

Genteknik med olika fall

Lärarhandledning

Gelelektrofores är en viktig teknik inom molekylärbiologi och bioteknik. I skolan kan en enklare version med färger användas för att lösa en deckargåta eller ta reda på om det finns främmande arter i en fiktiv sjö.

Bioresurs har tillsammans med lärare i Tierps kommun tagit fram ett undervisningsmaterial som ger förslag på hur en laboration med gelelektrofores kan ingå i en lektionsserie. För att sätta laborationen i ett sammanhang skapades två olika fall, en deckargåta och ett med tema främmande arter och miljöövervakning. I deckargåtan ingår även en blodgruppsbestämning med låtsasblod.

Materialet innehåller:

- Denna lärarhandledning med praktiska tips för att förbereda färger, geller och annat material till laborationen.
- Två fallbeskrivningar. En deckargåta och en om främmande arter i en sjö.
- DNA-analys med gelelektrofores – en elevinstruktion till laborationen med gelelektrofores där färger används som DNA. Instruktionen kan användas till båda fallbeskrivningarna.

Tidsåtgång: Den laborativa delen tar cirka en timme, eventuellt mer om blodgruppsbestämningen ingår. För att introducera fallen och efterarbeta resultaten behövs en lektion före och en lektion efter själva laborationstillfället.

Passar för: Åk 7-9 och gymnasiet. Laborationen är anpassad för genetik- och gentekniksundervisningen i grundskolan och naturkunskapskurserna på gymnasiet.

Mer information

Mariette Bellqvist, biologilärare vid Centralskolan; Sara Fahlén, biolog- och kemilärare vid Örbyhus skola och Anna Nordström, biolog- och naturkunskapslärare vid Högbergsskolan, Tierps kommun har tillsammans med Ammie Berglund på Bioresurs tagit fram undervisningsmaterialet.

Läs artikeln Gentekniklaboration – Mord och främmande arter som kontext i Bi-lagan nr 1 2025. Där beskrivs hur laborationerna fungerade utifrån elevutvärderingar och hur lärare och elever upplevde undervisningsmaterialet.

Två fall

Fallen som integrerar gelelektroforeslaborationen beskrivs nedan. Fallet med deckargåtan är utvecklad för högstadiееlever och fallet med främmande arter för gymnasieelever som läser Naturkunskap. Båda fallen går att anpassa till aktuell elevgrupp, men för att kunna tillgodogöra sig innehållet bör eleverna ha viss kunskap i genetik.

Deckargåtan

Det hela inleds med att ett brott har begåtts under fredagsnatten när ett stort medicinföretag hade fest. Eleverna är anställda hos Nationellt forensiskt centrum och de har fått in blod och vävnad från brottsplatsen. Proverna ska analyseras och provsvaren rapporteras till polisen i ett bifogat protokoll.

Uppgiften är uppbyggd så att eleverna både ska testa blodgrupper från brottsplatsen och köra en gel med "DNA-prover" (färger). De kan inte med säkerhet veta vem som är den skyldige innan de har svarat på frågorna på slutet.

I denna lärarhandledning är misstänkt nummer 3 den skyldige, därför fördelas färger och blodgrupper utifrån detta. Blodgruppsbestämningen visar att blodet som hittades på brottsplatsen var samma blodgrupp som hos offret och misstänkt nummer 4, vilket egentligen inte ger någon ledtråd mer än att offret och misstänkt nummer 4 har samma blodgrupp.

Gelelektroforesen visar samma bandmönster från brottsplatsen (hudskrap under offrets naglar) som för misstänkt 2 och 3. Med detta kan eleverna anta att det antagligen är någon av dem som är den skyldige. Med hjälp av en bild på ytterligare en gel (ligger sist i elevinstruktionen) kan eleverna komma fram till att det antagligen är misstänkt nummer 3 som är skyldig.

Mer information om färger och hur de kan fördelas i deckargåtan kommer under rubriken "färgprover".

Främmande arter

I fallet om främmande arter är eleverna anställda på ett företag som ska utföra en vattenanalys och rapportera provsvaren till Länsstyrelsen i ett bifogat protokoll. En person har insjuknat i akut hjärnhinneinflammation efter att ha badat i Lillsjön och man undrar om orsaken kan vara en patogen amöba, *Naegleria fowleri*. Eleverna får kontrollera DNA (färger) i vattenprover för att se om de hittar spår av amöban. Samtidigt vill Länsstyrelsen veta om det finns signalkräfta i sjön.

