter og gener der ikke udtrykkes i nogen af prøverne forbliver ufarvede.

Opgave

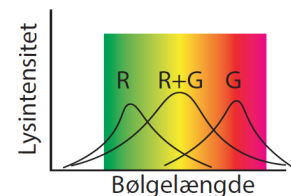
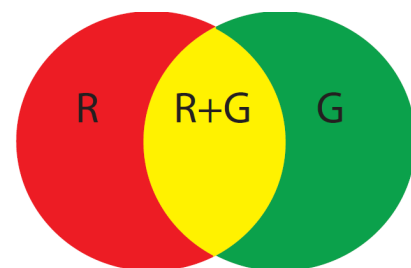
- Forklar proceduren vist i figur 4.
- Forklar hvad baseparringsprincippet vil sige.
- Bestem for den øverste række i microarray-en i figur 2, hvilke af generne der udtrykkes mest hos celler fra prøve 1 (rødt), fra prøve 2 (grønt), dem begge (gul) eller ingen af dem (uden farve).
- Lav opgaven: "Microarray-chip-opgave", hvor du afprøver, hvordan en chip fungerer.
- Måske har du selv prøvet at oprense DNA i undervisningen. Giv forslag til hvilke behandlinger og kemikalier der kan indgå i at oprense RNA fra celler. Tænk på cellens opbygning.
- Enzymet Revers Transkriptase stammer fra en gruppe RNA-virus kaldet retrovirus. HIV tilhører fx denne gruppe af virus. Genomet hos retrovirus består af RNA. Når de inficerer en celle skal de have deres genom integreret i cellens DNA. Giv forslag til hvorfor det er nødvendigt for virus selv at medbringe enzymet Revers Transkriptase til dette.

Boks 1: Hvorfor bliver rød + grøn = gul på microchippet?

Det kan måske virke underligt, at et felt på microchippet lyser gult, hvor der er både grønt og rødt farvestof tilstede. Forklaringen er, at der er tale om fluorescerende farvestoffer, der begge udsender lys af en bestemt bølgelængde, og dermed af en bestemt farve.

Det betyder også at de er additive, dvs. at farverne "lægges sammen". Lyser man med et grøn og en rød lampe på en hvid væg, vil overlappet mellem dem fremstå gult, som vist på figuren øverst.

Hvis man tænker på farverne som bølgelængder af lys, som vist i diagrammet nederst på figuren, giver det god mening. De to kurver på figuren viser det lys de to farvestoffer udsender hver for sig. Optræder de sammen, må de to kurver lægges sammen, og man får kurven i midten. Her bliver lysintensiteten i de gule bølgelængder højst.

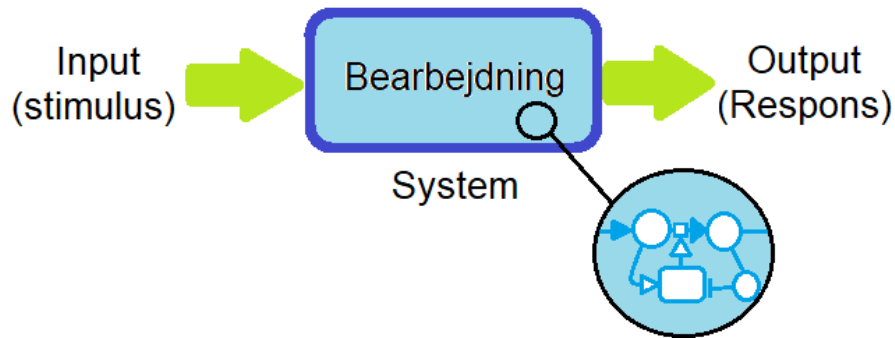


Gråfik: Kresten Casar Torp

Tolkning af resultaterne

Biologiske systemer er karakteriserede ved at de handler formålsorienteret. Enkeltprocesser i en celle må derfor forstås ud fra den sammenhæng den indgår i i cellen, fx hvilken funktion den har i forhold til det samlede system.

I systembiologi analyserer man derfor det biologiske system top-down. Dvs. at man først ser på hele systemet, og derefter går i detaljer med dets undersystemer, delprocesser og delelementer, for at forklare hvordan systemet gør som det gør. Figur 1 viser dette princip.



Figur 1. Top-down undersøgelse af et system. Det samlede system kan undersøges og beskrives som en black box. Systemet reagerer på en ændring i omgivelserne (input) med et bestemt output. Derefter kan man undersøge nærmere, hvilke indbyggede delprocesser og styremekanismer der fører til at systemet reagerer som det gør. Grafik: Kresten Cæsar Torp.

Input er den behandling man giver cellekulturen. Det kan være sansemæssige stimulus, eller som her et bestemt næringsstof. Outputtet er den man kan måle, at cellekulturen gør. Det kan være dets bevægelse, dets affaldsprodukter eller som her dets genekspression.

Microarrayanalyse skaber overblik over det skift der sker inde i cellen, i cellens genekspression, når den fx skifter vækstfase. Derefter må man gå i detaljen med de gener der udtrykkes anderledes for at forklare, hvad der sker i cellen.

Opgave

- Giv forslag til hvilke undersøgelser man kunne fortsætte med, ud fra resultaterne fra en genekspressionsanalyse.
- Gå videre med opgaven om diauxisk skift hos gær.