

DNA FINGERPRINTING II

Hensikt

Hensikten med forsøket er å utvikle en grunnleggende forståelse av DNA-fingeravtryksanalyser basert på restriksjonszymer.

Bakgrunn

Ulike individer har variasjoner i DNA-sekvensen, og disse variasjonene kan brukes til å bestemme en persons DNA-profil eller genetiske fingeravtrykk. RFLP (restriction fragment length polymorphisms)-analyse er en DNA-profileringsmetode hvor DNA behandles med restriksjonszymer og det resulterende båndmønsteret av DNA-fragmenter analyseres ved elektroforese. Restriksjonszymer er proteiner som kløyver fosfatbindinger i spesifikke sekvenser i dobbeltrådet DNA slik at DNA klippes opp i kortere fragmenter. DNA-sekvensvariasjoner bestemt av forskjeller i restriksjonszymers kuttingsmønstre kalles RFLPs, og representerer altså individers unike genetiske profil eller «fingeravtrykk».

I dette forsøket behandles DNA-prøver fra to mistenkte personer i en kriminalsak med to forskjellige restriksjonszymer for å lage DNA-profiler. De resulterende DNA-fragmentene analyseres ved agarosegelelektroforese og båndmønstrene sammenlignes med profilen på DNA-sporet funnet på åstedet for å identifisere gjerningspersonen for den kriminelle handlingen.

Aktuelle læringsmål

Biologi 2, bioteknologi. Gjør greie for fremstilling av genetiske fingeravtrykk, og hvordan de kan brukes i rettsmedisin og i studier av slektskap mellom individer og grupper av organismer.

Teknologi og forskningslære 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.



LÆRERNOTATER

Utstyr

Medfølgende innhold: DNA-prøver, restriksjonsenzymmer (EcoRI og HindIII), reaksjonsbuffer, DNA-standard, sterilt vann, agarose, konsentrert elektroforesebuffer (50 x TAE), gel loading solution (10 x), konsentrert (25 x) FlashBlue DNA-farge, engangspipetter (plast). Forsøkssettet inneholder materialer til 6 elevgrupper.

Oppbevaring: Se tabellen under for oppbevaring av de ulike reagensene. Øvrige komponenter oppbevares ved romtemperatur.

Rør	Innhold	Oppbevaring
A	DNA fra åstedet kuttet med Enzym 1	- 20 °C
B	DNA fra åstedet kuttet med Enzym 2	- 20 °C
C	Mistenkt 1 DNA-prøve	- 20 °C
D	Mistenkt 2 DNA-prøve	- 20 °C
E	DNA-standard (DNA-markør)	- 20 °C
F	Reaksjonsbuffer	4 °C
G	Restriksjonsenzym 1 (<i>EcoRI</i>)	4 °C
H	Restriksjonsenzym 2 (<i>HindIII</i>)	4 °C
I	Enzymrekonstitueringsbuffer	- 20 °C
J	Sterilt vann	- 20 °C

Nødvendig tilleggsutstyr (foreslåtte varenumre i parentes): Is og isboks/kjølespann (067600/067605), vannbad (066602) eller termostatblokk (066650), elektroforesekar (544150/544160/544165), spenningskilde (544122/544124), vekt (102890), erlenmeyerkolbe 250 ml (007910), målesylindre (011820, 011821, 011824)/pipettefyller og pipetter (015330, 014084), mikrobølgeovn/gassbrenner (005111)/kokeplate (066810), destillert vann (890300-6), plastkar/veieskip (097320).

Anbefalt tilleggsutstyr (foreslåtte varenumre i parentes): Hansker (086046-49), mikropipetter (014406/013406) og pipettespisser (013406), mikrosentrifuge (067700), vippebrett (544250), lysplate (544420).

