

HANDS ON BIOTECH

EKSPERIMENT 6

DNA-profiler

LONE ALS EGEBO
LARS HAASTRUP PEDERSEN

TEORI
ELEVVEJLEDNING
LÆRERVEJLEDNING

EKSPERIMENT 6

DNA-profiler

Hands on Biotech - DNA-profiler

© Lone Als Egebo, Lars Haastrup Pedersen, Aalborg Universitet

Forfattere og faglig redaktion:

Lone Als Egebo og Lars Haastrup Pedersen

Illustrationer: Lotte Thorup

Kemiske strukturtegninger og reaktionsskemaer: Hanne Wolff

BioRender-illustrationer: se kildeliste

Omslag: Lotte Thorup

Shutterstock.com: Chokniti-Studio

Grafisk tilrettelægning: Lotte Thorup

1. udgave, 1. oplag 2023

ISBN: 978-87-89383-96-5

Udgivet af Aalborg Universitet – Institut for Kemi og Biovidenskab

Projektet er støttet af Novo Nordisk Fonden.

Kildeliste findes på projektets hjemmeside:

<https://www.bio.aau.dk/forskning/projekter/hands-on-biotech>

Dette hæfte er beskyttet i medfør af gældende dansk lov om ophavsret. Kopiering må kun ske i overensstemmelse med loven. Det betyder f.eks. at kopiering til undervisningsbrug kun må ske efter aftale med Copydan Tekst og Node.



Ege-Bøger



Indhold

FORORD	5
--------------	---

TEORI **7**

Short Tandem Repeats anvendes i metoden	
DNA-fingerprinting	8
Ekstraktion og oprensning af DNA fra mundhulen	9
E-gelelektroforese	10
Fluorometri	10
Arbejdsspørgsmål	11

ELEVVEJLEDNING **13**

Formål	13
Flow	13
DEL A - EKSTRAKTION OG OPRENSNING	
AF DNA FRA MUNDHULE	14
Materialer pr. gruppe	14
Fremgangsmåde	15
DEL B - E-GELELEKTROFORESE AF OPRENSET	
GENOMISK DNA	16
Materialer	16
DEL C - MÅLING AF DNA-KONCENTRATION	19
Materialer	19
Fremgangsmåde	19
DEL D - OPFORMERING AF DNA VED PCR	20
Materialer	20
Fremgangsmåde	20
DEL E - FREMSTILLING AF DNA-PROFIL	
VED GELELEKTROFORESE	22
Efterbehandling	23

LÆRERVEJLEDNING **25**

Læreplanen	25
Teori	25
Flow	26

Forord

Dette hæfte **DNA-profiler** er skrevet i tilknytning til udviklingsprojektet 'Hands on Biotech', der er støttet af Novo Nordisk Fonden. Projektet er et samarbejde mellem Aalborg Universitet, Institut for Kemi og Biovidenskab, og konsulentfirmaet Ege-bøger.

Materialet er målrettet undervisningen i bioteknologi/biologi i gymnasiet.

I projektet har deltaget lærere fra følgende nordjyske gymnasier: Aalborg Katedralskole, Aalborghus Gymnasium, Frederikshavn Gymnasium, Hasseris Gymnasium, Hjørring Gymnasium og Thisted Gymnasium.

Fagområdet bioteknologi omhandler teknologisk udnyttelse af biologiske systemer. I 'Hands on Biotech' er der arbejdet med bioteknologien inden for tre hovedområder:

- Fermentering og cellen som fabrik
- Separation og oprensning
- DNA-analyser

Nærværende hæfte knytter sig til hovedområdet 'DNA-analyser', og består af teori, elevvejledning og lærervejledning til forsøget **DNA-profiler**.

En særlig tak skal rettes til Jørn Clausen, Aalborghus Gymnasium.

Susan Hove Hansen, Racika Kirshnakumar, Nicolai Sundgaard Bekker, Celine Petersen og Rasmus Hansen Kirkegaard, AAU.

Studentermedhjælpere: Anne Johansen, Anne Kalinka Sand Knudsen, Isabell Raahauge Eriksen, Marie Riisgaard-Jensen, Mikkel Lyng Berndorf, Rikke Brønnum Nielsen, Sofie Zacho Vestergaard, Søren Heidelberg.

Lars Hastrup Pedersen,
Leder af projektet
Lektor, Ph.D.
Institut for Kemi og Biovidenskab
Aalborg Universitet

Lone Als Egebo,
Koordinator for projektet
Forfatter, Cand. Scient.
Ege-bøger – Formidling af naturvidenskab

EKSPERIMENT 6

DNA-profiler

Hvordan opklares et mord ved hjælp af prøver fra et gerningssted? – Svaret ligger i prøvernes DNA.

Når retsmedicinsk institut undersøger om en mistænkt er gerningsperson til et mord, bruges en særlig teknik kaldet *DNA-fingerprinting* eller *DNA-profilering*.

