

# 778115 PÅ JAKT ETTER KREFTGENET I



Veiledning til forsøkssettet 778115 På jakt etter kreftgenet I  
Basert på produsentens originale forsøksveiledning  
Originalens tittel: Edvo-Kit #115 Cancer Gene Detection  
Oversatt og tilrettelagt av Linn Bjørnstad med tillatelse fra Edvotek  
Versjon 1.0, oktober 2015

# LÆRERVEILEDNING

## Hensikt

Hensikten med forsøket er å utvikle en forståelse for arvelige mutasjoner og deres rolle i sykdommer, i dette tilfellet kreft.

## Aktuelle kompetansemål i læreplanen

### Naturfag VG1

Bioteknologi: Gi en oversikt over ulike former for medisinsk bruk av bioteknologi og diskuter muligheter og utfordringer ved slik bruk.

### 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.

### Teknologi og forskningslære X og 1

Teknologi, naturvitenskap og samfunn: Beskriv prinsipper og virkemåte for noen moderne instrumenter i industri, helsevesen eller forskning, og gjør rede for nytten og eventuelle skadevirkninger.

## Innhold og utstyr

### Innhold

Forsøkssettet inneholder materialer til 8 elevgrupper.

- Plaststrip med DNA-prøver:
  - A. DNA-mærker
  - B. Kontroll-DNA fra frisk person
  - C. Pasient-DNA, perifert blod
  - D. Pasient-DNA, kreftsvulst
  - E. Pasient-DNA, normalt brystvev
- Agarose
- 50x kons. TAE elektroforesebuffer
- 10x Gel loading solution (appliseringsbuffer)
- 20x kons. FlashBlue DNA-fargeløsning
- InstaStain Blue DNA-fargekort
- Engangspipetter (plast)

## Oppbevaring

DNA-prøvene oppbevares i kjøleskap. Øvrige komponenter oppbevares ved romtemperatur.

## Tilleggsutstyr (foreslåtte varenumre i parentes)

### Nødvendig

Elektroforesekar (5441.50/55/65)  
Spenningskilde (5441.22/24)  
Demineralisert vann (8903.00-6)  
Plastkar til gelfarging (5700.50)  
Erlenmeyerkolbe 250 ml (0079.10)  
Målesylindre  
Vekt (1028.90)  
Mikrobølgeovn (alt. kokeplate/gassbrenner)

### Anbefalt

Mikropipetter (0134.06)  
Pipettespisser (0144.31)  
Lysplate (5444.20)  
Mikrosentrifuge (0677.00)  
Hansker (0860.46-49)  
Laboratoriefrakk (0856.72-78)

## Forberedelser

### Tillaging av agarosegeler/agaroseløsning

Det er lagt opp til at elevene støper agarosegelene selv som en del av forsøket. Gelene kan støpes på forhånd og lagres til forsøksdagen. La ferdigstøpte geler bli liggende i støpeformen med kammen i, forsegle dem med plastfolie etter de har stivnet og oppbevar dem i kjøleskap i inntil 1-2 uker (agarosegeler kan ikke oppbevares i fryser).

Alternativ: For å spare tid kan det lages en større mengde agaroseløsning som hele klassen deler:

1. Vei inn 3,0 g agarose og overfør til en 500 ml flaske. Tilsett 390 ml 1x TAE elektroforesebuffer (ferdig fortynnet), og roter flasken for å unngå klumper.
2. Bruk en merkepenn til å sette en strek på utsiden av flasken for å markere volumet av agaroseløsningen.
3. Kok opp i mikrobølgeovn eller kokende vannbad til agarosen er fullstendig oppløst og løsningen er klar som vann. Roter kolben innimellom for å få en jevn løsning. Følg nøye med for å unngå at det koker over. Sjekk at det ikke er uløst agarose eller klumper i løsningen.
4. Dersom det har fordampet fra løsningen tilsettes demineralisert vann opp til streken, slik at løsningens volum blir lik det opprinnelige volumet.
5. Avkjøl agaroseløsningen under rennende vann mens du roterer flasken til temperaturen er ca 60 °C (når du kan holde flasken i hånden uten å brenne deg). Sett gelkarene på et horisontalt underlag, sett i kammene og hell i agaroseløsning (volumet avhenger av størrelsen på gelkaret. 7x7 cm: 30 ml, 7x10 cm: 50 ml, 7x14 cm: 60 ml). La stå til gelene har stivnet (20-30 min).