Forberedelser

Alikvotering av DNA, DNA-markør og reaksjonsbuffer:

1. Tin alle DNA-prøvene (rør A-E) og plasser dem på is.
2. Merk seks mikrosentrifugerør «CS1» (til DNA-prøve 1 fra åstedet, rør A) og seks mikrosentrifugerør «CS2» (til DNA-prøve 2 fra åstedet, rør B). Alikvoter 45 µl åsteds-DNA 1 i hvert av de seks rørene merket CS1 og 45 µl åsteds-DNA 2 i rørene merket CS2.
3. Merk seks mikrosentrifugerør «M» og alikvoter 85 µl DNA-markør (rør E) i hvert rør.
4. Merk seks mikrosentrifugerør «Rxn buffer» og alikvoter 45 µl enzymreaksjonsbuffer (rør F) i hvert av rørene.
5. Merk seks mikrosentrifugerør «DNA 1» og alikvoter 35 µl Mistenkt 1 DNA (rør C) i hvert rør.
6. Merk seks mikrosentrifugerør «DNA 2» og alikvoter 35 µl Mistenkt 2 DNA (rør D) i hvert rør.

Rekonstituering og alikvotering av restriksjonsenzymmer:

Restriksjonsenzymene rekonstitueres inntil 30 minutter før enzymreaksjonene settes opp. **Husk!** Når enzymene er løst i buffer må de alltid stå på is!

1. Sørg for at enzymtørrestoffet er i bunnen av rørene (rør G og H). Tapp rørene mot bordet eller sentrifuger kort i en mikrosentrifuge om nødvendig.
2. Tilsett 120 µl rekonstitueringsbuffer (rør I) til hvert av rørene G og H. La stå ved romtemperatur i 1 minutt.
3. Bland godt ved å flikke på rørene med fingeren eller plassere dem på en reagensrørrister til alt tørrestoffet er fullstendig løst.
4. Tilsett 120 µl sterilt vann (rør J) til hvert av rørene med restriksjonsenzym. Bland godt og samle alt innholdet i bunnen av rørene.
5. Merk seks mikrosentrifugerør «Enzym 1» og seks rør «Enzym 2».
6. Tilsett 35 µl restriksjonsenzym 1 (rør G) i hvert av rørene merket «Enzym 1» og 35 µl restriksjonsenzym 2 (rør H) i hvert av rørene merket «Enzym 2». Sett enzymene på is med en gang.

I tabellen under er listet hvilke reagenser hver elevgruppe trenger. Hver elevgruppe trenger også fire mikrosentrifugerør til å sette opp enzymreaksjonene.

Rør	Innhold	Volum
CS1	DNA fra åstedet kuttet med Enzym 1	45 µl
CS2	DNA fra åstedet kuttet med Enzym 2	45 µl
DNA 1	Mistenkt 1 DNA-prøve	35 µl
DNA 2	Mistenkt 2 DNA-prøve	35 µl
M	DNA-standard (DNA-markør)	85 µl
Rxn buffer	Reaksjonsbuffer	45 µl
Enzym 1	Restriksjonsenzym 1 (<i>EcoRI</i>)	35 µl – på is!
Enzym 2	Restriksjonsenzym 2 (<i>HindIII</i>)	35 µl – på is!

Støping av agarosegeler: Dersom elevene støper agarosegelene selv, gjøres dette mens restriksjonsenzymreaksjonene inkuberes. Agarosegelene kan eventuelt 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-buffere (TAE) og FlashBlue-fargeløsningen kan også fortynnes på forhånd.