Ved denne teknik undersøges de små forskelle, der er imellem individers DNA. Forskellene udgør 0,1 % svarende til 3.000.000 basepar. De udgør en slags menneskelig strejkode på samme måde som vores fingeraftryk (heraf navnet fingerprinting).

For at analysere DNA fingerprints anvendes PCR-teknik og gelelektroforese, se figur 1, på de prøver der tages fra gerningsstedet og på prøver fra de mistænkte.



Figur 1. Resultat af DNA-elektroforese fra forskellige personer.

I dette eksperiment skal der identificeres en gerningsperson i klassen ud fra prøver af mundskrab – på samme måde, som politiet ville gøre det.

Alle eksperimenter og den tilhørende teori i Hands-on-Biotech-projektet forholder sig til FN's verdensmål for bæredygtig udvikling. I nærværende case bringes følgende verdensmål i spil, se figur 2.

Figur 2. FN-verdensmål der er relevant i forhold til eksperimentet 'DNA-profiler'.

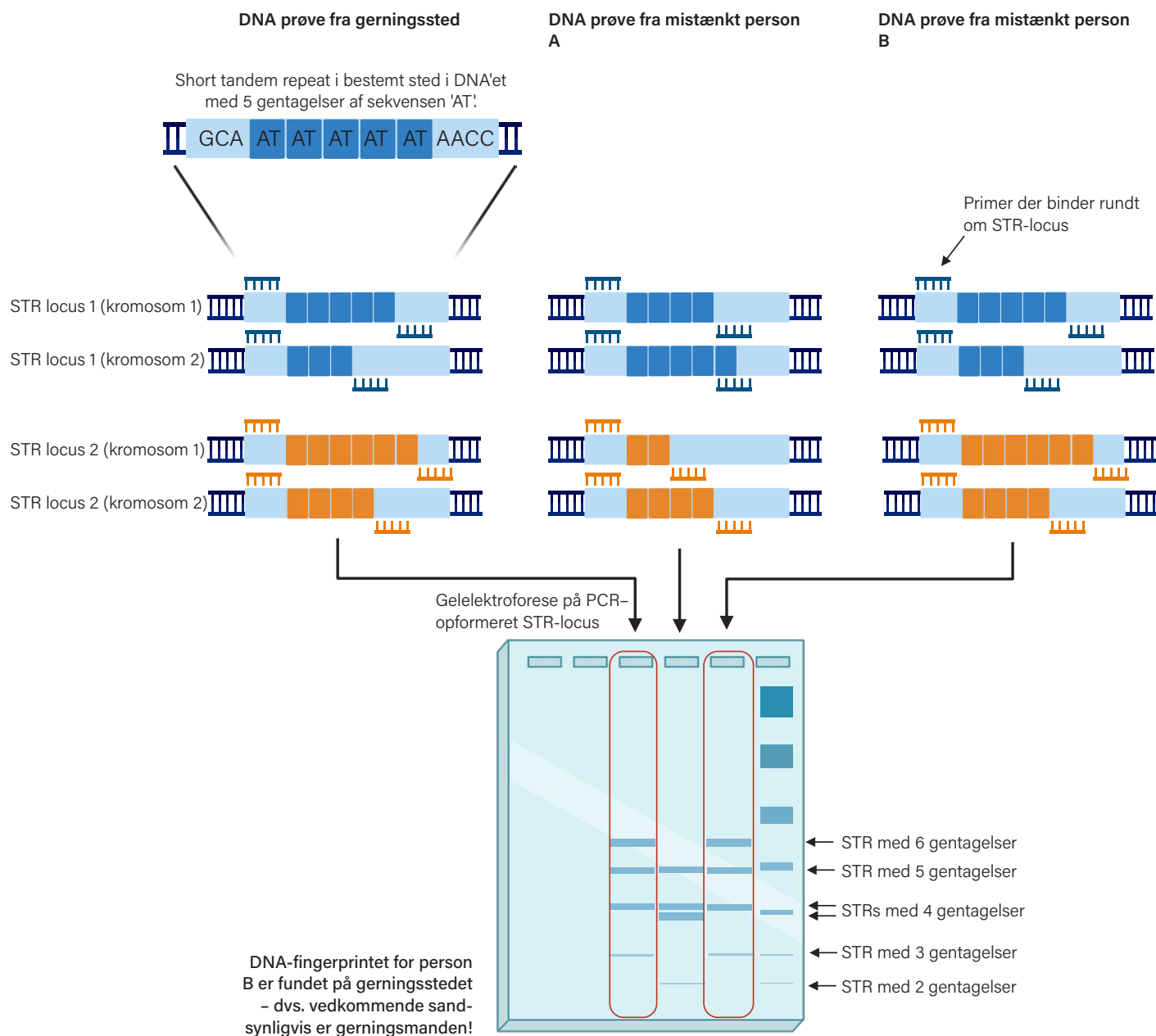


Short Tandem Repeats anvendes i metoden DNA-fingerprinting

Det menneskelige genom indeholder særlige områder med høj variation. Disse områder er ofte placeret i DNA'et på steder, som ikke koder for proteiner også kaldet *introns* eller *junk-DNA*. I introns er der ikke naturlig selektion for at fjerne mutationer som fx insertions eller deletions, fordi mutationerne ikke oversættes i proteinsyntesen og derfor ikke skader proteinfunktionen.

