

Är vi lika eller olika?

– undersökning av markören D1S80 hos människa

Syftet med laborationen är att få prova på några gentekniska metoder för att få fram information om genetiska likheter och skillnader mellan olika individer.

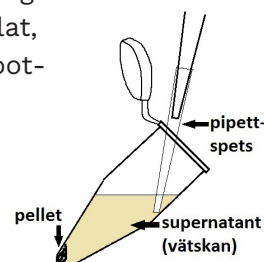
Den del av arvsmassan som studeras i laborationen finns på kromosom 1 och kallas D1S80. Denna kodar inte för något protein och går därför inte att koppla till någon speciell egenskap. Det finns mer än 27 olika alleler för D1S80 och det är längden på allelerna som skiljer sig åt, beroende på ett avsnitt på 16 baspar (bp) som upprepas olika antal gånger. De kortaste allelerna är 370 bp medan de längsta är över 800 bp. Längdskillnaden 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. Märk en engångsmugg med dina initialer. Skölj munnen med cirka 1 msk 0,9% NaCl-lösning (täcker botten i en engångsmugg). Spotta ut saltlösningen med saliv och munceller (cellsuspension) i engångsmuggen. Skrapa med skaftet av en engångssked på insidan av kinderna och doppa i cellsuspensionen. Så många som möjligt av dina egna celler ska blandas med saltlösningen. Skaka muggen så att cellerna blandas ordentligt. Använd automatpipett (OBS! Ta en ny spets till automatpipetten) och pipettera 1 000 µl av cellsuspensionen till ett märkt eppendorfrör.
2. Placera ditt rör i en eppendorfcentrifug och se till att det sitter ett rör med samma volym mitt emot ditt rör (balansera centrifugen). Centrifugera cellsuspensionen 1 minut på 10 000 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).
3. Sug med automatpipetten försiktigt upp supernatanten (vätskan ovanför pelleten), som sedan kastas 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. Byt pipettspets för att pipettera Chelex-lösningen. Chelex-kulorna ska vara ordentligt uppblandade i vätskan (de sjunker lätt till botten). Blanda genom att suga upp och ned med pipettspetsen. Kontrollera att Chelex-kulorna följer med vid pipetteringen. Om chelex-kulorna fastnar i pipettspetsen kan en engångspipett användas istället. Tillsätt cirka 100 μ l Chelex-blandning till cellsuspensionen.
5. Använd en vortexapparat för att blanda cellerna med Chelex. 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.
6. Inkubera (= låt vila) provet i ett vattenbad eller värmeblock (100 °C) under 10 minuter. Nu förstörs membraner och DNA frigörs från proteiner med hjälp av värme och Chelex. Det finns en risk att locket flyger upp och vätskan skvätter ut på grund av övertryck i röret. Det kan förhindras genom att lägga något på rören eller att värma vid 90–95 °C istället. Ta upp provet ur vattenbadet eller värmeblocket med hjälp av en pincett och kyl det på is under en minut.
7. Skaka röret så att innehållet blandas. Centrifugera 1 minut på 10 000 rpm (OBS! Balansera centrifugen med ett motviktsrör med samma volym). Chelex-kulor och rester av cellmembran med mera bildar nu en pellet i botten av röret. Nu är det alltså supernatanten (vätskan) som innehåller DNA. För över 20 μ l av supernatanten till ett nytt eppendorfrör, som du märkt med ditt namn. OBS! Inga Chelex-kulor får följa med, det stör PCR-reaktionen!
8. Förvara ditt prov på is eller i en frys tills du kan genomföra PCR.

PCR (Polymerase Chain Reaction)

1. Märk ett 0,2 ml PCR-rör. Gör en märkning med dina initialer på både rörets lock och sida med märkpenna. Byt pipettspets mellan varje pipettering.
2. Tillsätt 25 μ l REDTaq ReadyMix till ditt PCR-rör.
3. Tillsätt 2 μ l Forward primer till ditt PCR-rör.
4. Tillsätt 2 μ l Reverse primer till ditt PCR-rör.
5. Tillsätt 2,5 μ l DNA-extrakt (från det eppendorfrör där du förvarar ditt DNA).
6. Tillsätt 18,5 μ l nukleasfritt vatten.
7. Vortexa för att blanda och centrifugera en kort stund så alla små droppar hamnar på botten av röret.
8. Placera ditt rör i en PCR-maskin och skriv upp på ett papper var i PCR-maskinen du sätter ditt rör.
9. Starta PCR-programmet (görs av läraren).

Vad händer nu?

