



Lärohandledning

Är vi lika eller olika?

– undersökning av markören D1S80 hos människa
 Med gentekniska metoder kan vi få fram information om genetiska likheter och skillnader mellan olika individer. I den här laborationen studeras D1S80, en genetisk markör på kromosom 1.

Vissa delar av DNA är mycket variabla också inom en art. Sådana områden är användbara för att kartlägga den genetiska variationen både inom och mellan populationer. Begreppet genetisk markör används för ett locus (plats i DNA) som är användbart för att kartlägga genetisk variation. Hos människa är D1S80 ett exempel på en sådan markör.

För D1S80 finns en relativt stor variation och en tydlig längdskillnad på allelerna mellan individer, vilket gör att vi kan studera dem med hjälp av gelelektrofores. Bland de mer än 27 olika alleler är de kortaste 370 baspar (bp) och de längsta över 800 bp.

Syftet med laborationen är att eleverna ska få prova på några gentekniska metoder och därigenom kunna ta reda på längden av sina egna alleler för D1S80. Laborationen innehåller metoderna extraktion ur kindceller, PCR samt gelelektrofores.

Den här handledningen innehåller främst information om inköp, spädning, recept och förvaring.

Tips och information

Läs även artikeln *Lika eller olika?* i Bi-lagan nr 3 2013.

Tillhörande elevinstruktion och powerpoint finns på Bioresurs webbplats:

Resurser » Genetik » Laborationer och tillämpningar i genetik

Den beskrivna laborationen är utprovad och bearbetad av Mia Pontoppidan (lektor i biologi) och Åsa Steinholz (institutionstekniker), båda vid Katedralskolan i Uppsala. Den har sedan omarbetats och uppdaterats av Bioresurs och Peter Lillhager (biomedicinsk analytiker vid institutionen för biologisk grundutbildning) vid Uppsala universitet.

Inköp, spädning, recept och förvaring

De flesta reagensen till laborationen kan beställas från Merck (Sigma Aldrich). Om inget annat anges kommer prisexemplen därifrån (webbplatsen är på engelska men priserna på svenska) men det kan ibland vara billigare att beställa från andra leverantörer. Längst bak i dokumentet finns en materiallista.

PCR-kit

REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix inklusive laddningsfärg och separat rör med nukleasfritt vatten. Förvaras i frys (-20 °C).

- 100 reaktioner (Art.nr R2523-100RXN). Pris: 2 120 kr exkl. moms
- 20 reaktioner (Art.nr R2523-20RXN). Pris: 623 kr exkl. moms

Chelexkolor

Chelex 100 sodium form. Chelex blandas till 10 % med 0,050 M Tris pH 11 (ställ pH med NaOH). Förvaras i rumstemperatur.

- 25 g (Art.nr C7901-25G). Pris: 1 100 kr exkl. moms.

Primers

Primers kan beställas från många olika företag. Beställningsexemplet nedan är från Merck (Sigma-Aldrich) och deras webbsida med rubriken *DNA Oligos In Tubes*.

Forward primer:

5'GAAACTGGCCTCCAAACACTGCCCGCCG 3'

Reverse primer:

5'GTCTTGTGGAGATGCACGTGCCCTTGC 3'

Knappa in sekvensen för den primer du vill ha, välj minsta mängd DNA (0,025 µmol) och klicka i antalet portioner (*Tubes Per Oligo*), exempelvis 5 rör. Ett rör räcker till cirka 160 reaktioner (160 elever, eftersom alla använder sitt eget DNA). Priset för primers (5 x 0,025 µmol) beror på primerlängden men ligger på cirka 100–150 kr exkl. moms.

Det är enklast att beställa primers i lösning, *In Solution (TE)*, med koncentrationen 100 µM, så får man en färdig stocklösning. Primers i TE-buffert kan förvaras länge, flera år i frysen (-20 °C), men man ska undvika att tina och frysa om dem upprepade gånger. Dela därför upp stocklösningen i portioner när den ska användas (se nästa sida).

Ett annat alternativ är att beställa frystorkad primer. I frystorkad form är hållbarheten ännu längre. När man då späder sin primer för första gången gör man själv en stocklösning med koncentrationen 100 µM. Använd TE-buffert (10 mM Tris, pH 7.5–7.9, 1 mM EDTA). Det går också att beställa en stamlösning av TE-bufferten om man inte vill göra den själv.

