

Restriktionsenzymmer - udvikling af RFLP analyse for brystkræft



Du er nu forsker og er i gang med at undersøge om risikoen for brystkræft også er genetisk bestemt. I din søgen har du fundet ud af at et lille område på et specielt gen har betydning for risikoen for at få brystkræft. Nedenfor er der tre alleler (variationer) af dette område af genet, som kan opformeres ved PCR.

Allel 1: 5' ATTGTACTTCAGTTGGCCGGGTACAGCTACCGGGTTAGCT 3'

Allel 2: 5' ATTGTACTTCAGCTGGCCGGGAACAGCTACCGCGTTATCT 3'

Allel 3: 5' ATTGTACTTCAGCTGGCCAGGTACAGCCACCGGGTTAGCT 3'

Din forskning har vist, at hvis man har allel 1 så har man ingen risiko for at få brystkræft, med allel 2 har man kun let forøget risiko, hvorimod man med allel 3 har over 50 % risiko for at udvikle brystkræft. Du ønsker derfor at lave en test, der hurtigt kan skelne mellem de tre alleler, og til det formål vil du udvikle en Restriktions Fragment Længde Polymorfisme (RFLP) analyse. Ved en RFLP analyse udnytter man, at unikke restriktions enzymer kan genkende korte DNA sekvenser og klippe dem over. Herved kan der dannes DNA fragmenter af forskellig længde. Valget står mellem disse tre enzymer, da du har dem stående i dit laboratorium:

1: *A**l**u**I* : 5' AG -klip- CT 3'

2. *A**f**a**I* : 5' GT –klip-AC 3'

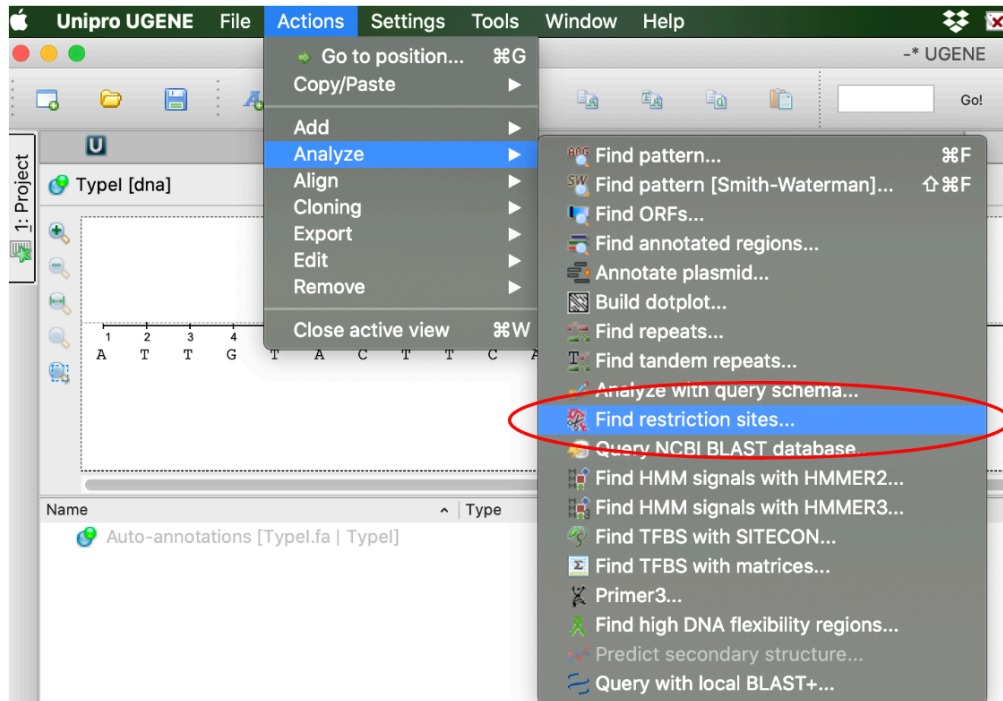
3. *H**p**a**I* : 5' C –klip-CGG 3'

Tag først papir DNA sekvensen af allel 1. Klip DNA sekvensen af genet over med *A**l**u**I* restriktionsenzymet, ved at klippe hver gang du finder et DNA stykke med 5' AGCT 3' basekombinationen.