Forsøks tid

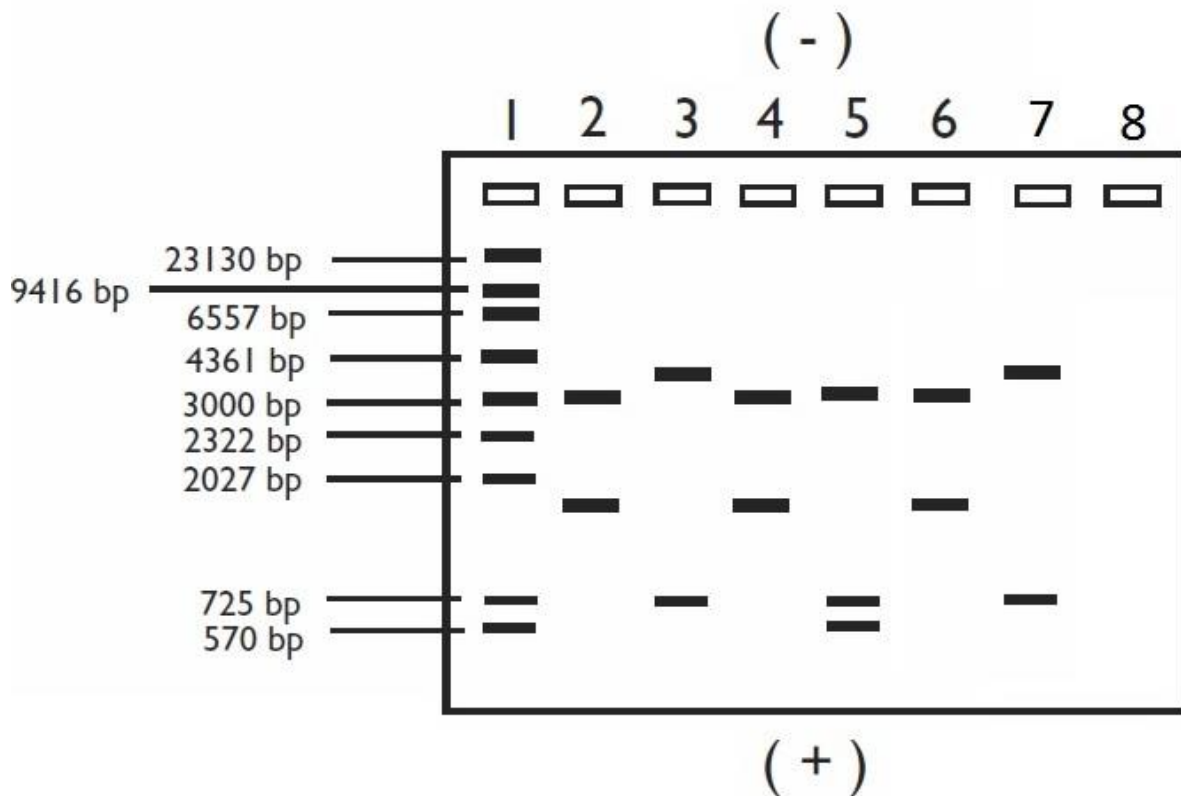
Restriksjonskutting: 45-60 minutter

Elektroforese og farging av gelen: ca. 90 minutter

Resultat analyse: fasit

1. DNA-profilen til Mistenkt 2 er identisk med profilen til DNA-sporet funnet på åstedet. Disse resultatene betyr ikke nødvendigvis at den mistenkte personen er skyldig i den kriminelle handlingen (se svar på spørsmål 2 og 3). Se skjematisk fremstilling av forventede resultater på neste side.

2. Eksperimentelle/tekniske problemer som kan føre til ugyldige resultater omfatter blant annet overførsel («lekkasje») av en DNA-prøve fra en brønn til en annen og ufullstendig kutting av DNA med restriksjonsenzymene.
3. Nei, etter behandling med enzym 1 er båndmønstrene for DNA-prøvene fra åstedet (brønn 2), mistenkt 1 (brønn 4) og mistenkt B (brønn 6) identiske. Resultatene vil derfor ikke gi svar på hvem av de to mistenkte som kan knyttes til saken. I dette forsøket er det kun brukt to variable områder i DNA for å lage genetiske fingeravtrykk. I virkeligheten ser man på mange ulike variable områder i DNA-profilanalyser for å tilfredsstille bestemte statistiske kriterier for å kunne gjøre positive identifikasjoner. Ved å benytte ulike restriksjonsenzymmer kan man gjøre positive identifikasjoner med en nøyaktighet på mer enn 1 av 100 millioner.