PCR-maskinen används för att amplifiera (kopiera upp) en liten del av DNA. Genom att använda så kallade primers som specifikt fäster till området före (for-

ward) och efter (reverse) D1S80-området kommer endast detta område kopieras. Sekvensen för de primers som används ser du här:

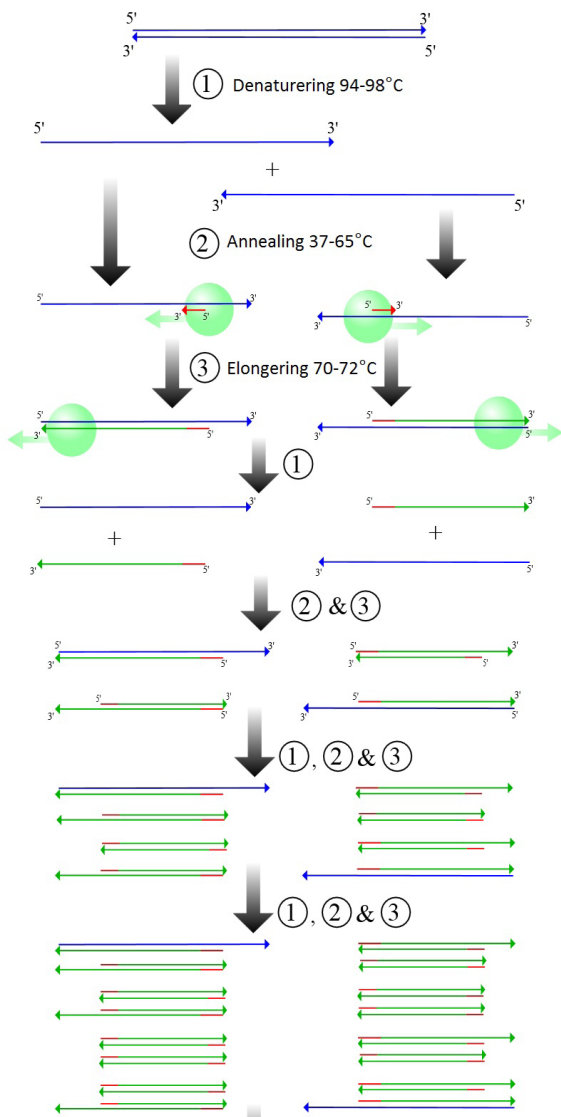
Forward primer: 5'GAACTGGCCTCCAAACTGCCCGCCG 3'

Reverse primer: 5'GTCTTGTGGAGATGCACGTGCCCTTGC 3'

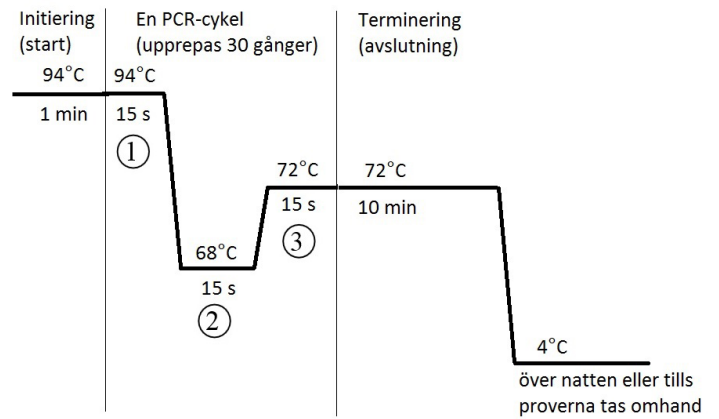
Maskinen höjer och sänker temperaturen om och om igen (se de två illustrationerna nedan). Vid höjning av temperaturen till 94 °C bryts vätebindningarna mellan basparen (denaturering) och vi får enkelsträngat DNA. När temperaturen sänks fäster primers där de matchar det enkelsträngade DNA (annealing).

När temperaturen höjts till 72 °C arbetar det tillsatta enzymet taqDNA-polymeras med att bygga klart en matchande kopia av DNA med en primer som startbit (elongering).

För varje temperaturcykel fördubblas mängden DNA. Efter 20–35 cykler har vi miljontals DNA-bitar.



Exponentiell tillväxt av antalet fragment
(25-40 cykler)



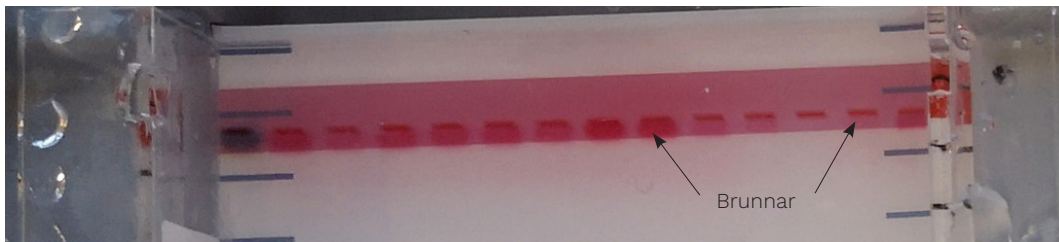
Gelelektrofores

Varje D1S80-allel har en speciell längd. Du bär antingen på två lika långa alleler (homozygot) eller två alleler med olika längder (heterozygot). Genom gelelektrofores kan vi studera vilka längder vi har på våra "DNA-bitar". Gelen som används är gjord av agaros (1,5 %) och en stabil pH-buffert. Volymen räcker till en stor gel (15x20 cm).

