

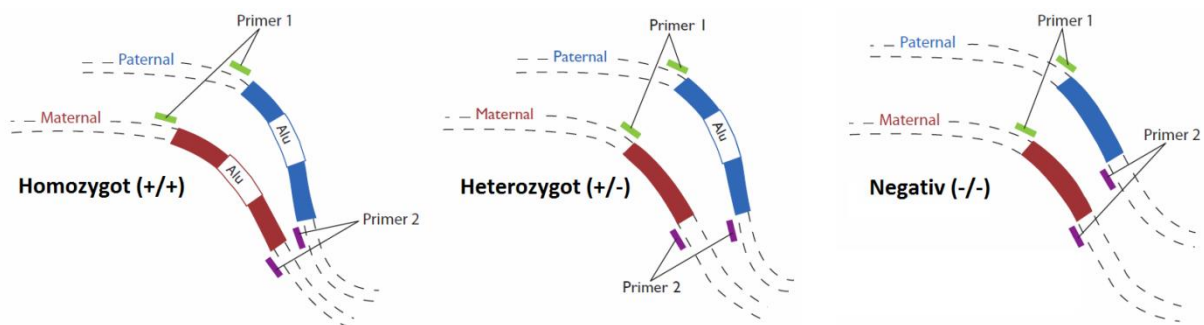
PCR-BASERT ANALYSE AV DNA-PROFILER

Hensikt

Hensikten med forsøket er å se hvordan DNA isoleres samt hvordan det kan brukes videre i DNA-profilering ved å bruke PCR og agarosegelelektroforese til å sammenligne polymorfismer i DNA hos ulike individer.

Bakgrunn

Det humane genomet består av 2,9 milliarder basepar DNA og kun 5 % utgjør protein-kodende gener. Resten består i ikke-kodende DNA som omfatter blant annet genregulatoriske sekvenser, ribosomalt RNA og tRNA. Enkelte ikke-kodende sekvenser er i stand til å replikere seg selv og sette seg inn andre steder i genomet slik at de er repetert mange hundre eller tusen ganger. Disse sekvensene kalles repetitivt eller parasittisk DNA, og funksjonen er ukjent. En slik repetitiv DNA-sekvens er det 300 bp store Alu-elementet. Kopier av Alu-elementet finnes spredt rundt i genomet, og enkelte av Alu-elementene er polymorfe, dvs. at elementet kan være enten tilstede eller ikke et bestemt sted i genomet. Slike forskjeller i DNA-sekvenser mellom individer kalles polymorfismer. I dette forsøket isolerer elevene sitt eget DNA fra kinnceller og benytter PCR til å kopiere opp en spesifikk DNA-sekvens (PV92-lokuset på kromosom 16) som inneholder en Alu-elementpolymorfisme. PCR-produktene analyseres ved elektroforese og elevene fastslår om de er homozygote (+/+), heterozygote (+/-) eller negative (-/-) for innsettingen av Alu-elementet i dette lokuset.



Figur 1. Skjematisk fremstilling av PV92-lokuset på kromosom 16. De forskjellige mulighetene for innsetting av Alu-elementet i dette lokuset er vist.

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

I den engelske veiledningen er det beskrevet to alternative fremgangsmåter for å isolere DNA, fra kinnceller og fra hår. Her har vi valgt å oversette fremgangsmåten for DNA-isolasjon fra kinnceller, som i mange tilfeller gir bedre utbytte. Dersom du i stedet ønsker å isolere DNA fra hårceller finner du fremgangsmåten i den engelske veiledningen.

Utstyr

Medfølgende innhold: PCR EdvoBeads, konsentrert primer mix, 200 bp DNA-standard, konsentrert kontroll-DNA, TE-buffer, Proteinase K, agarose, konsentrert elektroforesebuffer (50x TAE), 10x Gel loading solution, konsentrert FlashBlue DNA-farge (25x), 15 ml sentrifugerør, 1,5 ml mikrosentrifugerør, 0,2 ml PCR-rør, plastikkbegre, salt, vokskuler. Forsøkssettet inneholder materialer til 25 elever.