Short Tandem Repeats (STRs), også kaldet *mikrosatellitter*, er eksempler på varierende DNA-regioner i introns. De består af små sekvenser på 2-5 baser, fx 'GTG', der gentages op til 50 gange efter hinanden (GTGGTGGTG...). Antallet af gentagelser i STRs er forskelligt imellem individer og nedarves fra forældrene. Eksempelvis har den mistænkte person A i figur 3 en STR-allel med 4 gentagelser, imens den mistænkte person B har et STR-allel med 5 gentagelser på samme sted i kromosomet. Fordi mennesker har

Figur 3. Identificering af gerningsmand ud fra metoden DNA-fingerprinting.



diploide kropsceller, vil alle personer have to STR-alleler, et på hvert kromosom, som enten er ens (homozygot) eller forskellige (heterozygot). Det resulterer i en utrolig diversitet i genomets STR-områder.

Som eksempel vil et enkelt STR-locus, hvor der er mellem 1 og 50 mulige gentagelser af en kort sekvens, indeholde ikke mindre end 1275 unikke allel-kombinationer, 50 homozygote og 1225 heterozygote! Hver person vil kun have én af disse 1275 kombinationer. Ved at analysere flere STR-loci kan chancen mindskes for at ramme to tilfældige personer med samme unikke allel-kombination. Derfor PCR-opformerer man typisk mellem 16 og 20 forskellige STR-loci.

I dette eksperiment anvendes 6 forskellige PCR-primer-sæt – hvert sæt opformerer et unikt STR-locus.

Efter PCR-opformeringen visualiseres STR-allelerne vha. gelelektroforese. I gelelektroforese separeres STR-allelerne på baggrund af størrelse, da små DNA-molekyler vandrer hurtigere og længere i agarosegelen end store DNA-molekyler. Identiske STR-alleler vil derfor vandre lige langt i gelen. På den måde danner gelelektroforesen et billede (et fingerprint) af alle de STR-alleler, som befandt sig i prøven, og de kan sammenlignes med fingerprints fra formodede gerningspersoner. Hvis et fingerprint matcher en mistænkt, må det formodes, at denne person var til stede på gerningsstedet.

Hos retsmedicinsk institut anvendes desuden statistiske værktøjer til at afgøre sandsynligheden for, at et fingerprint rent faktisk stammer fra en mistænkt. I de statistiske beregninger indgår bl.a. STR-allellernes udbredelse, dvs. hvor almindelig STR-allelerne er i befolkningen. Tilstedeværelse af mange almindelige STR-alleler i et fingerprint vil være forbundet med en øget usikkerhed. En endelig afgørelse vil ikke alene basere sig på DNA-fingerprints, men vil også afhænge af prøvens art (fx blod), motiv, sted og den mistænkes alibi (bevis for at personen var et andet sted på gerningstidspunktet).

Ekstraktion og oprensning af DNA fra mundhulen

Første trin i en DNA-fingerprinting er at skaffe sig en ren DNA-prøve fra en udvalgt person. Det kan gøres ved at tage et skrab fra mundhulen (indersiden af kinden) med en bomuldsvatpind. Prøven vil indeholde epitelceller. I andre tilfælde fås fx en prøve fra far og barn (i faderskabssager), fra et gerningssted (blod, sekret, sæd, cigaretskod) eller måske fra et arkæologisk materiale.

Dernæst skal DNA ekstraheres og oprenses. I eksperimentet 'DNA-profiler' sker det i fire trin hvor DNA'et oprenses ved hjælp af små søjler. De fire trin er:

1. Lysering
2. Binding til søjle
3. Vask
4. Eluering fra søjle

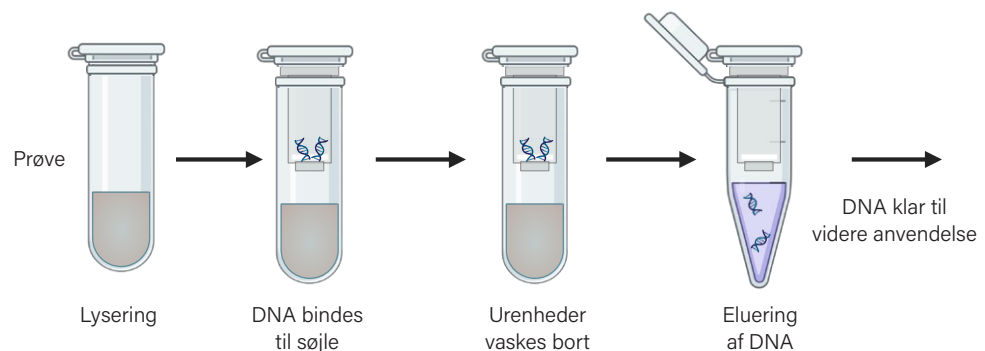
For at få DNA frigjort fra cellerne, skal cellemembran og kernemembran nedbrydes. Det kaldes også *lysering*. Det gøres med to forskellige bufferopløsninger. Først anvendes en bufferopløsning, der indeholder natriumdodecylsulfat. Det er et sæbestof (engelsk: **sodiumdodecylsulphate** forkortet SDS), som nedbryder membraner.

Herefter skal proteiner i prøven spaltes ved tilsætning af Proteinase K. Det er et proteinspaltende enzym, der spalter proteiner som histoner, så DNA frigives. Endvidere nedbryder Proteinase K også DNaser, så de ikke kan nedbryde DNA.

Efter proteinnedbrydning tilsættes den anden buffer, der indeholder guanidinhydrochlorid. Det er et salt, der ødelægger proteiner, og derved stopper Proteinase K's aktivitet.

Så overføres blandingen til en søjle, der er fremstillet af et materiale, der binder DNA, mens andre cellebestandde blot gennemløber søjlen. Mens DNA stadig er bundet til søjlen vaskes den, og til sidst tilsættes en buffer der *eluerer*, det vil sige udvasker DNA'et fra søjlen.

Figur 4 viser en oversigt over processen:



Figur 4. Ekstraktion og oprensning af DNA.

E-gelelektroforese

Efter ekstraktion og oprensning af det genomiske DNA skal det visualiseres ved hjælp af gelelektroforese inden opformering ved PCR. Her anvendes *E-gelelektroforese* som er en meget hurtig metode, der foregår ved hjælp af præfabrikerede agarosegeler. Selve elektroforesen kan køres på 10 minutter og gelen visualiseres, mens den kører, se figur 5.



Figur 5. Apparatur til E-gelelektroforese.

Fluorometri

Før opformering ved PCR kvantificeres mængden af DNA, så det tjekkes, om der er tilstrækkeligt med DNA tilstede. Til det formål anvendes metoden *fluorometri*. Fluorometri minder om spektrofotometri, idet koncentrationen af et stof også måles ved hjælp af lys. Fluorometri er dog mere specifik for stoffer som DNA, RNA og protein, der alle absorberer i uv-området og derfor ikke kan kvantificeres så præcist ved hjælp af spektrofotometri, når de optræder sammen i en blanding.

Til fluorimetrisk måling anvendes et Qubit™ fluorometer, se figur 6. Forud for en måling udføres et *assay*, det vil sige en analytisk procedure. En prøve tilsættes en opløsning, der indeholder et fluorescerende farvestof, der binder sig specifikt til DNA. At farvestoffet er *fluorescerende*, betyder at det udsender lys af en bestemt farve, når det selv absorberer



Figur 6. Qubit™ fluorometer.

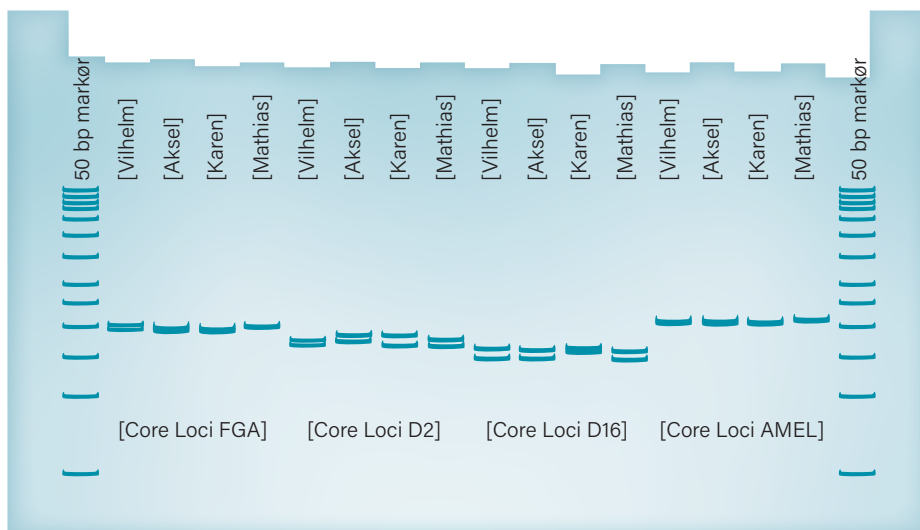
lys. Det fluorescerende farvestof er valgt, så det har en ekstrem lav fluorescens, indtil det bindes til et DNA-molekyle.

