



Är vi lika eller olika?

- undersökning av markören D1S80 hos människa

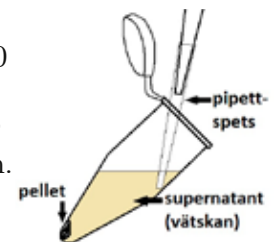


Syftet med laborationen är att du får prova på gentekniska metoder för att ta fram information om genetiska likheter och skillnader mellan olika individer. Den del av arvsmassan som studeras är en del på kromosom 1 som kallas D1S80. Det finns mer än 27 olika alleler för D1S80. Allelerna skiljer sig åt i längd: de kortaste är 370 baspar (bp) medan de längsta är över 800 bp. Längdskillnad gör att vi kan studera de olika allelerna med hjälp av gelelektrofores som separerar DNA-bitar utifrån deras storlek. Du utgår från ditt eget DNA och genomför följande steg:

- Extraktion av DNA från munceller
- PCR för att kopiera D1S80-området
- Gelelektrofores för att studera individernas genotyper

Extraktion av DNA från munceller

1. Svälj en gång innan munsköljning för att bli av med överskottssaliv. Skölj munnen med ca 1 msk 0,9% NaCl-lösning (täcker botten i en engångsmugg). Skrapa med tändarna mot kindens insida under sköljningen för att frigöra munceller. Skrapa ev. med en tändsticka på insidan av kinderna. Så många som möjligt av dina egna celler ska blandas med saltlösningen. Spotta ut saltlösningen med saliv och munceller (= **cellsuspension**) i engångsmuggen.
2. Skaka muggen så att cellerna blandas ordentligt. Använd automatpipett (OBS! Ta en ny spets till automatpipetten!) och pipettera 1000 µl av cellsuspensionen till ett **eppendorfrör**.
3. Placera ditt rör i en **eppendorfcentrifug** och se till att det sitter ett rör mitt emot ditt rör (balansera centrifugen). Centrifugera cellsuspensionen 1 minut på 10000 rpm. När röret som är lite vinklat snurras runt i maskinen kommer cellerna att "tryckas ut" mot botten av röret och bilda en liten klump (= pellet). Håll av eller sug med automatpipett försiktigt upp och kasta **supernatanten** i engångsbägaren. Var försiktig så att inte **pelleten** rörs upp. En liten volym saltlösning ska finnas kvar i röret. Celler med DNA finns i pelleten.
4. Blanda om cellerna i den kvarvarande saltlösningen genom att pipettera upp och ned (suga upp/ned). Om det behövs, tillsätt 30µl saltlösning för att underlätta att cellerna löser upp sig.
5. Tillsätt 100 µl Chelex-blandning till cellsuspensionen med **engångspipett**. Använd pipettens markering för 0.1 ml eller om läraren markerat nivån. Chelex-kulorna ska vara ordentligt uppblandade i vätskan när du suger upp (de sjunker lätt till botten). Sug upp och ned ett par gånger för att blanda om och kontrollera att Chelex-kulorna följer med vid pipetteringen.
6. Använd en **vortexapparat** för att blanda cellerna med Chelex. Alternativt knacka röret mot bänken upprepade gånger. Håll upp röret mot ljuset och se till att det inte finns några synliga cellklumpar kvar. *Detta moment är mycket viktigt.* Chelex adsorberar de föroreningar som kan störa PCR-reaktionen som ska göras senare.
7. Inkubera (=låt vila) provet i kokande vattenbad under 10 minuter. Nu förstörs membraner och DNA frigörs från proteiner med hjälp av värme och Chelex. Ta upp provet ur vattenbadet med hjälp av en pincett och kyl det på is under en minut.
8. Skaka röret så att innehållet blandas. Centrifugera 1 minut på 10000 rpm (OBS! Balansera centrifugen med ett motviktsrör!). Chelex-kulor och rester av cellmembran mm bildar nu en pellet i botten av röret. Nu är det alltså vätskan i supernatanten som innehåller DNA. För över 30 µl av supernatanten till ett nytt eppendorfrör, som du märkt med ditt namn. OBS! Inga Chelex-kulor får följa med, det stör PCR-reaktionen!
9. Förvara ditt prov på is eller i en frys tills du kan genomföra PCR.



