

Tools of Human Molecular Genetics

Gel-elektroferase: en teknik, der bruges til at adskille og analysere molekyler i en blanding.

Polyakrylamidgeler: elektroforetisk adskillelse af proteiner udføres her. Når man tilsætter en blanding af proteiner til sådan en gel og lader en elektrisk strøm løbe gennem gelen, vil proteinerne vandre gennem gelen. Proteiner hvis størrelse ligger tæt på hinanden adskilles i to trin. I det første trin udnytter man, at proteiner af samme størrelse stort set altid har forskellige ladning, da de som regel er opbygget af et forskelligt antal sure og basiske aminosyrer. I andet trin separeres de adskilte proteiner yderligere efter størrelse ved hjælp af SDS-PAGE.



Agarose-geler: bruger man til at adskille nukleinsyrer. Man sædvanligvis bruger polyakrylamid-geler, mens man til DNA-molekyler fra 200 bp til 20000 bp bruger agarose-geler.

Polymerase chain reaction (PCR): en metode til at klonere et stykke DNA. Følsomheden af PCR er så stor, at det er nok med blot en enkelt celle til at undersøge for f.eks. tilstedeværelsen af bestemte mutationer, som er knyttet til forskellige genetiske sygdomme. Der bliver lavet mange kopier af det gen eller DNA-stykke, man er interesseret i, sådan at man får så store mængder af det, at man kan undersøge det yderligere vha. af andre metoder. Det eneste man behøver at kende på forhånd, er en kort DNA-sekvens i hver ende af det DNA-stykke der skal amplificeres. Ud fra disse korte sekvenser kan der laves en primer, der passer til hver ende – og vha. disse og en speciel DNA-polymerase, der kan tåle meget høje temperaturer plus de 4 DNA byggesten, A (dATP), T (dTTP), G (dGTP) og C (dCTP), kan PCR-reaktionen foregå.

Southern Blotting: når man vha. kloning eller PCR har fået isoleret et stykke DNA, opstår spørgsmålet, om dette er bevaret i andre organismer. Nogle gener er bevaret blandt nært beslægtede organismer, mens andre er bevaret i meget fjernt beslægtede organismer. Grundideen bag Southern blotting analyser er hybridisering hvor man lader 2 DNA-strenger med komplementære sekvenser baseparre med hinanden. Først oprenses DNA fra forskellige organismer, og dernæst klippes det i mindre stykker med restriktionsenzym. Det klippede DNA adskilles efter størrelse ved gel-elektroferase; det gøres som regel ved behandle gelen med basisk opløsning. Den enkeltstrengede DNA i gelen overføres nu til et specielt filter, sådan at man får et aftryk af gelen på filtret. DNA-stykket som man isolerede mærkes radioaktivt og gøres enkeltstrengt. Derefter anbringer man både filtret og proben i en opløsning, hvor hybridisering kan foregå. Hvis proben hybridiserer baseparer med et DNA-fragment i filtret, er det et tegn på, at den organisme hvorfra det pågældende DNA-fragment stammede, netop indeholder en DNA-sekvens, der stort set er identisk med den, man har isoleret.

Northern Blotting: bruges til at genkende specifikke RNA-sekvenser. Man adskiller RNA-molekyler ved gel-elektroferase før overførslen til filtret. Man oprenser RNA fra forskellige væv, kører det i hver sin bane i en gel og overfører det efter gelkørslen til et filter. Filtret hybridiseres så med en radioaktivt mærket probe. Eftersporingen og fremkaldelse af røntgenfilmen vil man kunne se mørke bånd svarende til de RNA-molekyler, der har hybridiseret med DNA-proben.

in situ hybridisering: (in situ = på stedet)

Komplementær DNA: er lavet af mRNA, indeholder ikke introner og andre ikke-kodende sekvenser, kendt som reverse transkriptase.

DNA ligase: grupper af enzymer, som katalyserer sammenføjjningen af to molekyler under forbrug af ATP eller en anden energirig trifosfat-forbindelse.

Vektor: 1) i gensplejsning betegnelse for et plasmid, en fag eller en virus, som kan anvendes til at overføre DNA-sekvenser fra en organisme til en anden. 2) en organisme, der kan fungere som bærer af patogener og parasitter og overføre dem til en egnet værtsorganisme. Vektor kan replikeres i værtsorganisme med det øvrige DNA.

Plasmider: er små cirkulære eller lineære DNA-molekyler, der findes hos bakterier og visse protozoer, bl.a. hos gær. Plasmider replikeres uafhængigt af kromosomerne og kan overføres fra den ene organisme til den anden. Plasmider kan bære gener for antibiotikaresistens, som således hurtigt kan spredes til andre organismer. Plasmider anvendes ofte i gensplejsning som vektorer for bestemte gener for at analysere små DNA stykker.

Probe: er et DNA eller RNA-fragment, der anvendes til påvisning af en ganske bestemt baserækkefølge i et DNA-molekyle. Proben og sekvensen, den genkender, er komplementære til hinanden. For at kunne identificere den aktuelle nukleinsyresekvens mærkes proben, f.eks. med en radioaktiv isotop. Proben har en størrelse på over 10kb og kan derfor ikke anvendes til punktmutationer.

Western Blotting: en standard metode til at analysere struktur af proteinet.

Array-CGH: Ved hjælp af UL-scan kan fostervandet udtages uden at ramme fosteret. Cellerne fra fostervandet gøres klar til dyrkning. Ved dyrkning opformeres antallet af celler så der kan laves en kromosomanalyse. Når celledelingen er på sit højeste, tilsættes colcemid som standser celledelinger i metafasen. Herefter behandles cellerne med en hypoton væske. Her høstes cellerne. Præparaterne laves ved at celled suspensionen dryppes ud på objektglas. Efterfølgende kontrolleres i mikroskop og kvaliteten af præparatet er i orden. Præparatet tørres og forbehandles. Herefter båndfarves kromosomerne med Q-bånding. Præparaterne undersøges i mikroskop. Kromosomerne gennemses og karyotypen bestemmes. Der er altid mindst to til at lave analysen.