Fluorometeret udsender lys, og når en klargjort prøve placeres i apparatet, måles intensiteten af fluorescens i prøven. Der er ligefrem proportionalitet mellem intensiteten af fluorescens og koncentrationen af DNA i opløsningen. Fluorometeret måler prøvens fluorescens og omregner det til en DNA-koncentration ved hjælp af standardprøver med kendte koncentrationer af DNA.

Qubit™ fluorometeret kan også bruges til at måle koncentrationen af fx protein eller RNA i en prøve, og så anvendes der andre fluorescerende farvestoffer der bindes specifikt til disse stoffer. Derfor kan koncentrationen af hhv. DNA, RNA og proteiner, måles helt uafhængigt af hinanden i en blanding.

Arbejdsspørgsmål

1. Hvad er en DNA-profil eller et DNA-fingerprint?
2. Giv eksempler på i hvilke sammenhænge DNA-profiler kan anvendes.
3. Forklar hvad der kendetegner Short Tandem Repeats (STRs), og i hvilke områder af DNA'et de forekommer.
4. Ved hvilke molekylærbiologiske teknikker kan en persons STRs undersøges?
5. STR-alleler nedarves fra forældre til børn. I en familie blev et STR-locus undersøgt, hvor moren havde henholdsvis 7 og 12 STRs på sine to alleler, mens faren havde henholdsvis 5 og 15 STRs på sine alleler i samme locus. Hvilke genotyper er det muligt for deres børn at få? Opstil evt. et krydsningsskema.
6. DNA-fingerprinting kan fx anvendes i faderskabssager. Figur 7 viser et resultat med DNA-profiler af Vilhelm (barn), Aksel (barn), Karen (mor) og Mathias (far). Vurdér om Mathias er far til de 2 børn.



Figur 7. Resultater fra faderskabssag.

7. Forklar hvordan DNA kan oprenses fra mundhulen.
8. Hvad er forskellen på en almindelig gelelektroforese og en E-gelelektroforese?
9. Hvilke fordele der er ved at anvende et fluorometer til bestemmelse af DNA-koncentrationer sammenlignet med andre spektrofotometriske metoder?