### Fortynning av konsentrert TAE elektroforesebuffer

Det er valgfritt om elevene bruker 50x TAE (og demineralisert vann) eller ferdig fortynnet 1x TAE til gelstøping. Til elektroforesekanalene benyttes 1x fortynnet TAE, volumet som trengs avhenger av antallet og størrelsen på kanalene. For å lage 1 L med 1x TAE blandes 20 ml 50x konsentrert TAE med 980 ml demineralisert vann i en 1 L flaske. Bland godt.

### Fortynning av konsentrert FlashBlue DNA-fargeløsning

I elevveiledningen er det lagt opp til at elevene fortynner den konsentrerte DNA-fargeløsningen selv. Alternativt kan løsningen fortynnes i forkant: Tilsett 100 ml av 10x FlashBlue fargeløsning og 900 ml demineralisert vann til en 1 L flaske. Bland godt.

Alternativ: Gelene kan farges med fargekortene InstaStain Blue i stedet for fargeløsningen FlashBlue. Se den engelske veiledningen for fremgangsmåte.

### Hver elevgruppe trenger følgende utstyr

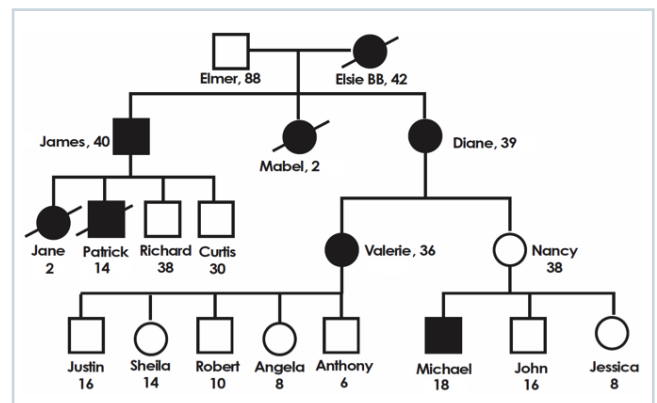
- 50x konsentrert TAE elektroforesebuffer eller 1x fortynnet TAE elektroforesebuffer
- Demineralisert vann
- Agarose
- En «plaststrip» med DNA-prøver
- Gelkar, kam og 2 stk gummikapper til forsegling av karet ved støping
- 10 ml 10x konsentrert FlashBlue fargeløsning eller 100 ml 1x fortynnet FlashBlue fargeløsning
- Plastkar eller stort veieskip til gelfarging

## Forsøksstid

Beregnet tidsbruk er ca. 90 minutter, mindre dersom gelene er støpt på forhånd.

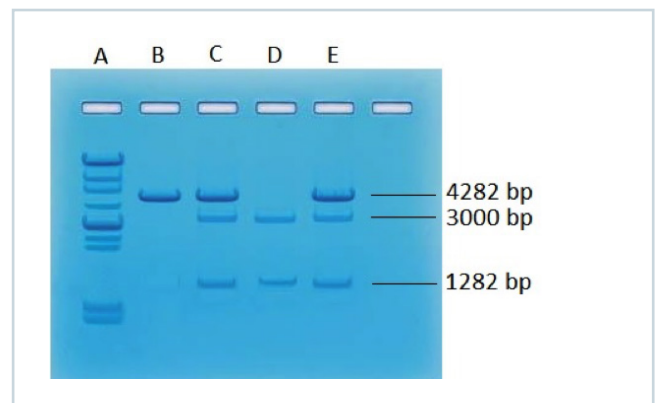
## Resultatanalyse

### Stamtavle



### Forventet gelbilde og resultatforklaring

- A. DNA-standard/markør
- B. Kontroll-DNA fra frisk person uten p53- mutasjonen
- C. Pasient-DNA, perifert blod
- D. Pasient-DNA, kreftsvulst
- E. Pasient-DNA, normalt brystvev