- *Tris* 500 g (Art.nr GE17-1321-01). Pris: 850 kr exkl. moms
- *EDTA* 250 g (Art.nr E5134-250G). Pris: 993 kr exkl. moms
- Stamlösning: *Tris-EDTA buffer solution* 100 ml (Art.nr T9285-100ML). Pris: 530 kr exkl. moms

Bilden är en skärmdump från webbsidan *DNA Oligos In Tubes*, www.sigmaaldrich.com/SE/en/configurators/tube?product=standard

Primers levereras med ett produktblad (*Technical Datasheet*) med information om plasmiderna (se nedan). Längst ut till höger står den volym av respektive primer som finns i röret.

Spädning av primers

Vid det första tillfället man tinar stocklösningen bör den delas upp i mindre portioner, för undvika upprepade upptiningar och infrysningar. Portionera upp 10 µl i varje rör (100 µM) och frys in de rör som inte ska användas. När det är dags att köra laborationen ska stocklösningen spädas ytterligare, nu med sterilt destillerat vatten för att få 10 µM (10 pmol/µl).

Om man har 30 elever kommer det gå åt $2 * 30 = 60$ µl primer av varje sort, men det är bra att ha lite extra. Ta ett rör med 10 µl stocklösning och tillsätt 90 µl sterilt destillerat vatten för att bereda 100 µl med koncentrationen 10 µM. Detta kan fördelas på några olika rör så att eleverna kan pipettera vid flera stationer/platser. Det kan också göras någon dag före laborationen och förvaras i frys.

I den PCR-mix vi använder ska man till en reaktion ha en primerkoncentration i intervallet 0,1–1,0 µM (10–20 pmol/reaktion)

Batch #	Oligo Name	Oligo #	Len	Pur	Scale	MW	Tm°	µg/OD	OD	µg	nmol	Epsilon 1/(mMcm)	Dime	2ndry	GC %	µl for 100µM	Sequence(5'-3')
HA15165238	D1S80A	8817548416-000010	28	DST	0.025	8488	83.2	33.2	2.91	96.8	11.4	255.3	No	Moderate	64.2	N/A	GAAACTGGCCCTCCAAACACTGCCCGCCG 114µl/100µM/
HA15165239	D1S80B	8817548416-000020	29	DST	0.025	8892	80.8	34.1	2.58	88.2	9.9	260.5	No	Weak	58.6	N/A	GTCTTGTGGAGATGCACGTGCCCTTGC 99µl/100µM/

I primer-produktbladet står det vilken volym TE-buffert (µl) som är tillsatt till varje primer för att få en koncentration på 100 µM. Till exempel är stocklösningen med primern D1S80B gjord genom att tillsätta 99 µl TE-buffert till 9,9 nmol primer.

DNA-stege/storleksmarkör

DNA-stege finns att köpa på Fisher Scientific (även här är webbplatsen på engelska men priserna på svenska). Förvaras i frys (-20°C), men kan också förvaras i kylskåp eller i rumstemperatur i upp till 6 månader och räcker till cirka 100 applikationer.

- *Thermo Scientific™ GeneRuler 100 bp DNA Ladder, ready-to-use* (Art.nr SM0243). Pris ca 670 kr.

Stegen är färdig att använda. Den är förblandad med färgämne och glycerol (*1X TriTrack DNA Loading Dye*) och kan laddas direkt på gelen. Enligt instruktionen ska man ladda 1 µl/mm gelbana (brunnens bredd), men det brukar räcka med cirka 300 ng (3 µl) stege. Blanda 3 µl stege med 2 µl GelRed/GelGreen (se nedan).

På gelen laddas 5 µl stege. Man ska undvika att ta för mycket av stegen för banden kan bli utsmetade, men vill man pipettera större volym (om det är enklare för eleverna) kan man späda med den medföljande färglösningen.

I förpackningen medföljer även en koncentrerad färglösning *6X TriTrack DNA Loading Dye* som innehåller färger och 60 % glycerol. Den finns med för att färga annat DNA, vilket inte behövs i denna laboration eftersom laddningsfärger (röda) ingår i kitet *RED-Taq ReadyMix PCR*.

GelGreen eller GelRed

GelGreen eller *GelRed* finns hos VWR, Fischer Scientific m fl. Exempelen nedan kommer från VWR (webbplats på svenska). Minsta mängd som finns att köpa är 100 µl i vatten. Pris ca 500 kr exkl. moms. GelGreen/GelRed förvaras i rumstemperatur men i mörkt utrymme (ljuskänsligt).

- *GelRed® Nucleic Acid Gel Stain; 10,000X in water, 0.1 mL* (Art.nr 41003-T)
- *GelGreen® Nucleic Acid Gel Stain; 10,000X in water, 0.1 mL* (Art.nr 41005-T)

Båda är färgämnen som binder till DNA och syns när gelen läggs på ett UV-bord. Man använder 302 eller 312 nm UV-ljus för GelRed och 254 nm UV-ljus eller 470 nm (blått ljus) för GelGreen. Tänk på att skydda ögonen. Beroende på vilken UV-apparat man har på skolan kan skyddsglasögon som skyddar mot UV-ljus behövas.