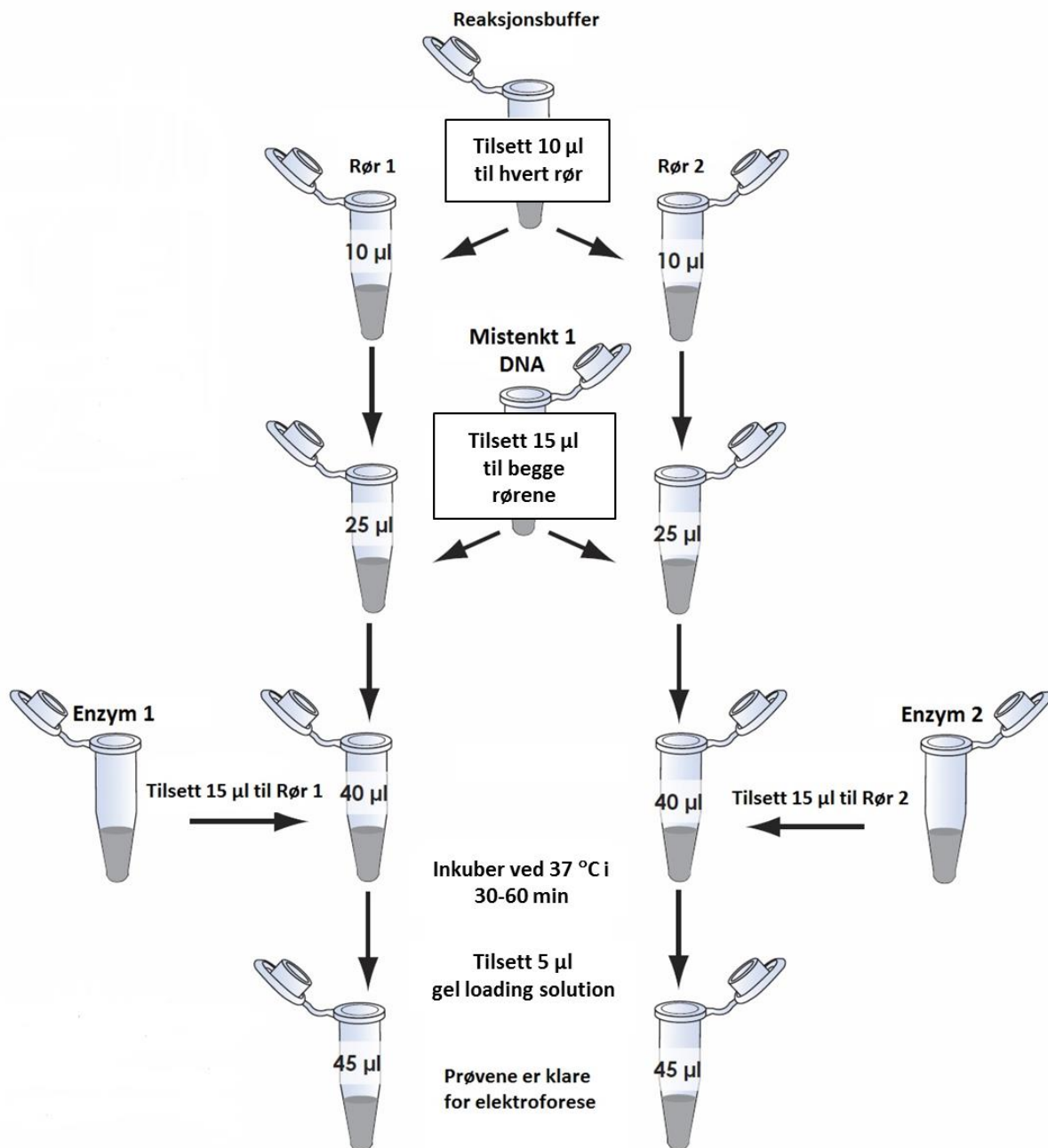


Figur 1. Skjematisk resultatbilde. DNA-fragmentenes relative posisjoner i agarosegelen er angitt. Faktiske resultater vil gi bredere bånd av ulik intensitet. Små fragmenter farges mindre effektivt, og vil derfor fremstå som svakere bånd.