DNA fra normale celler (uten den nedarvede mutasjonen i p53-genet) har ikke restriksjons-enzymsetet, og derfor vil ikke det PCR-kopierte DNAet kuttes av restriksjonsenzymet, men vil ses som ett bånd (4282 bp) på gelen (brønn 2). Pasient-DNA fra kreftsvulsten (tumor-DNA) har mutasjonen i begge p53-allelene og PCR-amplifisert tumor-DNA vil derfor kuttes i to mindre fragmenter (3000 bp og 1282 bp) som kan ses som to bånd på gelen (brønn 4). Pasient-DNA fra perifert blod (brønn 3) og normalt brystvev (brønn 5) vil ha likt båndmønster med tre bånd. Det største båndet (4282 bp) tilsvarer det friske/normale p53-allelet som ikke har mutasjonen, mens de to minste båndene (3000 bp og 1282 bp) tilsvarer allelet med den nedarvede mutasjonen som er kuttet av restriksjonsenzymet.

### **Fasit, diskusjonsspørsmål**

1. Tumor-suppressor-gener (som p53) koder for proteiner som hemmer cellevekst. Personer som har en mutasjon i ett av de to allelene er disponert for uhemmet cellevekst og utvikling av tumorer hvis det andre allelet også utsettes for en skadelig mutasjon. Onkogener koder for proteiner som stimulerer cellevekst, og mutasjoner som medfører økt proteinmengde eller økt aktivitet av det enkelte proteinet kan resultere i kreft.
2. Hot spots er områder i et protein (spesifikke aminosyrer) som er spesielt utsatt for mutasjoner. For eksempel kan enkelte mutasjoner i p53 resultere i endringer i proteinstrukturen som igjen gir endret funksjon.
3. Valeries perifere blod har DNA-bånd som viser at ett allel er normalt (kuttet ikke av restriksjonsenzymet og gir ett bånd på 4282 bp), og det andre har en mutasjon i p53-genet (gjenkjennes av restriksjonsenzymet som kutter DNA-båndet i to mindre deler på hhv. 3000 bp og 1282 bp). Tumorprofilen viser at begge allelene er mutert og dermed kuttet av restriksjonsenzymet. Båndmønsteret tilsvarer derfor deler av mønsteret til blod-profilen (de to minste båndene er felles).
4. I alle forsøk er det essensielt å ha med kontrollprøver for å sikre at resultatet ikke er forårsaket av artefakter eller feil.
5. En lege setter medisinske diagnoser på bakgrunn av informasjon fra uavhengige kilder, blant annet molekylærbiologiske data. I dette tilfellet kan pasientens stamtavle, data fra DNA-analysen og sekvensering av pasientens DNA brukes til diagnostisering.

# ELEVVEILEDNING – PÅ JAKT ETTER KREFTGENET I

## Innledning

Mange ulike faktorer har vist seg å være involvert i kreftsykdom, blant annet eksponering for ulike kreftfremkallende stoffer (karsinogener) i maten vi spiser og miljøet rundt oss. Flere typer kreft skyldes familiær predisposisjon, og noen av disse er forbundet med arvelige mutasjoner i gener som kontrollerer cellevekst (onkogener og tumor-suppressor-gener). Et slikt gen er tumor-suppressor-genet p53 som normalt begrenser cellevekst.

Arvelig kreft utgjør en liten andel av alle kreftformer. Nedarvede mutasjoner kan detekteres ved hjelp av stamtavler, siden nedrivingsmønsteret skiller seg fra mønsteret for en mutasjon som har oppstått spontant i ett familiemedlem. Ved bruk av stamtavler og molekylærbiologiske metoder som PCR, elektroforese og DNA-sekvensering kan man dermed identifisere personer som er genetisk predisponert for ulike sykdommer.

I dette forsøket ser vi på Li-Fraumeni syndrom (LFS), en sjelden sykdom som innebærer genetisk predisposisjon for ulike kreftsykdommer som sarkom (kreft i muskler, skjelett, fett-, nerve- og bindevev) brystkreft, hjernekreft og leukemi. Sykdommen skyldes en nedarvet mutasjon i tumor-suppressor-genet p53, som koder for et protein som begrenser cellevekst. p53-proteinet har flere «hot spots», områder hvor mutasjoner detekteres hyppig. Personer med LFS har ett normalt og ett mutert p53-allel i alle celler i kroppen. Dermed er kun én enkelt mutasjon som inaktiverer det normale p53-allelet nok til å utvikle kreft. Hos friske personer med to normale genkopier må det derimot to mutasjoner til i en enkelt celle for at genet skal inaktiveres og cellen kan utvikle seg til en kreftcelle, og sannsynligheten for det er veldig liten.