EKSPERIMENT 6

DNA-profiler

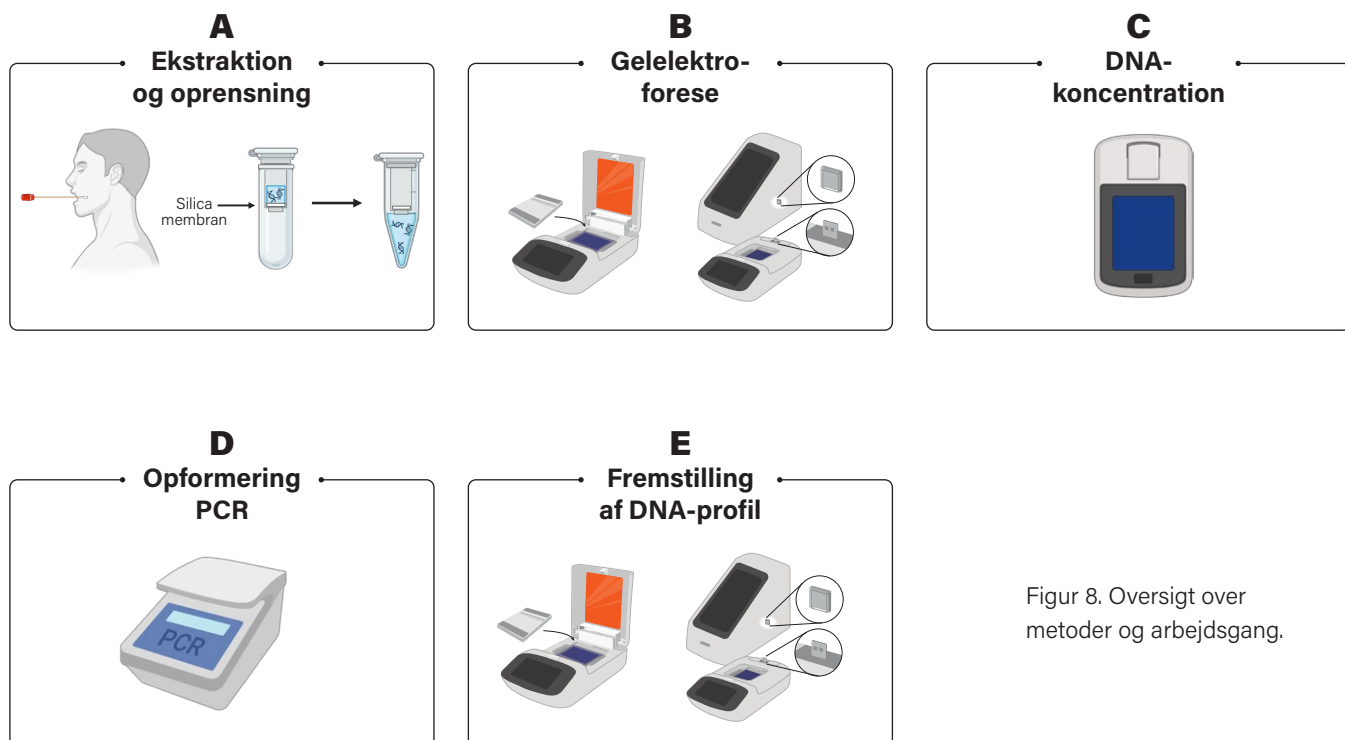
Formål

I denne øvelse er formålet at opnå indblik i metoder der anvendes inden for DNA-analyse, herunder ekstraktion, oprensning, gelelektroforese, PCR og kvantificering.

Flow

Øvelsen har følgende flow og tidsforbrug, se figur 8:

- DEL A – Ekstraktion og oprensning af DNA fra mundhulen – 90 min.
- DEL B – Gelelektroforese af oprenset genomisk DNA – 25 min.
- DEL C – Tjek af DNA-koncentration – 20 min.
- DEL D – Opformering af DNA-molekyler ved Polymerase Chain Reaction (PCR) – 120 min.
- DEL E – Fremstilling af genetisk fingeraftryk ved gelelektroforese – 180 min.



Figur 8. Oversigt over metoder og arbejdsgang.

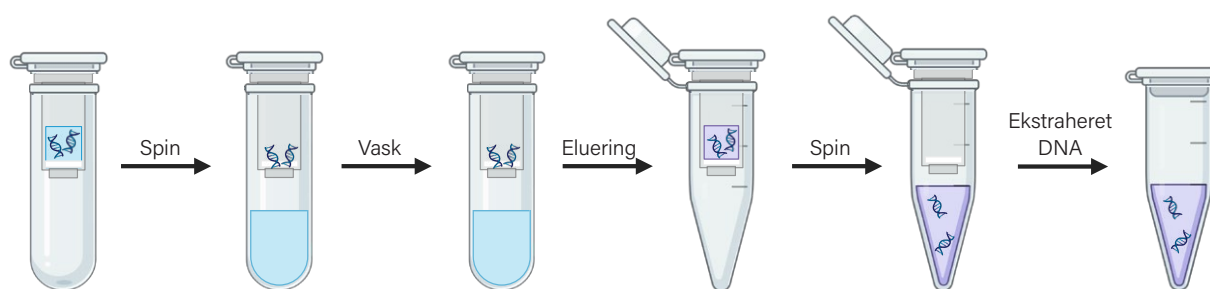
DEL A - Ekstraktion og oprensning af DNA fra mundhule

Formålet med DEL A er at få ekstraheret DNA fra epithelceller i mundhulen og efterfølgende adskille DNA'et fra prøvens øvrige bestanddele.

Materialer pr. gruppe

- QIAamp DNA Investigator Kit, der indeholder følgende:
 - DNeasy Mini spin oprenningskolonne (søjler af siliciumgel der binder DNA), 1 stk.
 - Opsamlingsrør (2 mL), 6 stk.
 - ATL (lyseringsbuffer – indeholder SDS)
 - AL (lyseringsbuffer – indeholder guanidiniumsalt)
 - AW1 (vaskebuffer – indeholder guanidiniumsalt og ethanol)
 - AW2 (vaskebuffer)
 - ATE (elueringsbuffer- 10 mM Tris-HCl pH 8,0 med 50 mM NaCl)
 - Proteinase K (nedbryder protein)
- Absolut ethanol (99%)
- Steril vatpind, 2 stk.
- Saks
- Eppendorfrør (1,5 mL), 4 stk.
- Pipetter + spidser (20-100 μ L og 100-1000 μ L)
- Vortex-mixer
- Varmeblok
- Centrifuge
- Handsker

Flowdiagram for DEL A, se figur 9.



Figur 9. Oversigt over arbejdsgang i DEL A.

Sikkerhed

Mundhuleskrab kan indeholde smitstoffer, og det skal derfor håndteres med handsker.

Affaldshåndtering

Alt affald indsamles på arbejdsstationerne, og bortskaffes med almindeligt affald.