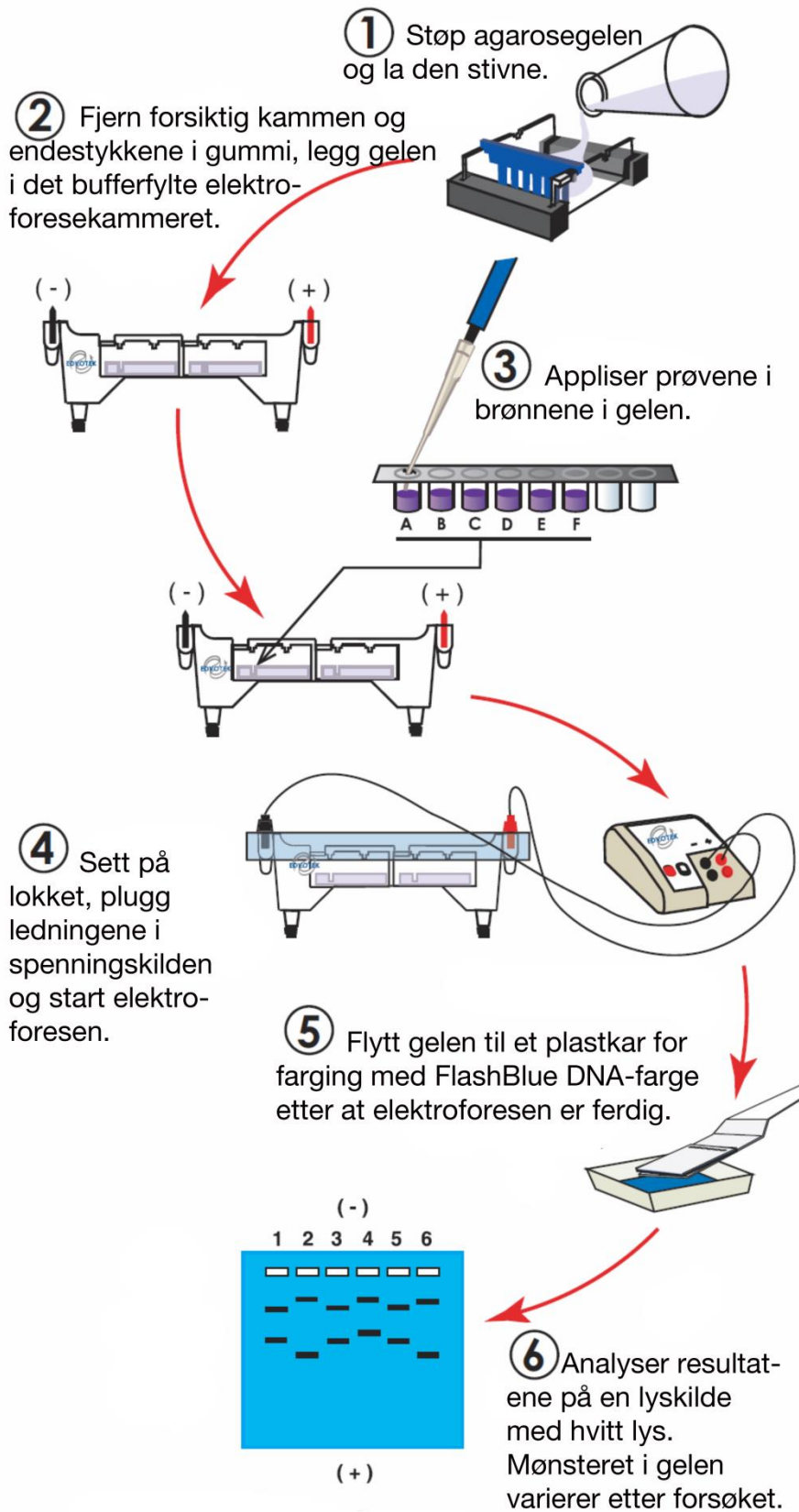
ELEVVEILEDNING

Flytskjema del 1 – kutting av DNA med restriksjonsenzym

Skjemaet viser prosedyren for kutting av DNA fra mistenkt 1 med restriksjonsenzym. DNA fra mistenkt 2 behandles på samme måte i Rør 3 og 4.