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

Rør	Innhold	Oppbevaring
A	Rør med PCR EdvoBeads (dNTP mix, <i>Taq</i> DNA polymerase-buffer, <i>Taq</i> DNA polymerase, MgCl ₂ , reaksjonsbuffer)	Romtemperatur
B	PV92 primer mix (konsentrert)	- 20 °C
C	200 bp DNA-standard	- 20 °C
D	Kontroll-DNA (konsentrert)	- 20 °C
E	TE-buffer	- 20 °C
F	Proteinase K	Romtemperatur

Nødvendig tilleggsutstyr (foreslåtte varenumre i parentes): sentrifuge (0678.50), mikropipetter (0144.05) og pipettespisser (0144.31), vannbad (55 °C (0666.02) og 99 °C (evt. termostatblokk 0666.50)), PCR-maskin (5442.00), elektroforesekar (5441.50/5441.60/5441.65), spenningskilde (5441.22/5441.24), vekt (1028.90), erlenmeyerkolbe 250 ml (0079.10), målesylindre (0118.20, 0118.21, 0118.24)/pipettefyller og pipetter (0153.30, 0140.84), mikrobølgeovn/ kokeplate (0668.10), destillert vann (8903.00-6), is/ kjølespann (0676.00).

Anbefalt tilleggsutstyr (foreslåtte varenumre i parentes): Hansker (0860.46-49), mikrosentrifuge (0677.00), reagensrørrister (0657.90), lysplate (5444.20).

Forberedelser

Del 1: Isolasjon av DNA fra kinnceller

Sett to vannbad/termostatblokker på hhv. 55 °C og 99 °C.

Fortynning og alikvotering av saltløsning

1. Løs alle 8 posene med salt i 500 ml drikkevann. Bland godt.
2. Alikvoter 10 ml saltløsning i plastbegre – ett beger til hver enkelt elev.



Fortynning og alikvotering av lysisbuffer (utføres tidligst 1 time før forsøket)

1. Tilsett 100 µl TE-buffer (rør E) til røret med Proteinase K (rør F) og la stå i 5-10 minutter slik at Proteinase K løser seg. Pipetter opp og ned flere ganger for å blande godt når alt er løst.
2. Merk et 15 ml rør «Lysisbuffer» og tilsett 4 ml TE-buffer til røret. Overfør deretter hele volumet med Proteinase K løst i TE-buffer til røret. Sett på korken og snu opp-ned flere ganger for å blande.
3. Alikvoter 300 µl lysisbuffer i merkede 1,5 ml mikrosentrifugerør – ett rør til hver elevgruppe med to elever.

Del 2: PCR-amplifikasjon

Fortynning og alikvotering av PV92 primer mix

1. Tin den konsentrerte PV92 primer mixen (rør B) på is eller i kjølespann.
2. Tilsett 1 ml TE-buffer (rør E) til røret med konsentrert PV92 primer mix (rør B). Bland godt.
3. Alikvoter 50 µl fortynnet PV92 primer mix i merkede 1,5 ml mikrosentrifugerør – ett rør til hver elevgruppe.

Fortynning og alikvotering av kontroll-DNA

Forsøkssettet inneholder nok DNA til å sette opp 4 kontrollreaksjoner. Minst en kontrollreaksjon bør settes opp pr. klasse for å få bekreftet at PCR-amplifikasjonen fungerer som planlagt.

1. Tin røret med konsentrert kontroll-DNA (rør D) på is eller i kjølespann.
2. Tilsett 20 µl TE-buffer (rør E) til røret med konsentrert kontroll-DNA. Bland godt ved å pipettere opp og ned.
3. Alikvoter 8 µl fortynnet kontroll-DNA i merkede 1,5 ml mikrosentrifugerør – ett rør til hver kontrollreaksjon.

Alikvotering av 10x gel loading solution

Alikvoter 20 µl 10x gel loading solution i merkede 1,5 ml mikrosentrifugerør – ett rør til hver elevgruppe.

Programmering av PCR-maskinen

PCR-maskinen programmeres som beskrevet i punkt 4 i delen «PCR-amplifikasjon» i elevveiledningen. Programmet ligger allerede lagret på PCR-maskinen Edvocycler fra Edvotek, programmets navn er 333. Skru på maskinen og velg program før PCR-reaksjonene settes i maskinen, lokket lukkes og programmet startes.

Del 3: Elektroforese

Støping av agarosegeler

Agarosegelene kan støpes på forhånd for å korte ned forsøksstiden. 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.