I uppgiften får eleverna vattenprover från fyra provtagningsplatser. Vattenproverna jämförs med referensprover för varje art. Varje referensprov är en färg. Eleverna får ladda både referensprover och vattenprover på gelen för att se vilken eller vilka arter som dyker upp i respektive vattenprov.

Innan lektionen blandar läraren till fyra vattenprover med en, två eller tre olika arter. Referensproverna innehåller en färg per art. Till exempel: Bäver (blått), amöba (lila), signalkräfta (rödbetsrött) och mört (julrött).

Mer information om färgerna finns under rubriken "färgprover".

Elektroforesapparat och kemikalier

Elektroforesapparat

Elektroforesapparater går att köpa hos många återförsäljare. Den vi har använt är Edvoteks Elektroforesapparat M12 (återförsäljare Sagitta) och en spänningskälla för två elektroforesapparater (100/200 V). I elektroforesapparaten kan två geler köras samtidigt, men vi har kört en gel per apparat. Volymerna för buffert och geler som beskrivs nedan är beräknade utifrån den här modellen.

Mikropipetter

Det går att köpa enklare pipetter med en fast volym hos flera återförsäljare. Vi har använt 25 µl pipetter som kostar cirka 175 kronor styck.

Buffert

Bufferten är en bikarbonatlösning. Lös 1 g bikarbonat (motsvarar ungefär 1 kryddmått) i 500 ml vatten (0,2 % buffertlösning). Lösningen kan förvaras i flera månader i kylskåp. En fördel med att ha den kyld är att det dämpar temperaturhöjningen som sker när man kör gelelektroforesen (men det fungerar även med rumstempererad buffert).

Buffert behövs till gelerna och som vätska i elektroforesapparaterna. Cirka 100 ml buffert räcker till att gjuta fem små geler och cirka 250 ml buffert täcker gelen i en elektroforesapparat.

Gel

Till gelerna behövs agar som finns att köpa i en vanlig mataffär. Man kan också använda agaros som går att köpa från företag som säljer kemikalier. De färdiga gelerna kan gjas i förväg och förvaras i kyl omslutna av plast (för att inte torka) någon till några dagar innan man ska köra gelelektroforesen. Om man vill gjuta övningsgeler så kan man placera flera kammar när man gjuter och sedan dela på gelerna så att man får flera smågeler med brunnar. Övningsgelerna kan förvaras i burkar med vatten och håller då flera veckor.

Väg upp 1 g agar i en 250 ml E-kolv och tillsätt 100 ml bikarbonatlösning. Volymen räcker till fem små geler (cirka 5 mm tjocklek). Värm i mikrovågsugn (eller på kokplatta) till blandningen kokar. Låt blandningen koka upp ett par gånger. Inga korn ska synas i vätskan. *OBS! Blandningen kokar lätt över. Var försiktig!* Håll koll på mikrovågsgugnen och stäng av så fort det börjar koka. Ta ut E-kolven och virvla runt vätskan på botten (använd vante eller papper för att undvika att bränna dig). Fortsätt och koka upp lösningen tills den har klarnat. Låt blandningen svalna till cirka 60 °C innan du håller den i gelformarna.

Färgprover

Färgerna är blå karamellfärg av märket Oetker, "frostingfärgerna" lila (E129/E151) och julröd (E104/E129) samt rödbetspulver (rödbetsrött, E162, betanin).

I deckargåtan blandas två färger för att få större variation mellan de misstänkta, brottsoffret och fyndet på brottsplatsen (under offrets naglar). Se bild på gelen på sida 5. I fallet med främmande arter kan två eller tre färger blandas i "vattenproverna" för att eleverna då ska hitta DNA från fler arter.

För att få tydliga band när färgerna separeras i gelen ska proverna inte innehålla för mycket färg. På nästa sida följer förslag på spädning med vatten och glycerol för att få tydliga band.