Den beskrivna laborationen är utprovad och bearbetad av Mia Pontoppidan (lektor i biologi) och Åsa Steinholz (institutionstekniker) vid Katedralskolan i Uppsala. Ammie Berglund har sammanställt laborationsinstruktionen i detta format.





PCR (Polymerase Chain Reaction)

1. Ta ett 0,2 ml PCR-rör och tillsätt 25µl REDTaq ReadyMix (volymen kan halveras till 12,5µl). Gör en märkning på rörets lock och sida med märkpenna så att du känner igen ditt rör.
2. Tillsätt 2 µl Forward primer till ditt PCR-rör.
3. Tillsätt 2 µl Reverse primer till ditt PCR-rör.
4. Tillsätt 2,5 µl DNA-extrakt (dvs från det eppendorfrör där du förvarar ditt DNA).
5. Tillsätt 18,5 µl nukleasfritt vatten (vid halvering av REDTaq-mixen tillsätts 6 µl).
6. Knacka röret i bordet eller centrifugera för att blanda och samla allt på botten av röret.
7. Placera ditt rör i en PCR-maskin och starta PCR-programmet (görs av läraren).

Vad händer nu?

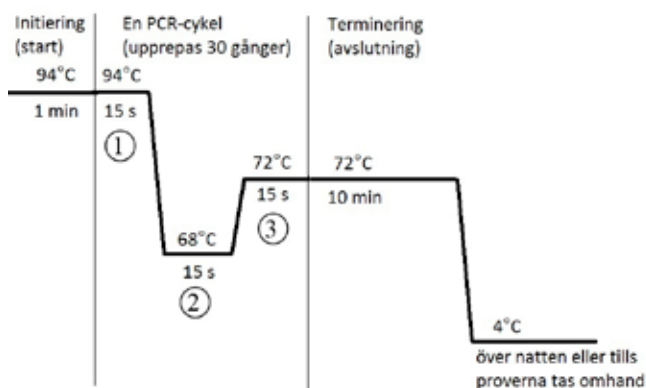
PCR-maskinen används för att kopiera upp en liten del av DNA. Genom att använd sk. **primers** som specifikt fäster till området före (forward) och efter (reverse) D1S80-området kommer endast detta område kopieras. Sekvensen för de primers som används ser du här:

Forward primer:

5'GAACTGGCCTCCAAACACTGCCCGCCG 3'

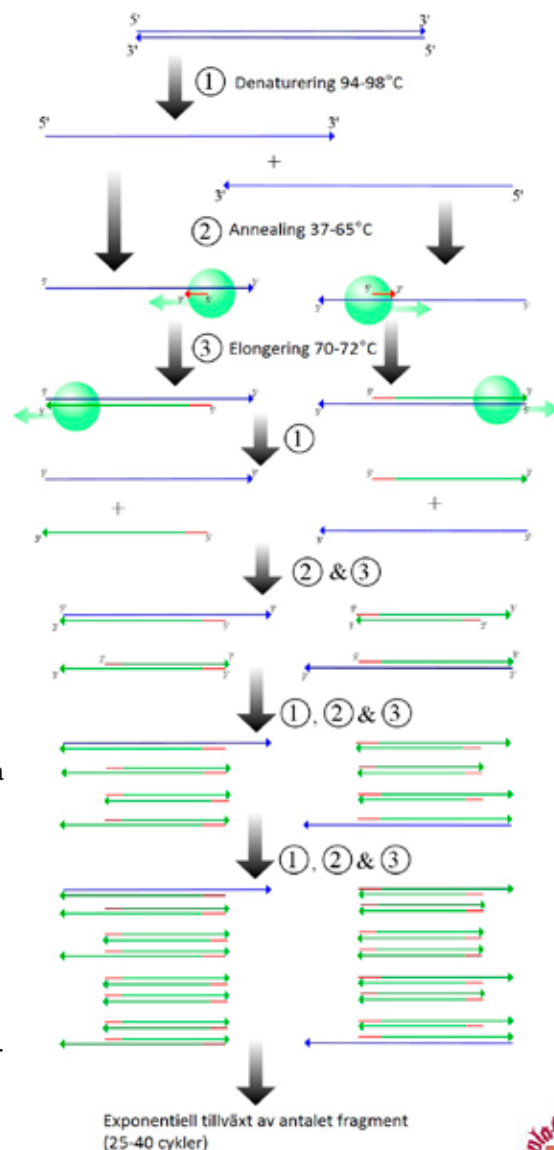
Reverse primer:

5'GTCTTGTTGGAGATGCACGTGCCCCTTGC 3'



Maskinen höjer och sänker temperaturen om och om igen. Vid höjning av temperaturen (denaturering) bryts vätebindningarna mellan basparen och vi får enkelsträngat DNA. När temperaturen sänks fäster primers där de matchar det enkelsträngade DNA (annealing). När temperaturen höjst till 72 grader arbetar det tillsatta enzymet *taq*DNA-polymeras med att bygga klart en matchande kopia av DNA med primer som startbit (elongering).

För varje temperaturcykel fördubblas mängden DNA. Efter 20-30 cykler har vi miljontals med DNA-bitar. Området D1S80 varierar i längd beroende på ett avsnitt på 16 bp som upprepas olika antal gånger. Denna del av DNA kodar inte för något protein och går därför inte att koppla till någon speciell egenskap. Längdskillnaderna kan jämföras med hjälp av gelelektrofores.

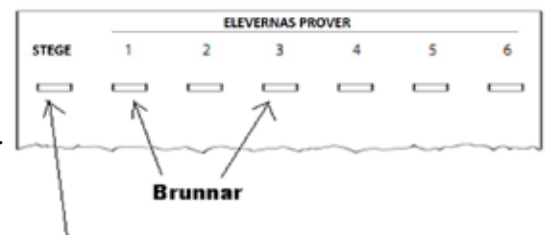




Gelelektrofores

Varje D1S80-allel har en speciell längd. Du bär antingen på två lika långa alleler (homozygot) eller två alleler med olika längder (heterozygot). Hur ska vi kunna se vilka längder vi har på våra ”DNA-snuttar”? Jo, genom gelelektrofores kan vi sortera och studera detta! Gelen som används är gjord av agaros (2%) och en stabil pH-buffert.

1. Ta fram ditt PCR-rör som nu förhoppningsvis innehåller miljontals kopior av en speciell del av ditt DNA. Detta är din PCR-produkt. Vätskan är rödfärgad eftersom man har tillsatt en sk. laddningsfärg som gör det lättare att se ditt prov under gelelektroforesen. Provet innehåller också ämnen som ger en hög densitet som gör det lättare att ladda provet i hålen (brunnarna) i gelen, samt en buffert som gör att DNA hålls negativt laddat.
2. Välj en automatpipett som du ställer på 15 µl eller enligt lärarens instruktion.
3. Ladda ditt prov på gelen så här: sug upp 15 µl av din PCR-produkt. Hitta en ledig brunn (ett fyrkantigt hål) på gelen. För försiktigt ned spetsen mot brunnens kant och töm FÖRSIKTIGT ditt prov som nu ska sjunka ned i brunnens (=hållet). Notera noga vilken brunn du tagit i protokollet som följer med gelen.
4. Läraren laddar ett referensprov i en brunn som består av en blandning av DNA-bitar av kända storlekar, en sk DNA-stege (storleksmarkör; 5 µl EzLoad marker 100-1000 bp).



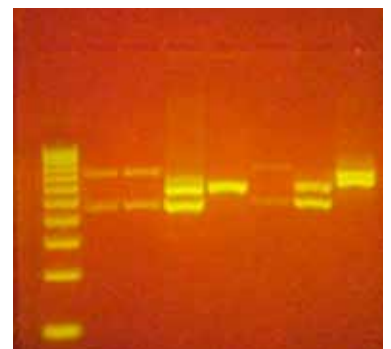
Här tillsätts en storleksstandard ("stege": blandning med färdiga DNA-snuttar med kända olika längder i enheten bp = baspar)

Vad händer nu?