Alikvotering av 200 bp DNA-standard

På hver gel skal 30 µl 200 bp DNA-standard appliseres i en av brønnene for at man skal kunne bestemme størrelsen til de ulike PCR-produktene.

1. Alikvoter 30 µl 200 bp DNA-standard (rør C) i merkede 1,5 ml mikrosentrifugerør - ett rør til hver gel.

Forsøksstid

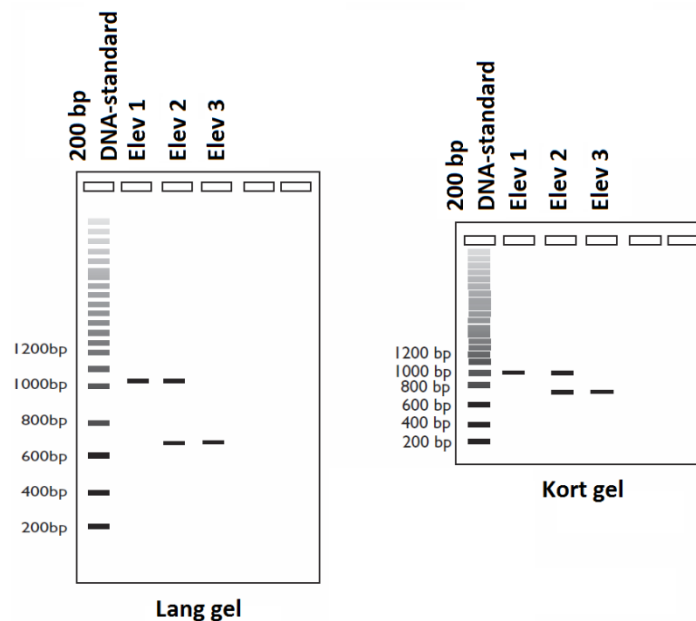
Isolasjon av DNA: ca 45-50 minutter

PCR: oppsett ca 30 minutter, PCR-amplifikasjon ca 60 minutter (eller over natt)

Elektroforese: ca 45 minutter

Resultatanalyse – fasit

1. Det er tre mulige resultater av PCR-amplifikasjonen av PV92-loket i kromosom 16. Dersom en person er homozygot for insersjon av det 300 bp store Alu-elementet i dette lokuset vil man se ett enkelt 1000 bp bånd. Heterozygote personer har innsatt Alu-elementet kun i den ene homologen av kromosom 16, og man vil derfor se to bånd på hhv. 700 bp og 1000 bp i gelen. Hos personer som ikke har Alu-elementet innsatt i PV92-loket vil man se ett bånd på 700 bp. Se Figur 2 under for skjematisk fremstilling av de tre mulige resultatene.



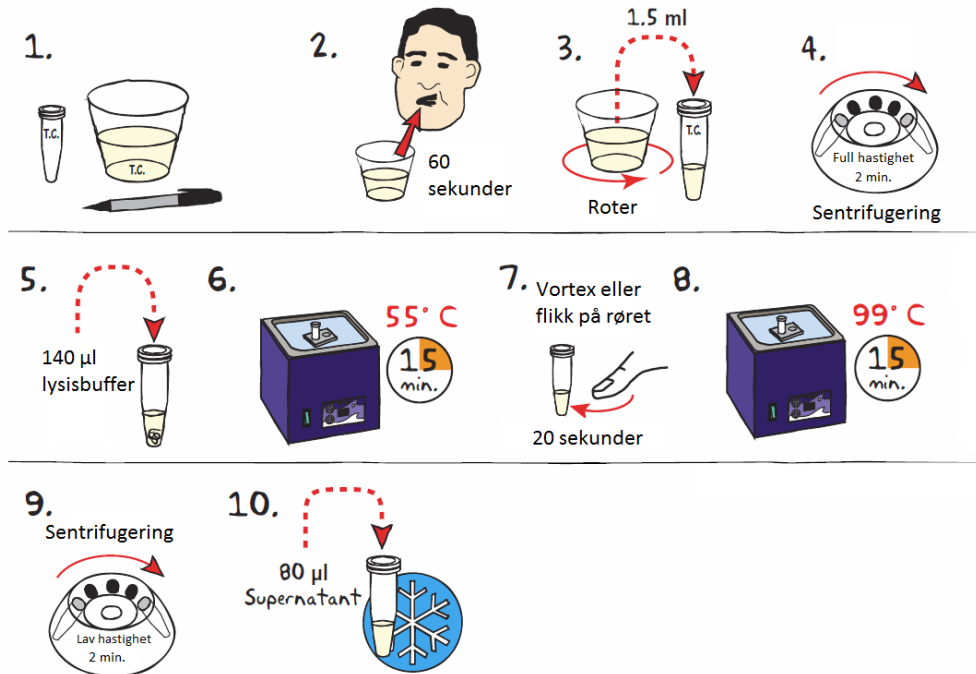
Figur 2. Skjematiske resultatbilde. Gelene viser de tre mulighetene av PCR-produkter fra ulike genotyper. Elev 1 er homozygot (+/+) for Alu-insersjon i PV92-loket, elev 2 er heterozygot (+/-) og elev 3 er negativ (-/-) for Alu-insersjon.