## Del 1 – Stamtavle

En del av utredningsprosessen når det mistenkes at en person har Li-Fraumeni syndrom er å sette opp en stamtavle for pasienten, der andre krefttilfeller i familien kartlegges.

Bruk informasjonen under til å tegne en stamtavle for pasientens familie:

Valerie Brown (36) fant en ujevn, liten klump i det ene brystet. Hun ble bekymret, siden moren hennes måtte fjerne brystet på grunn av brystkreft da hun var i slutten av tredveårene. Valerie tok kontakt med fastlegen og ble henvist videre til en kreftavdelingen

på sykehuset, hvor hun fikk diagnosen brystkreft. I forbindelse med utredningen ble hun spurt om andre krefttilfeller i familien. I samtale med moren fikk Valerie vite at det ikke var noen kjente krefttilfeller i farens familie, mens flere i morens familie hadde vært rammet av kreft.

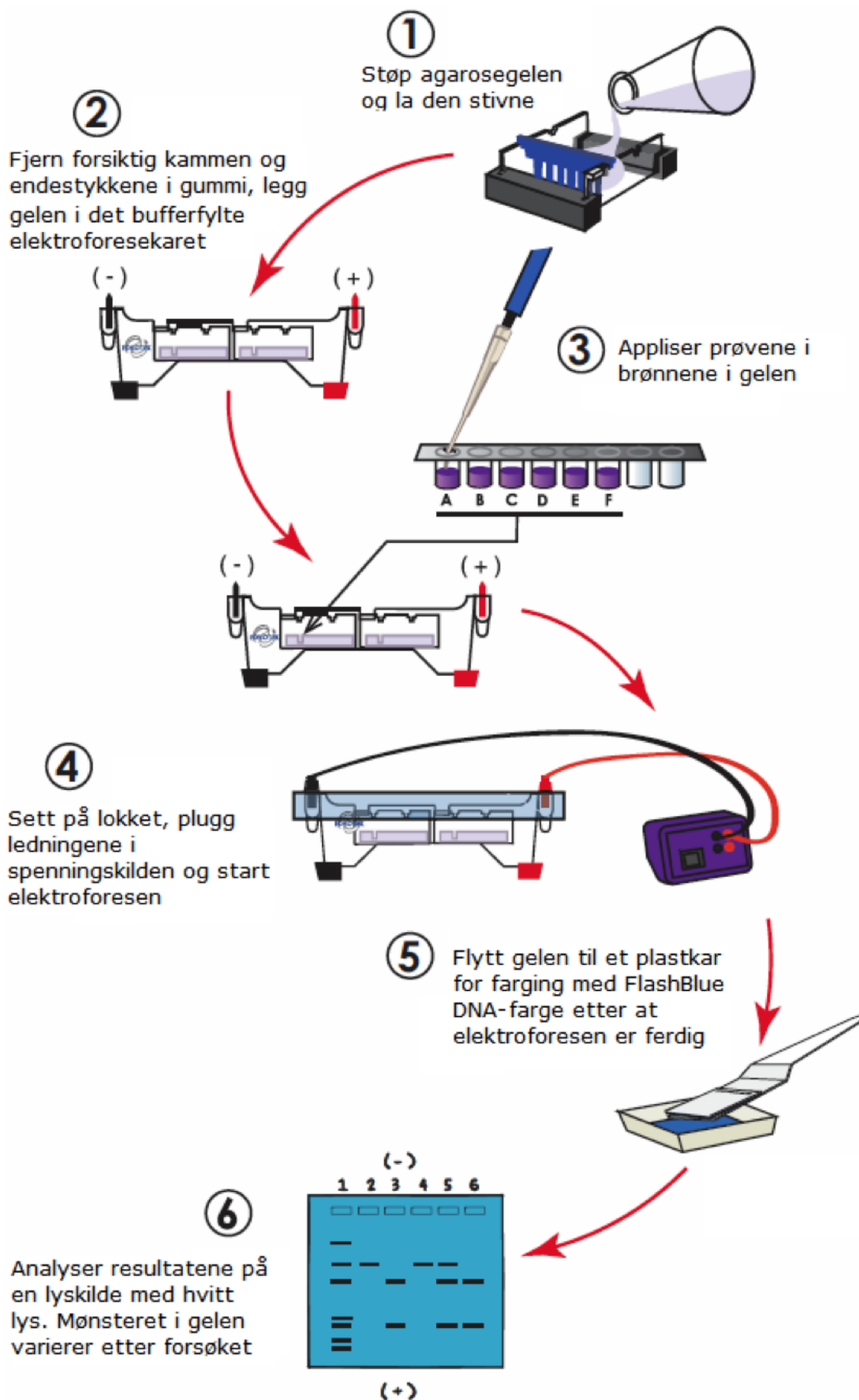
- Moren, Diane, ble diagnostisert og behandlet for brystkreft i en alder av 39 år
- Moren hadde en søster, Mabel, som døde av hjernesvulst da hun var 2 år
- Onkelen, James (morens bror), ble behandlet for tarmkreft med kirurgi og cellegift
- Mormoren døde av brystkreft som 42-åring
- Morfaren (88) har ikke hatt kreft
- Fetteren på morssiden, Patrick, døde av hjernesvulst da han var 14 år
- Kusinen, Jane (Patricks søster) fikk leukemi og døde bare 2 år gammel
- Patricks to brødre, Robert (28) og Curtis (30) har god helse og er kreftfrie
- Valeries søster, Nancy, har ikke kreft
- Nancys sønn, Michael, fikk kreftdiagnosen sarkom da han var 3 år. Nå, som 18-åring fikk han diagnosen beinkreft (osteosarkom)
- Nancys andre sønn, John, og datteren, Jessica, er begge kreftfrie
- Valeries fem barn, Justin (16), Sheila (14), Robert (10), Angela (8) og Anthony (6), er alle friske og har ingen tegn på kreft