Gelgjutning

1. Gör iordning geltråget. I vissa elektroforesutrustningar placeras tråget i utrustningen. I andra gjuts gelen separat. Sätt i den kam du ska använda för att göra brunnar.
2. Väg upp 1,5 g agaros.
3. Mät upp 100 mL 1x TA-buffert i en 250 ml E-kolv.
4. Tillsätt agaros till E-kolven med buffert, blanda om genom att svirvla kolven. Denna blandning ger en 1,5-procentig gel.
5. Koka upp i mikrovågsugn eller på en kokplatta. OBS! Var försiktig så att det inte kokar över. Värm i 30 sekunder i taget i mikrovågsugnen. Titta hela tiden på E-kolven och stäng av mikrovågsugnen när du ser att det börjar koka. Se till att all agaros är smält. Det ska inte finnas någon fällning i lösningen.
6. Låt stå på bänk en liten stund (kan svalna till cirka 50 °C). Man ska kunna hålla i flaskan utan att bränna sig.
7. Håll försiktigt i den varma agaroslösningen i geltråget.
8. Låt stelna (tar cirka 10–20 minuter i rumstemperatur).

Under väntetiden kan ni öva på att ladda prover på en redan gjuten gel.



En gel med brunnar som använts för att öva att ladda färger på en gel.

Ladda en gel

Gelen placeras i en elektroforesapparat. En buffert med stabilt pH (TA-buffert) tillsätts så att det täcker gelen.

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 laddningsfärg som gör det lättare att se provet 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.

1. Tillsätt 2 µl GelRed till ditt PCR-rör. GelRed är en fluorescerande färg som binder till DNA.
2. Välj en automatpipett som du ställer på 15 µl eller enligt lärarens instruktion.

- 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 brunnen (= hålet). Notera noga vilken brunn du tagit och anteckna det i ett protokoll som ligger bredvid gelen.
- En av brunnarna laddas med ett referensprov som består av en blandning av DNA-bitar av kända storlekar, en så kallad DNA-stege. Blanda 2 µl gelred med 3 µl stege i ett PCR-rör. Ladda en av brunnarna med 5 µl referensprov.

Körning av gel

Gelen körs genom att man kopplar en spänning över den. Negativt laddade molekyler vandrar mot pluspolen. Små molekyler vandrar snabbt och hinner längre än större molekyler.

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.

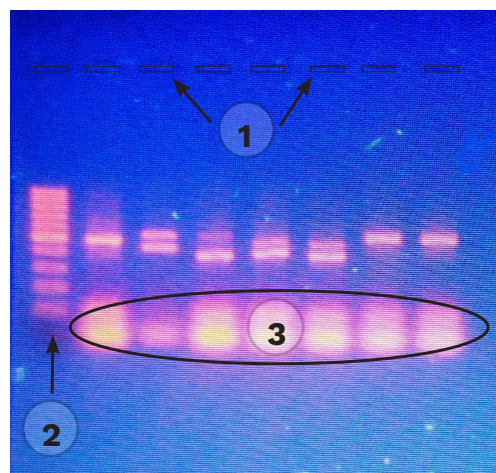
Körtiden anpassas så att den röda färgen (ingår i *REDTaq ReadyMix*) vandrar mot änden av gelen. Den röda färgen motsvarar DNA-fragment av storleken 125 bp (1 % agarosgel) eller ca 300 bp (2 % agarosgel).

Vad händer nu?

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 dem. Vi använder ett ämne som binder till DNA och som ger ifrån sig en färg då man lyser på gelen med ljus av en viss våglängd. GelGreen och GelRed är två vanliga färger som inte är giftiga. Man använder 302 eller 312 nm UV-ljus för Gel Red och 254 nm UV-ljus eller 470 nm (blått ljus) för GelGreen. OBS! Tänk på att skydda ögonen.

Exempel på resultat ser du i bilden bredvid. Bilden är tagen med vanlig mobilkamera. Proven har laddats i övre delen av figuren. Ett ljust (rosa) streck kallas för ett band. Det består av DNA-molekyler av samma storlek som därför har vandrat lika långt i gelen. Storleksmarkören längst till vänster, "stegen", är en blandning av DNA-fragment med bestämda längder. Stegen som används i det här försöket har band mellan 100–1000 bp. Längst ner i bilden finns rester av primers och "primer dimer". Det är primers som inte har fäst till DNA utan finns kvar i provet och då också syns på gelen.



En gel på ett ljusbord som fotats med en mobilkamera.

- Brunnar
- Storleksmarkör (stege)
- Rester av primers och "primer dimer"