NB! Man kan også se diffuse, bånd med lav molekylvekt lenger ned på gelen enn 200 bp-fragmentet i DNA-standard. Dette er PCR-artefakter som kan ses bort fra. På gelen kan man eventuelt også se andre, mindre bånd som skyldes uspesifikk binding av primerne til andre områder i DNA enn PV92-loket og kopiering av disse sekvensene.

ELEVVEILEDNING – PCR-BASERT ANALYSE AV DNA-PROFILER

Utførelse

Isolasjon av DNA fra kinnceller

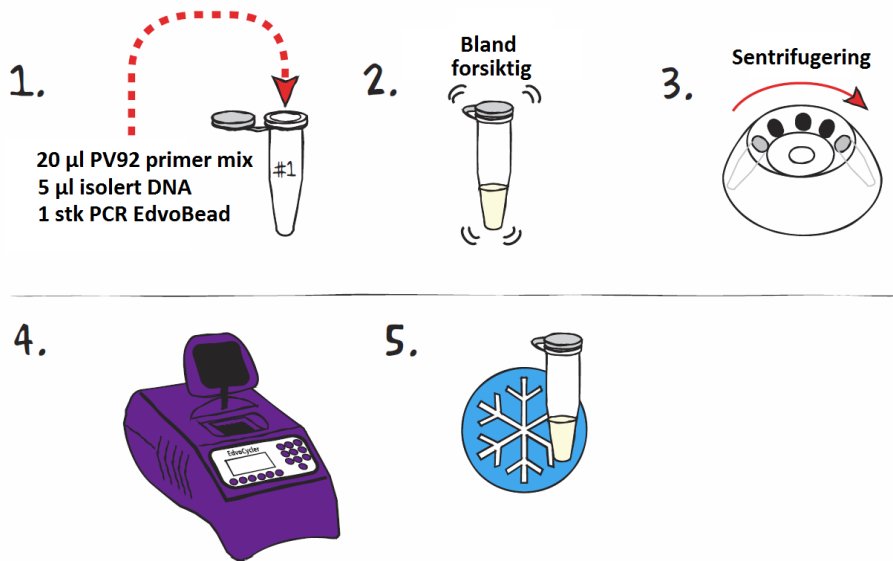


1. Merk et 1,5 ml rør med skrukork og et plastbeger med navn og labgruppe.
2. Rens/skyll munnen godt med 10 ml saltløsning i 60 sekunder og spytt løsningen tilbake i plastbegeret.
3. Roter plastbegeret forsiktig for å fordele cellene jevnt i løsningen og overfør 1,5 ml til det merkede røret.
4. Sentrifuger celleduspensjonen (løsningen) i 2 minutter ved full hastighet (helst 14000 rpm) slik at cellene samler seg i bunnen av røret. Hvis sentrifugen ikke når 14000 rpm, spinn på max hastighet i 4 min. Hell av supernatanten uten å ødelegge pelleten (celle-ansamlingen). Gjenta trinn 3 og 4 to eller flere ganger til pelleten er på størrelse med et fyrstikkhode.
5. Resuspender cellene i 140 µl lysisbuffer ved å pipettere opp og ned eller benytte en reagensrørrister/vortexer.
6. Sett på korken og inkuber prøven i et 55 °C vannbad i 15 minutter.
7. Bland prøven godt ved å flikke kraftig på røret med fingeren i 20 sekunder.
8. Inkuber prøven i et 99 °C vannbad i 15 minutter.
9. Sentrifuger cellelysatet i 2 minutter ved lav hastighet (6000 rpm).
10. Overfør 80 µl av supernatanten til et rent, merket mikrosentrifugerør og sett røret på is.