I tilfeller der en stamtavle viser at det er høy sannsynlighet for Li-Fraumeni syndrom gjøres normalt en diagnostisk test. DNA-analyser av p53-genet utføres da på blod- og vevsprøver fra pasienten. Normal prosedyre er å kopiere det aktuelle genet ved hjelp av PCR-teknikken. Deretter brukes en eller flere metoder for å undersøke om genet har en mutasjon eller ikke.

I neste del av forsøket skal du bruke elektroforese til å analysere Valeries DNA og bestemme om hun har mutasjonen i p53-genet eller ikke. Det er blitt tatt blod- og vevsprøver fra Valerie. DNA har blitt isolert fra de ulike prøvene og kopiert ved PCR. Deretter er DNA-prøvene behandlet med et restriksjonsenzym som gjenkjenner den muterte sekvensen i p53-genet. Restriksjonsenzymet kutter altså det muterte DNAet, mens normalt DNA uten mutasjonen ikke gjenkjennes av enzymet og vil dermed ikke kuttes.

## Del 2 - Elektroforese

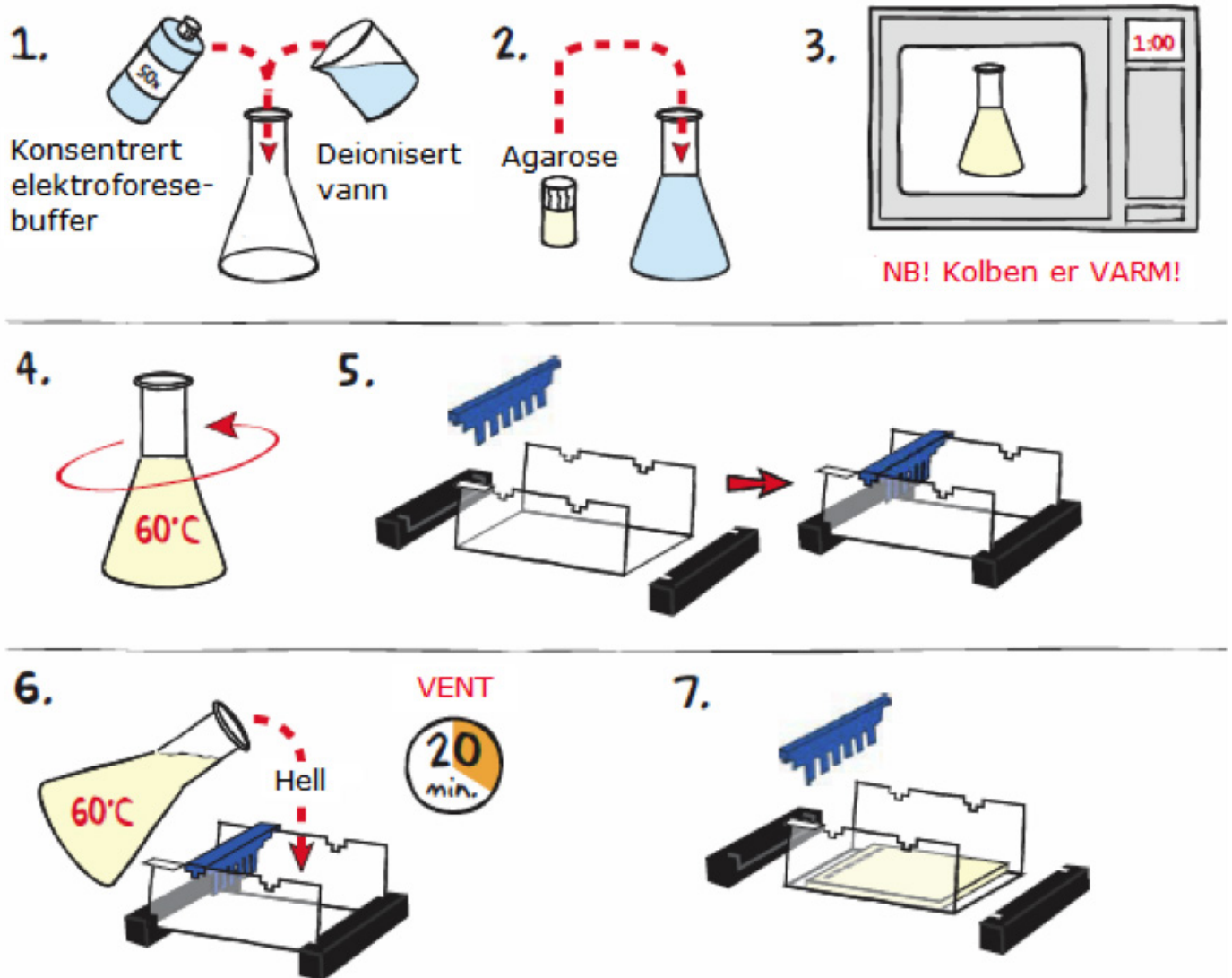
Flytskjema - oversikt over forsøket



## Labororiesikkerhet

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

## Støping av 0.8 % agarosegeler

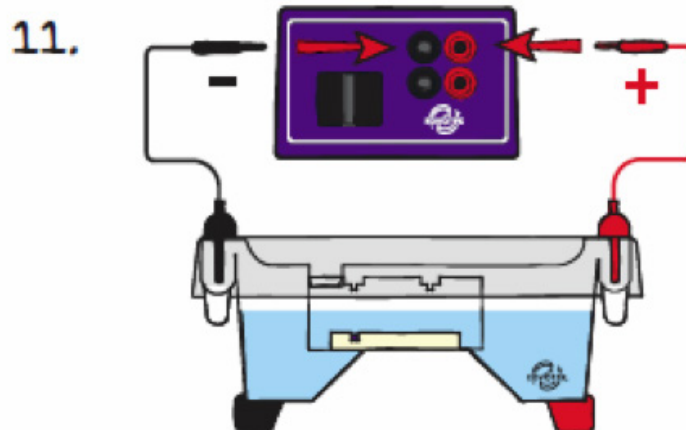
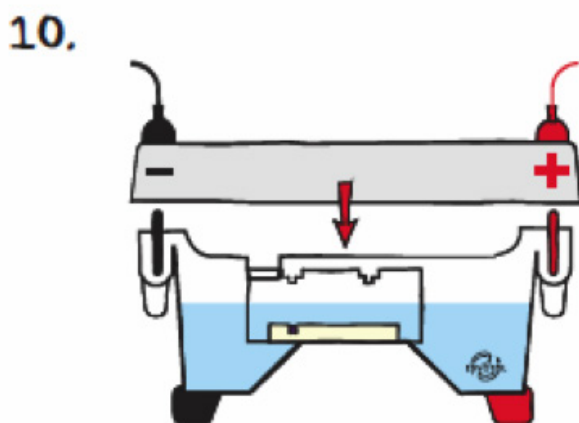
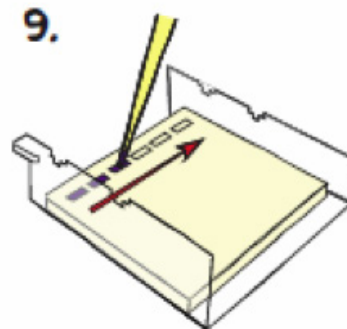
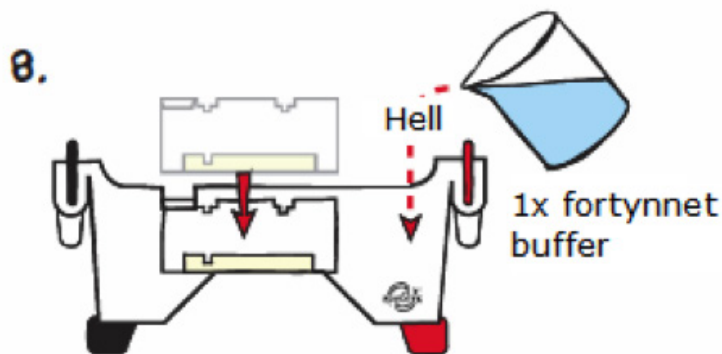