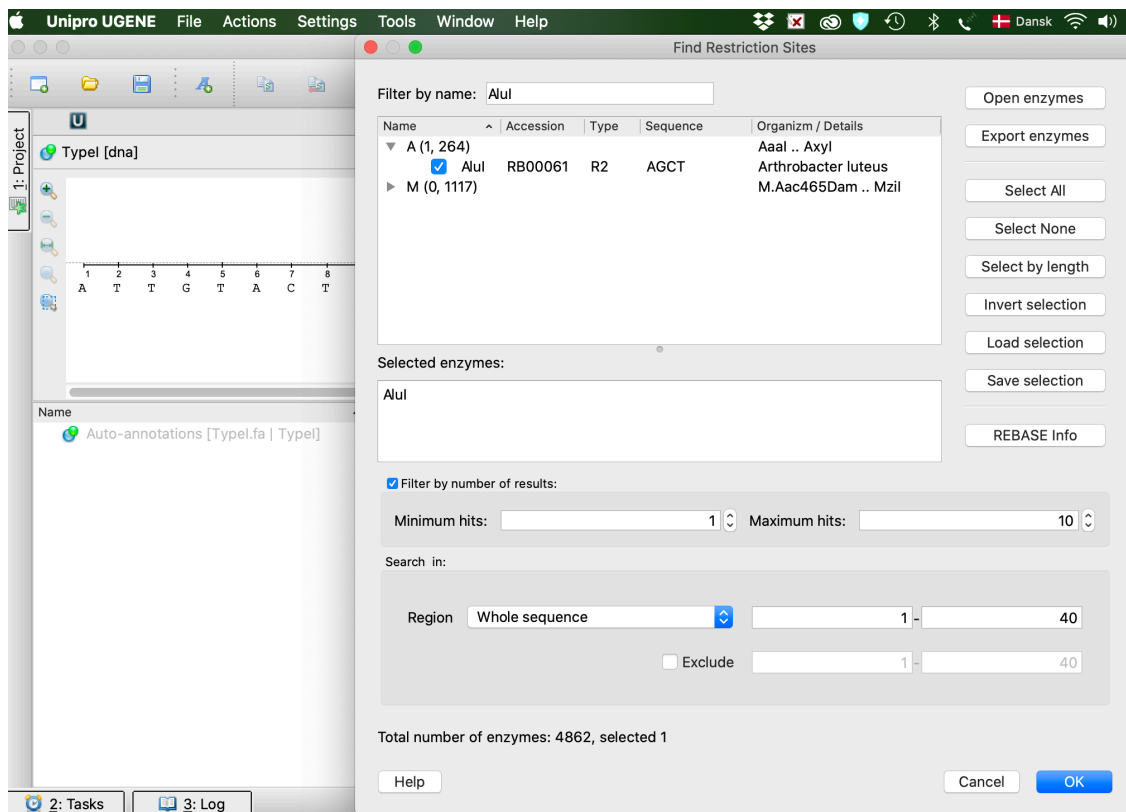
1. Hvor mange og lange DNA sekvens fragmenter dannes der, når du skærer DNA sekvensen for type 1 med *A**l**u**I*?

Selv med korte DNA sekvenser er denne måde at analysere DNA på tidskrævende. For at gøre analysen hurtigere kan man med fordel bruge et Bioinformatik program, i denne øvelse bruges programmet Ugene.

Åben først filen Allel 1.fasta i Ugene. Du skal nu analysere den samme sekvens du lige kiggede på, men for alle tre enzymer. Klik på fanebladet Actions - Analyze - Find restriction sites...



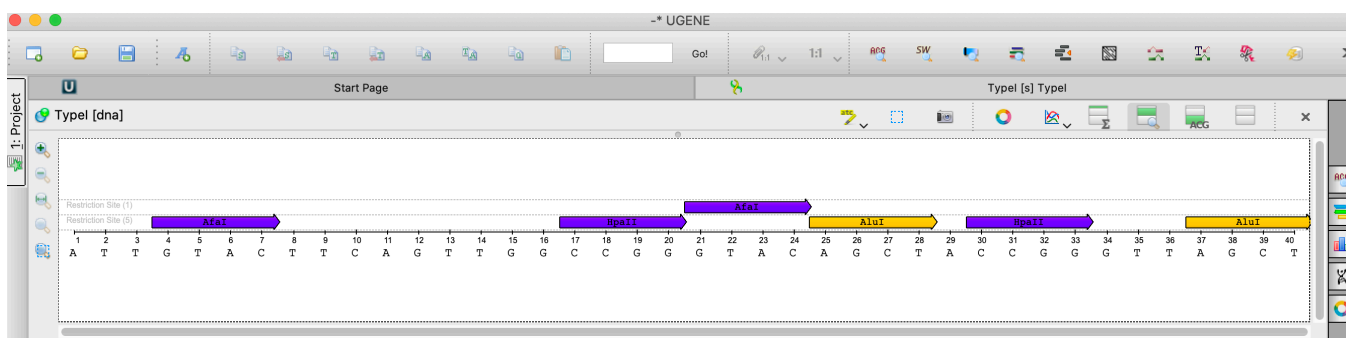
Du får nu en skærm der ser ud på følgende måde:



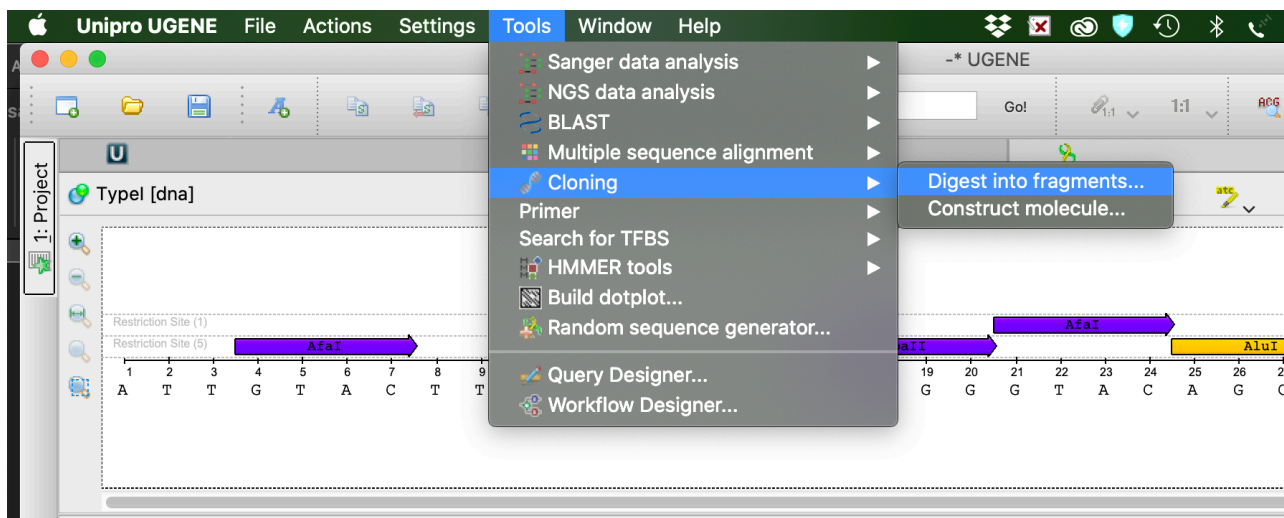
Under filter by name sørger du nu på det første restriktionsenzym, AluI. Skriv det i skrivefeltet, klik på trekanten ud for A og enzymet vil dukke op som vist ovenfor. Sæt flueben ud for AluI. Enzymet vil nu stå i vinduet med valgte enzymer (selected enzymes).

Gentag for AfaI og HpaII enzymerne, og sæt også flueben ved dem så de står i boksen med valgte enzymer. Tryk OK.