VALGFRITT STOPP-PUNKT:

Isolert DNA kan lagres ved -20 °C og PCR kan utføres på et senere tidspunkt.

PCR-amplifikasjon



1. Merk et 0,2 ml PCR-rør og tilsett følgende reagenser i nevnte rekkefølge:

Volum/mengde	Reagens	Beskrivelse/kommentar
20 µl	PV92 primer mix	Forward og reverse primere
5 µl	Isolert DNA (eller kontroll-DNA)	
1 stk	PCR EdvoBead	Inneholder dNTP mix, <i>Taq</i> DNA polymerase, <i>Taq</i> DNA polymerase-buffer, MgCl ₂ og reaksjonsbuffer

Bland godt og sørg for at PCR EdvoBead er løst fullstendig opp. Dersom du også skal sette opp en kontroll-reaksjon gjøres dette i et separat rør der kontroll-DNA tilsettes i stedet for isolert DNA.

2. Sentrifuger kort for å samle hele reaksjonsblandingen i bunnen av røret.
3. Kun dersom PCR-maskinen ikke har oppvarmet lokk eller PCR-vannbad benyttes: legg en vokskule over reaksjonsblandingen for å hindre fordamping. Se videre beskrivelse i den engelske veiledningen.
4. Overfør røret til PCR-maskinen og amplifiser DNA-sekvensen PV92 ved følgende program:
 - Innledende denaturering ved 94 °C i 5 min
 - 32 sykler av følgende tre trinn:
 - Denaturering: 94 °C i 30 sekunder
 - Annealing: 65 °C i 30 sekunder
 - Ekstensjon: 72 °C i 60 sekunder
 - Avsluttende ekstensjon ved 72 °C i 4 min
5. Tilsett 5 µl 10x gel loading solution til hvert rør og bland godt.

VALGFRITT STOPP-PUNKT:

PCR-prøvene kan lagres ved -20 °C etter amplifikasjon (eller i PCR-maskinen til neste dag dersom den er programmert til å holde 4°C etter endt program) og elektroforese kan utføres senere.

Støping av 1,5 % agarosegeler

1. Sett et gelkar i støpekammeret eller forsegl karet med endestykker/tape og sett i en kam med 6 tenner (se punkt 1 i flytskjemaet). Vei inn 0,75 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 1,5 % 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.
3. 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

1. Fjern endestykkene/tapen på gelkaret og legg gelen i elektroforesekaret slik at brønnene er nærmest den negative (svarte) elektroden. 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.
2. Sentrifuger prøvene kort eller dunk dem lett mot bordplaten for å samle hele volumet nederst i røret. Appliser hele volumet (30 µl) av prøven i brønnen på gelen. 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. Bruk Tabell 1 på neste side for å notere i hvilken brønn du har applisert din prøve.

Tabell 1. Oversikt over prøvene på gelen.

Brønn	Beskrivelse	Navn på prøve
1	200 bp DNA-standard	
2	Kontroll-DNA	
3	Elev 1	
4	Elev 2	
5	Elev 3	
6	Elev 4	

Elektroforese

1. Sett lokket på elektroforesekaret og koble til spenningskilden. Kjør gelen på 70-125 V i 30-60 min. Tiden det tar å separere DNA-molekylene avhenger av spenningen og størrelsen på elektroforeseapparatet. Se Tabell 2 på neste side 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. La fargestoffene migrere 3-4 cm vekk fra brønnene.
2. 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.

Tid og spenning		
Volt	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. 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 i 20 min. Skift vannet hyppig for raskere avfarging. De mørkeblå DNA-båndene vil etter hvert bli synlige mot den lyseblå bakgrunnen.
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. 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 forseglett plastpose med litt elektroforesebuffer.

Laboratoriesikkerhet

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

Avfallshåndtering

Geler og plastavfall kan kastes i restavfallet. Elektroforesebufferen (1x TAE-buffer) kan helles ut i vasken. Skyll godt med vann etterpå.

Resultatanalyse

Bestem din Alu-genotype og sammenlign med den til dine klassekamerater. Hadde noen samme resultat? Hvis ja, kan du gi noen mulige forklaringer?