Forarbejde (for læreren):

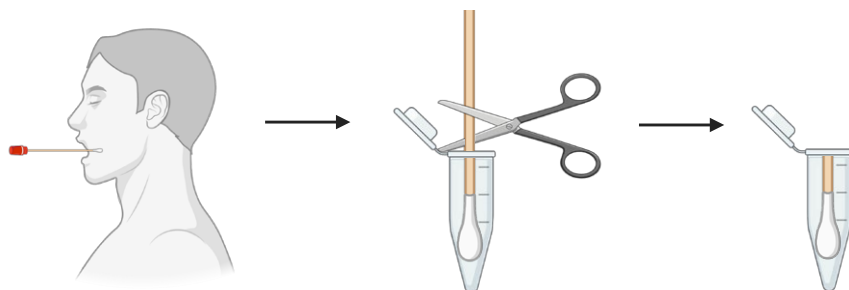
- Tjek om buffer AL og ATL har bundfald. Hvis dette er tilfældet, skal den opvarmes ved 70 °C indtil bundfald opløses.
- Opvarm varmeklokkene til henholdsvis 56 °C og 70°C.

Fremgangsmåde

Udtagning af DNA-prøve

Der udvælges én person fra hver gruppe til udtagning af DNA.

1. Høst celler fra mundhulen ved at gnide den sterile vatpind mod indersiden af kinderne i 1 min., se figur 10.



Figur 10. Ekstrahering af DNA fra mundhulen ved brug af en steril vatpind.

2. Placer vatpinden i et 1,5 mL Eppendorfrør, og klip den af ved bomuldskanten. Skriv personens initialer samt gruppenummer på røret.
3. Gentag punkt 1-2 med ny vatpind (samme person), så hver gruppe ender med to rør. Dette gøres for at sikre et højere udbytte af DNA.

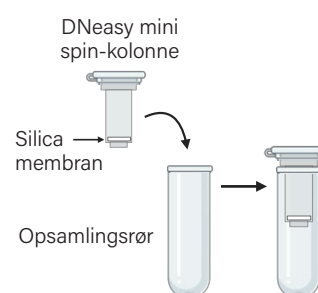
Lysering

4. Tilsæt 400 µl buffer ATL og 20 µl proteinase K til hvert rør med prøve.
5. Vortex prøven i 10 sek.
6. Inkubér prøverne i 60 min ved 56°C i varmeblok. Vortex prøverne i 10 sek. hvert 10 min. under inkuberingen.
7. Centrifuger prøverne kort ved 8000 rpm i 5 sek. (husk modvægt).
Note: Formålet med centrifugeringen er blot at samle væsken i bunden af røret.
8. Tilsæt 400 µl buffer AL til hvert rør, og vortex prøverne i 15 sek.
9. Centrifuger prøverne kort ved 8000 rpm i 5 sek.
10. Inkubér prøverne ved 70°C i 10 min, og vortex i 10 sek hvert 3. min.
11. Centrifuger prøverne kort ved 8000 rpm i 5 sek.
12. Tilsæt 200 µl absolut ethanol, og vortex prøverne i 15 sek.
13. Centrifuger prøverne kort ved 8000 rpm i 5 sek.

Binding af DNA til søjlen

Hver gruppe har nu to rør med lysat. DNA'et skal isoleres ved at passere lysatet fra hvert rør igennem samme søjle (spin-kolonne), se figur 11. Derfor gentages følgende trin for hvert rør:

14. Sug lysatet (væsken med DNA) op med en pipette. Før pipettespidsen ned ved siden af vattet ved bomuldsspinden, og sug så meget op som muligt – gerne 700-800 µL.
15. Overfør til en DNeasy mini spin-kolonne.
16. Centrifuger ved 8000 rpm i 1 min. Tag kolonnen ud, tøm opsamlingsrøret og sæt kolonnen tilbage i opsamlingsrøret.
17. Overfør lysatet fra det andet DNA-rør til samme spin-kolonne, der netop har været i centrifugen, og gentag centrifugering.
18. Kassér opsamlingsrøret med væsken og placér kolonnen i et nyt opsamlingsrør. DNA'et er nu bundet til materialet i spin-kolonnen.



Figur 11. Små søjler (kolonner) til oprensning af DNA.

Vask af DNA

Vask af DNA sker ved hjælp af to bufferopløsninger, AW1 og AW2. Buffer AW1 indeholder bl.a. et guaniniumsalt, ligesom buffer AL, samt ethanol.

19. Tilsæt 500 µl buffer AW1 til kolonnen.
20. Centrifuger ved 8000 rpm i 1 min.
21. Overfør kolonnen til et rent opsamlingsrør, og smid det brugte opsamlingsrør ud.
22. Tilsæt 700 µL buffer AW2. Centrifuger ved 8.000 rpm i 3 min. Herefter overføres kolonnen til et rent opsamlingsrør. Det gamle opsamlingsrør kasseres.
23. Tilsæt 700 µL ethanol. Centrifuger ved 8.000 rpm i 3 min. Herefter overføres kolonnen til et rent opsamlingsrør. Det gamle opsamlingsrør kasseres.
24. Centrifuger ved 14.000 rpm i 3 min.
25. Overfør kolonnen til et 1,5 mL Eppendorfrør. Det gamle opsamlingsrør kasseres.
26. Inkubér i minimum 10 min. ved stuetemperatur eller 3 min. ved 56 °C.