Flytskiema del 2 – elektroforese



Utførelse

Restriksjonskutting

DNA-prøvene fra åstedet er ferdig kuttet med restriksjonsenzymmer. Sett disse prøvene til side inntil elektroforesen skal kjøres. Sett deretter opp enzymreaksjoner for å kutte DNA fra de to mistenkte:

1. Merk fire mikrosentrifugerør med nummer 1-4 for de fire ulike restriksjonsenzymreaksjonene. Rørene merkes også med navn/initialer/gruppenummer.
2. Tilsett 10 µl Reaksjonsbuffer til hvert av rørene 1-4.
3. Tilsett DNA og enzym til rørene etter tabellen under. OBS! Bruk en ren pipettespiss for hver overføring av DNA/enzym for å hindre kontaminering.

Tabell 1. Skjema for oppsetning av restriksjonsenzymreaksjoner.

	Rør	Reaksjonsbuffer (µl)	DNA 1 (µl)	DNA 2 (µl)	Enzym 1 (µl)	Enzym 2 (µl)	Totalvolum (µl)
Åsted		DNA-prøve fra åstedet, kuttet med enzym 1, klar til elektroforese			+	-	45*
		DNA-prøve fra åstedet, kuttet med enzym 2, klar til elektroforese			-	+	45*
Mistenkt 1	1	10	15	-	15	-	40
	2	10	15	-	-	15	40
Mistenkt 2	3	10	-	15	15	-	40
	4	10	-	15	-	15	40

* Gel loading buffer er tilsatt DNA-prøvene fra åstedet.

4. Sett på lokkene og bland godt ved å flikke på rørene med fingeren. Sentrifuger prøvene kort eller dunk dem lett mot bordplaten for å samle hele volumet nederst i røret.
5. Inkuber reaksjonene ved 37 °C i 30-60 minutter.
6. Tilsett 5 µl 10x gel loading solution til rørene 1-4 for å stoppe reaksjonen. Bland godt. Prøvene er nå klare til elektroforese.

Støping av 0.8 % agarosegeler

1. Sett et gelkar i støpekammeret eller forsegl karet med endestykker/tape og sett i en kam med 8 tenner (se punkt 1 i flytskjema 2). Lag evt. to rader med brønner ved å sette i to kammer med 6 tenner hver. Vei inn 0.39 g agarose og overfør til en 250 ml erlenmeyerkolbe. 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.

- 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

- 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.
- Sentrifuger prøvene kort eller dunk dem lett mot bordplaten for å samle hele volumet nederst i røret. Appliser 40 µl av hver prøve i brønnene på gelen i følgende rekkefølge:

Brønn	Rør	
1	M	Standard DNA-fragmenter (DNA-markør)
2	CS1	DNA fra åstedet kuttet med Enzym 1
3	CS2	DNA fra åstedet kuttet med Enzym 2
4	1	DNA fra mistenkt 1 kuttet med Enzym 1
5	2	DNA fra mistenkt 1 kuttet med Enzym 2
6	3	DNA fra mistenkt 2 kuttet med Enzym 1
7	4	DNA fra mistenkt 2 kuttet med Enzym 2

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.

Elektroforese

- Sett lokket på elektroforesekaret og koble til spenningskilden. Kjør gelen på 70-150 V i 30-60 min (se punkt 4 i flytskjema 2). 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.
- 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.

Volt	Tid og spenning	
	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 flytskjema 2). 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 (destillert vann) i 20 min. Skift vannet hyppig for raskere avfarging. De mørkeblå DNA-båndene vil etter hvert bli synlige mot den lyseblå bakgrunnen. **Tips:** Avfargingen går fortere dersom avfargingsløsningen er 37 °C.
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 flytskjema 2). 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.

Laboratoriesikkerhet

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

Resultatanalyse

1. Sammenlign DNA-profilene (de genetiske fingeravtrykkene) til de to mistenkte personene (mistenkt 1: brønn 4 og 5, mistenkt 2: brønn 7 og 8) med profilen til DNAet fra åstedet (brønn 2 og 3). Hvem av de mistenkte har en DNA-profil som matcher den til DNA-sporet fra åstedet? Betyr dette nødvendigvis at den mistenkte har begått den kriminelle handlingen?
2. Hvilke eksperimentelle problemer kan føre til at resultatene er ugyldige?
3. Diskusjonsspørsmål: kunne man skilt de tre DNA-prøvene fra hverandre dersom bare enzym 1 hadde blitt brukt?