Späd GelRed 25x med destillerat vatten. Spädningsexempel: Blanda 4 µl GelRed med 96 µl vatten för att få 100 µl brukslösning. Varje elev tillsätter 2 µl till sitt DNA-prov.

Traditionellt brukar man tillsätta GelRed eller GelGreen i gelen, men det finns många fördelar med att tillsätta färgämnet i proverna istället. Färg som är tillsatt i gelen ger en ljus bakgrund samtidigt som stora fragment med mycket DNA samlar på sig mycket färg (och ger stora utsmetade band), medan små fragment med lite DNA istället syns dåligt. Dessutom tillsätts så små volymer av GelRed/GelGreen i brunnarna att gelen kan slängas i brännbart.

Buffert till gel och körningsbuffert till gelelektroforesapparaten

För att gjuta geler och som körningsbuffert fungerar en TA-buffert bra. Se texten under *Primers* för prisexempel på Tris.

Även här finns en förändring från den TAE-buffert man traditionellt brukar använda. I andra recept tillsätts EDTA till bufferten för att binda vissa positiva joner (som förhindrar att exempelvis nukleaser bryter ner DNA). Det behövs egentligen inte, så i denna beskrivning har vi tagit bort EDTA och gör en TA-buffert istället. Dels för att slippa köpa in ytterligare en kemikalie, dels för att man inte ska hålla ut EDTA i avloppet.

Tris, TE eller TA?

Flera olika buffertlösningar omnämns i den här laborationen:

- Tris-buffert till chelexkolumnerna (s. 2),
- TE-buffert (Tris och EDTA) till primers (s. 2),
- TA-buffert (Tris och ättiksyra) till geler och som körningsbuffert (s. 5).

Även TEA-buffert (Tris, ättiksyra och EDTA) beskrivs men används inte här.

Recept för 50x TA (per liter)

1. Väg upp 242 g Tris (molekylmassa = 121,14 g/mol) och lös det i ungefär 750 ml avjonat vatten.
2. Tillsätt (försiktigt!) 57,1 ml koncentrerad ättiksyra. Kontrollera och ställ pH till ungefär 8,0.
3. Justera till 1 liter med avjonat vatten. Kan förvaras i rumstemperatur.

Brukslösning i gel och buffert till gelelektroforesapparaten 1x TA

Brukslösningen 1x TA fås vid spädning av 50x TA. Ta 20 mL 50x TA och späd till 1 liter med avjonat vatten.

Gjutning och körning av gel

För att kunna gjuta en gel (1,5 %) behövs agaros och 1x TA-buffert. Prisexemplet kommer från Fischer Scientific.

- *Agarose (Broad Separation Range for DNA/RNA/Genetic Analysis Grade) Fisher BioReagents™*, 100 g. Pris: 790 kr exkl. moms.

Man kan köra gelen med ca 5–15 V spänning/cm gel. Till exempel kan en 12 cm lång gel köras med 10 V/cm, vilket motsvarar att man ställer in spänningsaggregatet på 120 V. En högre spänning, upp till ca 200 V, gör att proverna vandrar snabbare, men separeras sämre för att gelen blir varm. För att undvika det kan elektroforesbufferten ("körningsbufferten") och gelen förvaras i kylskåp innan man kör.

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

Materiel till laborationen

Per labbgrupp (2 elever)

- 2 engångsmuggar
- 2 engångsskedar
- 0,9 % natriumkloridlösning, 1 msk (15 ml)
- 2 eppendorfrör
- 1 automatpipett 1000 μ l + pipettspetsar
- 1 automatpipett 200 μ l + pipettspetsar
- 1 automatpipett 10 μ l + pipettspetsar
- chelexlösning (100 μ l/prov)
- 1 pincett
- 2 PCR-rör (0,2 ml)
- *REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix* (25 μ l/prov)
- 1 märkpenna
- *forward primer* (2 μ l/prov)
- *reverse primer* (2 μ l/prov)
- nukleasfritt vatten (18,5 μ l/prov)
- GelRed eller GelGreen (2 μ l/prov)

Övrigt

- eppendorfcentrifug
- vortexapparat
- vattenbad eller värmeblock (100 °C)
- is
- PCR-maskin
- gelelektroforesapparat
- spänningsaggregat och sladdar
- agaros till gelen (1,5 g/gel)
- 1 x TA-buffert (100 ml/gel + buffert till gelelektroforesapparaten)
- E-kolv (250 ml)
- mikrovågsugn
- referensprov/stege