Spädning

1. Blanda till stamlösningar av blå, julröd och rödbetsrött genom att väga in 1 g och späda med 10 ml vatten. Färgen lila är stark, så den stamlösningen görs genom att väga in 0,5 g och späda med 10 ml vatten. Frostingfärgerna är mycket trögflytande och svåra att droppa, därför har vi valt att väga in färgerna istället för att mäta upp volymer. Rödbetsrött (betanin) kan köpas som pulver (rödbetspulver). OBS! Lösningar med rödbetsrött oxideras efter några dagar i rumstemperatur. Förvara i kyl, eller blanda nytt när det är dags för laboration.
2. Tillverka femtioprocentig glycerol. Exempelvis genom att späda 59 ml åttiofemprocentig glycerol till 100 ml, men det är inte viktigt att det blir en exakt procenthalt. Glycerolens funktion är att ge färgblandningen högre densitet än vatten så att proverna sjunker ned i brunnarna när man pipetterar. Åttiofemprocentig glycerol är trögflytande och svår att mäta upp. Femtioprocentig glycerol är mer lätthanterlig.
3. Gör spädningar med femtioprocentig glycerol enligt nedan för att ge lagom färgkoncentration. Volymen som eleverna laddar på gelen är 25 µl.

Enkla provlösningar (en färg)

1. Ta 0,5 ml av stamlösningen av respektive färg och späd med femtioprocentig glycerol till 10 ml. Detta motsvarar en färgkoncentration på 0,005 g/ml för alla färger utom lila som blir 0,0025 g/ml.
2. Denna provlösning kan fördelas i eppendorfrör till varje elevgrupp och användas för att ladda prover på gel.

Provlösningar där två färger blandas

1. Ta 1 ml av stamlösningen av respektive färg och späd med femtioprocentig glycerol till 10 ml. Detta motsvarar en färgkoncentration på 0,01 g/ml för alla färger utom lila som blir 0,005 g/ml.
2. Tillverka sedan blandningar genom att ta 1:1 av två olika färger från lösningarna från förra punkten. Detta ger samma slutkoncentration av färgerna som de enkla provlösningarna har.
3. Dessa blandningar kan fördelas till eppendorfrör och användas för att ladda prover på gel.

Provlösningar där tre färger blandas

1. Ta 1,5 ml av stamlösningen av respektive färg och späd med femtioprocentig glycerol till 10 ml. Detta motsvarar en färgkoncentration på 0,015 g/ml för alla färger utom lila som blir 0,0075 g/ml.
2. Tillverka sedan blandningar genom att ta 4 ml av tre olika färger från lösningarna från förra punkten. Detta ger 12 ml med samma slutkoncentration av färgerna som de enkla provlösningarna har.
3. Dessa blandningar kan fördelas till eppendorfrör och användas för att ladda prover på gel.

Resultat av olika färgblandningar

När färgerna har blandats gäller det att bestämma vilken blandning som motsvarar de misstänkta i deckargåtan eller vattenproven i fallet med främmande arter.

Nedan visas en bild på resultatet av färgblandningarna som användes i deckargåtan. Gelen kördes i 20 min med 100 V. När man stänger av strömmen till elektroforesapparaten diffunderar färgerna lätt i gelen. Vänta därför inte med att läsa av gelen utan låt eleverna rita av banden i direkt.

Observera att "frostingfärgerna" lila (E129/E151) och julröd (E104/E129) redan innehåller två färger var. Den ena färgen i lila är samma som en av färgerna i julrött. Koncentrationen av den färgen (E129) är dock mycket lägre än den lila (E151) och syns på gelen som ett svagt rosa band. Den gula komponenten i julrött (E104, gul) har så låg koncentration att den är svår att se.