1. Fortynn 1 ml av 50x konsentrert TAE-buffer (elektroforesebuffer) med 49 ml deionisert vann i en 250 ml erlenmeyerkolbe. Dette gir nok 1x TAE-buffer til 1 stk 0.8 % agarosegel.
2. Vei inn 0.39 g agarose og overfør til kolben med buffer.
3. Kok opp i mikrobølgeovn ved høy effekt i ca 1 min. for å løse agarosen. 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.

4. 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).
5. Forsegl gelkaret med endestykker/tape og sett i en kam med 6 tenner.
6. Sett gelkaret på et horisontalt underlag og hell i agaroseløsningen. Fjern eventuelle bobler med en pipettespiss. La stå til gelen har stivnet (ca 20 min). Gelen blir mindre transparent når den stivner.
7. Når gelen har stivnet fjernes tapen/endestykkene og kammen forsiktig. Pass på at ikke gelen revner og brønnene blir ødelagte.



## Applisering av prøvene på gelen og elektroforese



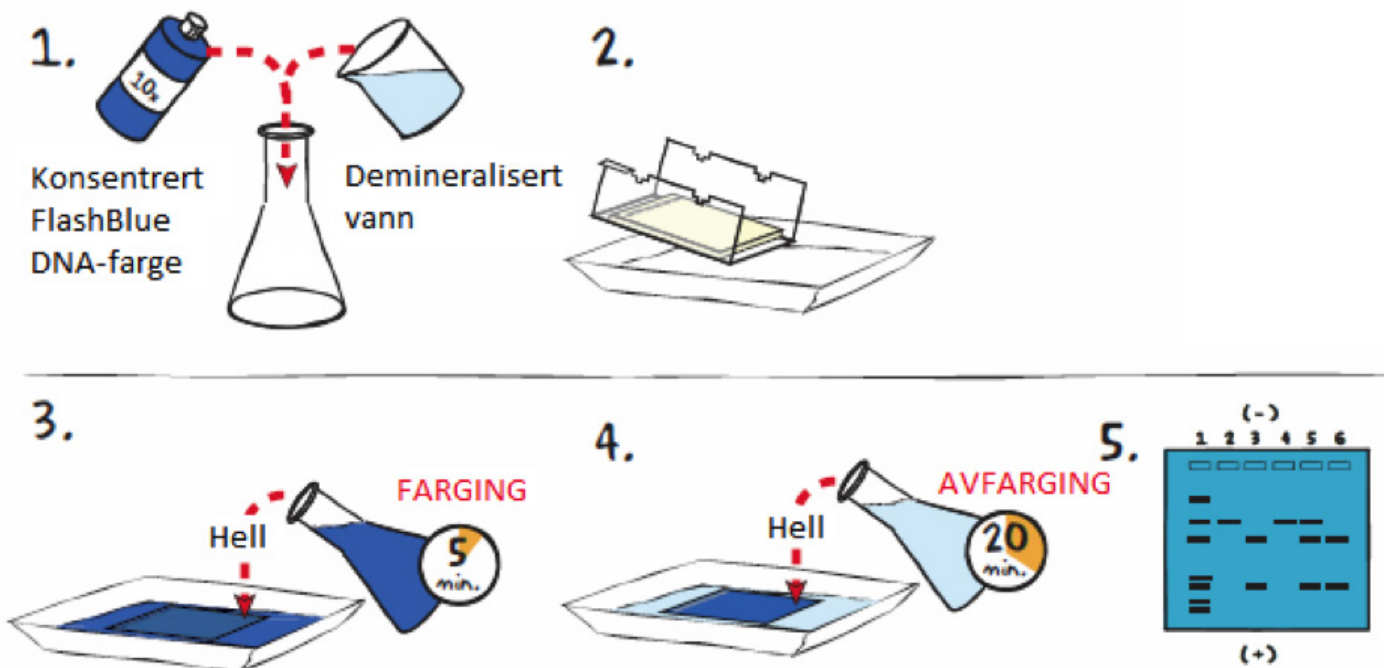
Brønn	Rør	Beskrivelse
1	A	DNA-standard/markør
2	B	Kontroll-DNA fra frisk person uten mutasjon i p53-genet
3	C	Pasient-DNA, perifert blod
4	D	Pasient-DNA, brysttumor (kreftsvulst)
5	E	Pasient-DNA, normalt brystvev