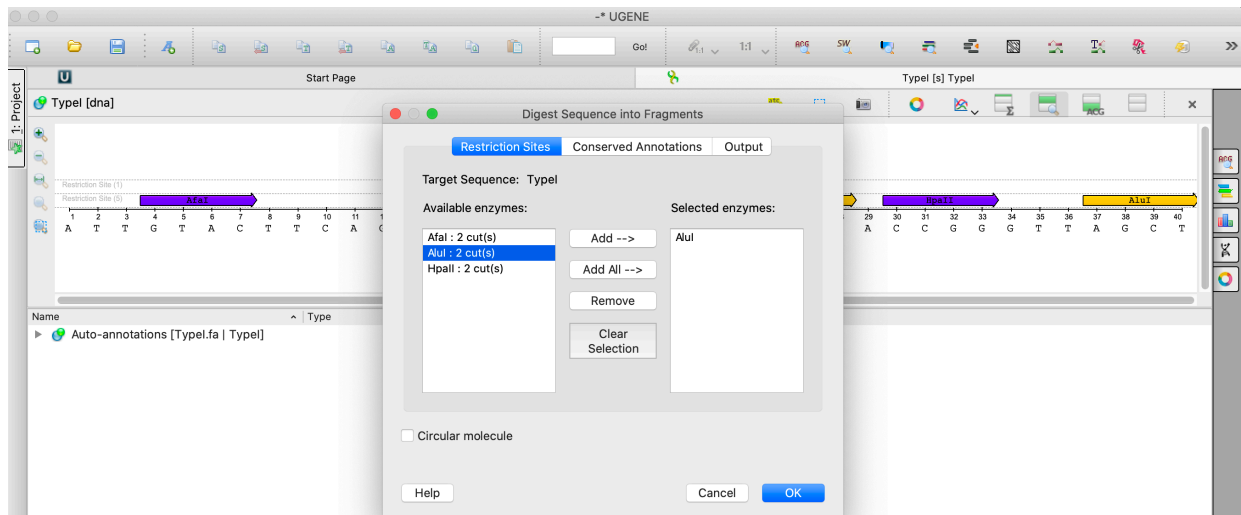
Programmet viser nu, hvor skæringsstederne er for de tre forskellige restriktionsenzymer som følger:



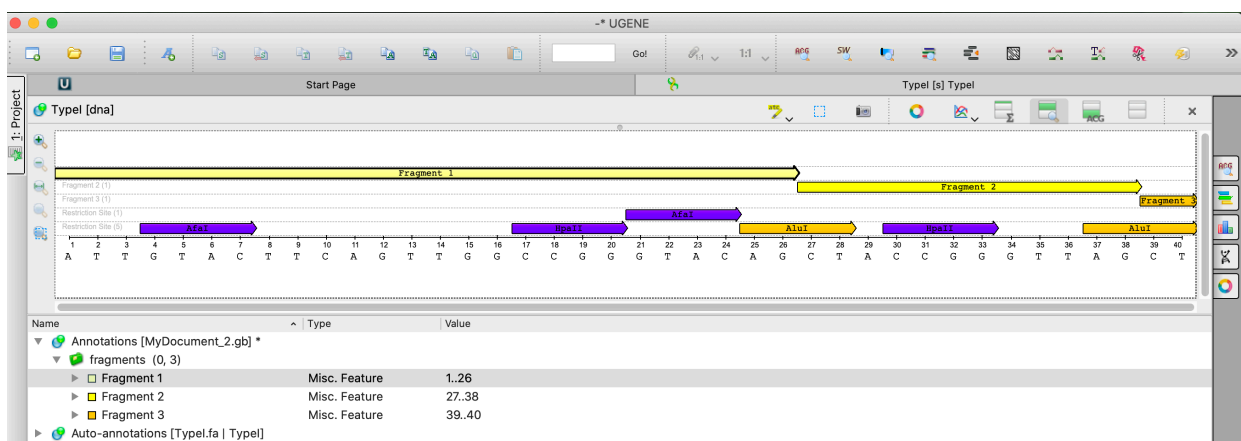
Men det du er interesseret i er jo at kende fragment længderne, og at undgå at skulle tælle antal basepar, da det er tidskrævende. Programmet kan selvfølgelig også hjælpe dig med det.



Klik på fanebladet Tools - Cloning - digest into fragments... Du får nu vist følgende skærmbillede:



Vælg AluI og tryk på add. Enzymet vil nu tjekke hvor mange fragmenter, der dannes ud fra dette enzym. Tryk på ok og se resultatet. For at resultatet kan ses skal du have trykket på  knappen.



Som det ses fås 3 fragmenter, 1 på 26 basepars længde (1-26), 1 på 12 basepars længde (27-38) og et på 2 basepars længde (39-40). Som det ses får du det samme resultat, som da du klippede papirs DNA sekvensen for allel I.

Gentag nu analysen men nu med Afal enzymet ved at vælge tools - cloning -digest into fragments... vælg nu Afal og tryk add. Husk at markere AluI enzymet og tryk remove, ellers tester programmet hvilke fragmenter der kommer, hvis du bruger begge enzymer samtidigt. Noter hvor mange og hvor lange fragmenter du får.

Til slut analyserer du HpaII enzymet på samme måde. Noter hvor mange og hvor lange fragmenter du får ved at bruge HpaII enzymet.