Gelen placeras i en elektroforesapparat. En buffert med stabilt pH (TAE-buffert, se recept i "D1S80 - Praktiska tips för lärare") tillsätts så att det täcker gelen. Gelen körs genom att man kopplar en spänning över gelen. Negativt laddade molekyler vandrar mot pluspolen. Små molekyler vandrar snabbt och hinner längre än större molekyler.

Gelen är som ett nätverk av långa trådar som molekylerna måste passera igenom. Stora molekyler trasslar in sig mer i nätverket och kommer att röra sig långsammare än korta molekyler. För att kunna se hur långt DNA-molekylerna vandrat i gelen måste man färga. Vi använder ett ämne som binder till DNA och som ger ifrån sig en färg då man lyser med ljus av en viss våglängd på gelen. GelGreen och GelRed är två vanliga färger som inte är giftiga. De kan tillsättas när man gjuter gelen.

När man belyser syns DNA. Man använder 302 eller 312 nm UV-ljus för Gel Red och 254 nm UV eller 500 nm (blått ljus) för GelGreen. OBS! Tänk på att skydda ögonen. Exempel på resultat ser du i bilden intill. Bilden är tagen med vanlig digitalkamera och anledningen till att det blir en orange ton i bilden är att det ljusbord som använts med blått ljus har ett skyddsfilt med orangefärgad plast. Proven har laddats i övre delen av figuren. Ett ljusstreck kallas för ett band. Vad består ett band av? DNA-molekyler av samma storlek ligger på samma avstånd från startbrunnen. Det som kallas "stege" är en storleksmarkör hjälper oss att få koll på hur långa DNA-molekyler vi har i våra prover (enhet bp = baspar).



För att analysera kopplingen mellan bandens placering och längden på DNA-fragmenten kan man använda linjär regression och arbeta i programmet Microsoft Excel. Mer information om hur du gör detta går att hitta på Bioresurs hemsida i anslutning till Bi-lagan nr 3 2013.



Gelgjutning

1. Gör iordning gelträget. I vissa elektroforesutrustningar placeras träget i utrustningen. I andra gjuts gelen separat. Sätt i den kam du ska använda för att göra brunnar.
2. Väg upp 2 g agaros. Till 100 ml 1x TAE-buffert (se recept i "Praktiska tips") ger detta en 2%-ig gel.
3. Mät upp 100 mL 1x TAE-buffert (se nedan) i en 250 ml ekolv.
4. Tillsätt agaros till ekolven med buffert, blanda om genom att svirla kolven.
5. Koka upp i mikrovågsugn. OBS! Se upp så att det inte kokar över. Låt stå på bänk en liten stund medan du gör nästa punkt (kan svalna till ca 60 grader).
6. Använd automatpipett och sug upp 10 µl GelGreen eller GelRed (10.000x koncentration). Detta ger en spädningsfaktor på 1:10000 i gelen.
7. Tillsätt GelRed till den varma agaroslösningen. Blanda om genom att svinga/snurra/svirla ekolven.
8. Håll försiktigt i den varma agaroslösningen i gelträget.
9. Låt stelna (tar ca 20 minuter i rumstemperatur).

Körning av gel

Man kan köra gelen med ca 5-15 V spänning/cm gel. För att minska risk för att gelen blir varm kan man hålla elektroforesbufferten ("körningsbufferten") och gelen i kylskåp innan man kör.

Exempel: en gel som är 12 cm lång som ska köras med 10 V/cm motsvarar att man ställer in spänningsaggregatet på 120 V. Är gelen istället 14 cm lång så kan vi ställa in spänningsaggregatet på 140 V.

Körtiden anpassas så att den röda färgen (ingår i REDTaq PCR-mix) vandrar mot änden av gelen. Den röda färgen motsvarar i storlek DNA-fragment av storleken 125 bp (1% agarosgeler) eller ca 300 bp (2% agarosgel).

Referenser: PCR-laborationer med D1S80 finns beskrivna på flera engelskspråkiga internetsidor, exempelvis www.babec.org/files/PCR_2012/D1S80_PCR_Student_Guide_2012.pdf eller sök på "classroom ready protocol D1S80".