- Legg gelkaret med gelen i elektroforesekarer slik at brønnene er nærmest den negative (svarte) elektroden. Hell 1x TAE-buffert i karet til buffernivået er omtrent 5 mm over gelen. Se til at det er buffer i alle brønnene.
- Sentrifuger prøvene kort eller dunk dem lett mot bordplaten for å samle hele volumet nederst i røret. Appliser 35 µl av

prøvene A-E i brønnene 1-5 på gelen i rekkefølge, fra venstre mot høyre (se 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 elektroforesekarer.

- Sett lokket på elektroforesekarer. Sjekk at den negative (svarte) elektroden på lokket er koblet til den negative (svarte) elektroden på elektroforesekarer og tilsvarende for den positive (røde) elektroden.
- Koble til spenningskilden (rødt mot rødt og svart mot svart), still inn start elektroforesen. Kjør gelen på 70-150 V i 20-60 min. Tiden det tar å separere DNA-molekylene avhenger av spenningen og størrelsen på elektroforesekarer. Når elektroforesen er i gang dannes små, synlige bobler på elektrodene, og de negativt ladede DNA-molekylene vandrer mot den positive elektroden. Når elektroforesen er ferdig, skrus strømmen av for lokket fjernes.

## Farging av gelen og visualisering av DNA



1. Fortynn 10 ml av 10x FlashBlue fargeløsning med 90 ml deionisert vann og bland godt.
2. Løft gelkaret med agarosegelen ut av elektroforesekarret og skyv gelen forsiktig over i et egnet plastkar.
3. Hell fargeløsning (1x) i karet til gelen er fullstendig dekket. Ikke hell direkte på gelen. La gelen ligge i fargeløsningen i 5 min, mens du vipper på karet innimellom.
4. Hell av fargeløsningen og tilsett 250-300 ml deionisert vann. Vipp på karet med noen minutters mellomrom. La gelen ligge til avfarging i minst 20 min. Skift vannet hyppig for raskere avfarging. De mørkeblå DNA-båndene vil etter hvert bli synlige mot den lyseblå bakgrunnen.
5. 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 synliggjøring av DNA-båndene. 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

Studer gelen og forklar de ulike båndene. Ble resultatet som forventet? Hvorfor/hvorfor ikke?

### Diskusjonsspørsmål

1. Hva er forskjellen mellom tumor-suppressor-gener og onkogener?
2. Hva er effektene av «hot spots» i proteinstrukturen til p53?
3. Hvorfor har DNA-prøven fra kreftsvulsten til Valerie færre bånd enn DNA-prøven fra perifere blodceller?
4. Hva er hensikten med prøven med kontroll-DNA?
5. Kan en lege sette en diagnose basert på molekylærbiologiske data?