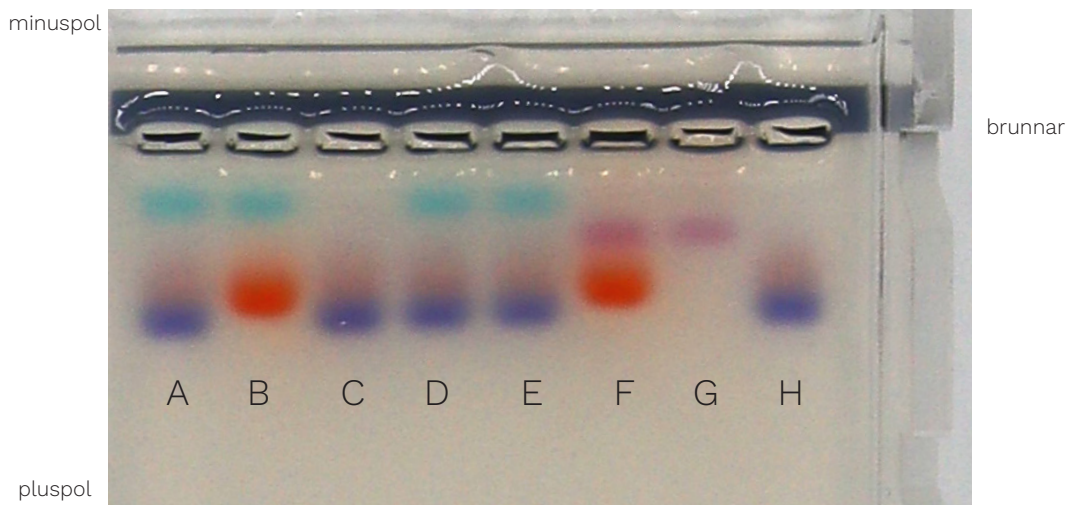


Bild av gelen som eleverna använde för att lösa deckargåtan. Bokstäverna motsvarar brottsplatsen, offret och de misstänkta. Bilden är fotograferad ungefär tio minuter efter att elektroforesen stängts av.

Resultatet från deckargåtan

- A) Brottsplats (blått + lila)
- B) Offret (blått + julrött)
- C) Misstänkt 1 (lila)
- D) Misstänkt 2 (blått + lila)
- E) Misstänkt 3 (blått + lila)
- F) Misstänkt 4 (rödbeta + julrött)
- G) Misstänkt 5 (rödbeta)
- H) Misstänkt 6 (lila)

Gelelektroforesen visar alltså samma bandmönster från brottsplatsen (hudskrapet under offrets naglar) som för misstänkt 2 och 3.

Blodgruppsbestämning

Till blodgruppsbestämningen behövs "fejkblod" och "fejkantikroppar". Anti-A är 0,1 M silvernitratlösning och Anti-B 0,1 M bariumkloridlösning (eller bariumnitrat). Principen för denna metod är fällningsreaktioner. Silverjoner och kloridjoner bildar en svårslöslig fällning, silverklorid, medan bariumjoner och sulfatjoner bildar en svårslöslig fällning, bariumsulfat. Vi har använt mikrotiterplattor (se bild längst ned på sidan) och enkla engångspipetter men det går bra att placera droppar på glas eller plast. En fördel med slät yta är att det är enklare att rengöra.

Säkerhet och tillredning

Både silvernitrat och bariumklorid innehåller tungmetaller vilket ska märkas och avfallshanteras enligt särskilda instruktioner. Använd webbplatsen Chesse.org där du bland annat kan generera etiketter med korrekta varningssymboler.

1. Fyll droppflaskor med 0,1 M silvernitratlösning (Anti-A) och 0,1 M av bariumkloridlösning (eller bariumnitrat) (Anti-B).
2. "Blodet" tillverkas av julröd frostingfärg som späds med avjonat vatten till en tydligt blodröd färgnyans. *OBS! Viktigt att det inte är kranvatten eftersom det finns kloridjoner som stör.* Fördela till fyra kärl för olika blodgrupper.
3. Blodgrupp 0: Ingen tillsats.
4. Blodgrupp A: Tillsätt natriumklorid till "blodet" (cirka 0,5 g per 100 ml).
5. Blodgrupp B: Tillsätt lite natriumsulfat till "blodet" (cirka 1,5 g per 100 ml).
6. Blodgrupp AB: Tillsätt både natriumklorid och natriumsulfat till "blodet".

Blodgruppsbestämning i deckargåtan

I elevinstruktionen framgår hur eleverna ska testa blodet. Där finns också en figur där de ska fylla i tomma cirklar och rita prickar i där det bildas fällning när Anti-A respektive Anti-B tillsätts. I instruktionen framgår även att de ska ha en referens (nollprov) till varje individ. I bilden nedan är referensproverna placerade på rad C på provplattan.



Testplatta med "blod". Fällningarna blir vita, vilket är enklast att se mot mörk bakgrund. På den här plattan har blod från en individ droppats i tre hål under varandra. Anti-A och Anti-B droppats i till proverna på rad A respektive rad B. Rad C används som referens (ingen tillsats).