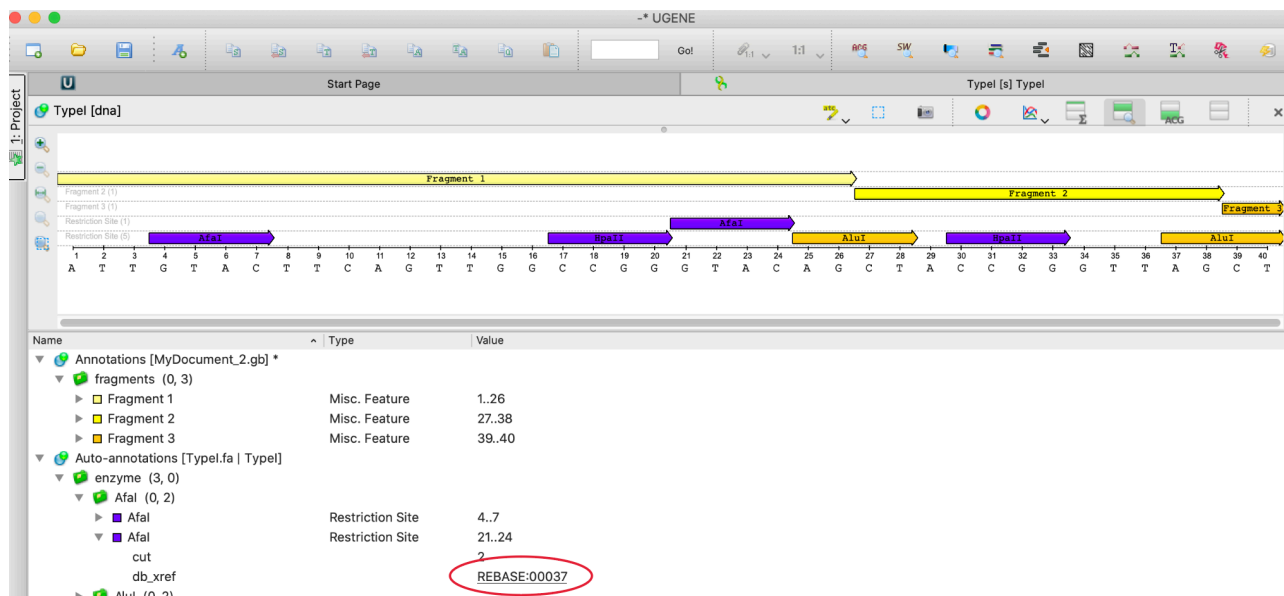
Tegn fragmenterne ind på det udleverede "gelelektroforese" papir. Brug DNA markøren til at placere fragmenterne korrekt på papiret.

Åben filen Allel 2.fasta i Ugene. Lav nu en analyse af allel 2 DNA sekvensen for de samme 3 restriktionszymer som før, en af gangen. Notér hvor mange og hvor lange DNA fragmenter der dannes, når DNA sekvens type 2 skæres med henholdsvis AluI, Afal og HpaII. Tegn dem ind i det udleverede gelelektroforese ark.

Åben endelig filen Allel 3.fasta i Ugene og gentag analysen for denne fil. Bestem igen, hvor mange og hvor lange DNA fragmenter der dannes og tegn dem ind i det udleverede "gelelektroforese" ark.

Det er nu tid til at analysere resultaterne. Se på et restriktions enzym af gangen.

2. Er AluI i stand til at lave fragmenter, der gør at Type 1, type 2 og type 3 allelen af genet kan adskilles? Hvis ikke, hvilke alleltyper kan der ikke skelnes imellem og hvorfor?
3. Er Afal i stand til at lave fragmenter, der gør at Type 1, type 2 og type 3 allelen af genet kan adskilles? Hvis ikke, hvilke alleltyper kan der ikke skelnes imellem og hvorfor?
4. Er HpaII i stand til at lave fragmenter, der gør at Type 1, type 2 og type 3 allelen af genet kan adskilles? Hvis ikke, hvilke alleltyper kan der ikke skelnes imellem og hvorfor? Tjek all
5. Du skal nu undersøge om restriktions enzymerne danner blunt eller sticky ends. Det gøres ved at klikke på auto-annotationer - enzyme - det valgte enzym i Ugene, se screengrab nedenfor. Der står nu et hyperlink for hvert enzym, der linker til restriktions enzym databasen REBASE. Hvilke(n) enzymer vil give blunt ends og hvilke(n) vil give sticky ends?



6. Overvej om der er en anden metode, som man også ville kunne bruge til at bestemme hvilken alleltype en person har.