Tolkning av blodgrupper i bilden ovan: Individ 1 (kolumn 1) har blodgrupp 0 (ingen reaktion med varken Anti-A eller Anti-B). Individ 2 och 3 har blodgrupp A, individ 4 blodgrupp AB, individ 5 blodgrupp B och individ 6 blodgrupp 0. På brottsplatsen (kolumn 8) hittades blodgrupp AB, samma som offrets blodgrupp.

Svar på frågor i deckargåtan

1. Varför måste man byta spets mellan varje pipettering?
För att inte blanda prover från olika individer.
2. Varför bildades det olika band i gelen?
Proverna innehöll olika långa DNA-bitar. Korta DNA-bitar rörde sig snabbare genom gelen och hamnade längre bort från brunnen. Olika individer hade olika DNA och det gav olika band för olika individer (vissa hade dock samma).
3. Vilken av metoderna (blodgruppsbestämning, gelelektrofores) gav mest användbar information? Varför?
Blodgruppen för blodet på brottsplatsen var samma för offret och för misstänkt nummer 4. Även om ingen av de andra misstänkta hade den blodgruppen går det inte att säga att misstänkt nummer 4 är brottslingen eftersom offret hade samma blodgrupp och blodet på brottsplatsen kan komma från honom. Med gelelektroforesen kunde vi utesluta fler av de misstänkta jämfört med blodgruppsbestämningen. Vi jämförde där med hudskrap från offrets naglar. Eftersom DNA i hudskrapet hade ett annat mönster än offret själv är det troligt att det tillhör förövaren.
4. Hur kan man gå vidare för att ta reda på om någon av de misstänkta är skyldig?
Mer information behövs. Göra fler förhör av de misstänkta. Testa andra delar av arvsmassan och se om de misstänkta som är kvar går att skilja åt.

Besvara följande frågor med hjälp av bilagan *Kompletterande genetisk analys*

5. Hur bidrar den kompletterande informationen till den tekniska bevisningen?
Nu kan vi se att misstänkt nummer 3 har samma bandmönster som fyndet på brottsplatsen (under offrets naglar).
6. Vad innebär det att DNA kan ha olika längd? Vad är det som är olika "långt"?
DNA är byggt av en lång rad av nukleotider (kvävebaser). Långa DNA-fragment består av fler kvävebaser än korta.

Besvara följande frågor med hjälp av bilagan *Fakta om blodgrupper*

7. En person har ärvt en genvariant från sin mamma som ger ett icke fungerande enzym och en annan genvariant från sin pappa som ger ett fungerande enzym som bygger med galaktos. Vilken blodgrupp har personen?
Blodgrupp B (genotyp BO, fenotyp B)

8. Andelen människor med blodgrupp A, B, AB eller O skiljer sig åt i olika delar av världen. Kartan nedan visar hur vanlig B-allelen är. Ringa in påståendena som är korrekta.
- a. Det är sannolikt att B-allelen är mycket mer fördelaktig för överlevnad hos människor än allelerna för A och O.
 - b. Det är troligen ovanligt med blodgrupp AB i Amerika.
 - c. En faktor som kan ha påverkat förekomsten av B-allelen kan vara folkvandringar.
 - d. En sådan här bild som visas förändras troligen över tid.
 - e. Att det finns en variation med olika alleler beror på mutationer.
 - f. I Afrika finns endast en typ av blodgrupp.

Kommentar:

Alternativ a är osannolikt eftersom man då skulle förvänta sig en högre frekvens av B-allelen i världen på grund av naturligt urval. Som kartan visar nu är B-allelen istället mindre vanlig än allel O och/eller A i alla delar av världen.

Alternativ f är inte korrekt eftersom kartan visar att det i Afrika finns upp till 20 % förekomst av B-allelen. Alltså finns andra alleler också här (O och/eller A). Detta innebär också att det borde finnas flera typer av blodgrupper. Exempelvis, om 20 % motsvaras av B-allelen och resten, 80 % består av O-allelen så kan vi förvänta oss att det finns personer med blodgrupperna B och O. Om vi antar att det även finns A-alleler så kan vi föränta oss att alla blodgrupper finns (O, A, B, AB).