Eluering af DNA

Kolonnematerialet indeholder nu prøvens DNA, som er oprenset. DNA skylles ud af filtermaterialet med buffer ATE. Dette gøres ad to omgange.

27. Tilsæt 30 µL buffer ATE i midten af kolonnen, og inkubér i 5 min ved stuetemperatur.
28. Centrifuger ved 14.000 rpm i 1 min.
29. Gentag trin 27-28.
30. Eppendorfrøret indeholder nu DNA-prøven og markeres med testpersonens initialer og gruppenummer. Kolonnen kasseres.

Læreren indsamler gruppernes DNA-prøver. En tilfældig prøve udvælges som mistænkt gerningsperson til en crime-scene, som I selv opdigter. Læreren tilsætter 30 µL buffer ATE til gerningspersonens DNA-prøve, og prøven blandes med pipetten. 30 µL udtages igen og overføres til et nyt rør mærket X. En af grupperne arbejder videre med X-prøven samt deres egen prøve.

Hvis der først arbejdes videre med prøverne næste dag, kan de opbevares på køl under 4 °C eller fryses ned til senere brug.

DEL B - E-gelelektroforese af oprenset genomisk DNA

Formålet med DEL B er ved hjælp af elektroforese at visualisere tilstedeværelsen af DNA i prøven før yderligere behandling.

Materialer

- DNA prøver
- E-Gel™ EX Agarose Gels, 2%
- DNase-frit vand
- E-Gel™ 1 Kb Plus DNA Markør
- E-Gel™ Power Snap Electrophoresis Device
- E-Gel™ Power Snap Camera
- Strømforsyning til E-Gel™ Power Snap Electrophoresis Device
- USB-stik
- Pipetter + spidser (1-10 µL)
- Handsker

Forberedelse af DNA-prøve og markør til E-gel elektroforese:

1. Overfør 10 μL prøve til et nyt 1,5 mL Eppendorfrør, og tilsæt 10 μL DNase-frit vand. Det totale volumen er nu 20 μL . Prøven er nu klar til at blive loadet på gelen.

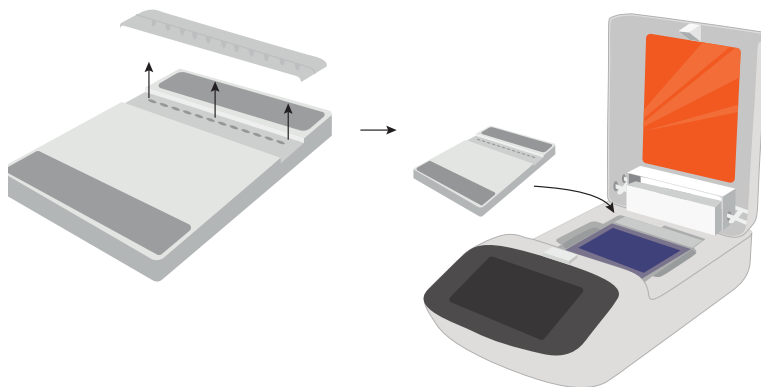
Kun én gruppe forbereder markør:

2. Til et nyt 1,5 mL Eppendorfrør overføres 2 μL markør og 18 μL DNase-frit vand. Markøren er nu klar til at blive loadet på gelen.

Forberedelse af E-gel opsætning, se figur 12:

3. Pak E-gelen ud af emballagen.
4. Fjern forsigtigt kammen i E-gelens øverste ende.
5. Placer E-gelen i E-gel Power Snap Electrophoresis apparatet, således at brøndene sidder foroven længst væk fra maskinens display. Højre kant af E-gelen sættes ned først og derefter trykkes venstre side ned.

Note: Prøverne skal loades på gelen og startes inden 15 min. fra emballagen er brudt.



Figur 12. E-gel-opsætning.



Figur 13. Loading af E-gel.

Loading af prøver på E-gel, se figur 13:

6. Load de 20 μL forberedte prøver i brøndene nummereret 1-10 på E-gelen. Hver gruppe noterer i hvilken brønd deres prøve er loadet og skriver det i nedenstående tabel.
7. Load de 20 μL forberedt markør i brønd M.

Brønd	M	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Gruppe nr.	Markør										

8. Hvis der er tomme brønde, skal disse fyldes med 20 μL DNase-frit vand.
9. Låget lukkes, så det klikker i, og maskinen er nu klar til at blive startet.

Kør gelen, se figur 14:

10. Tryk på 'Set up run' for at vælge E-gel protokol,
11. Vælg 'E-gel EX 1-2%'.
12. Standard kørselstid er 10 min. Denne vælges og tryk derefter 'Start run'.



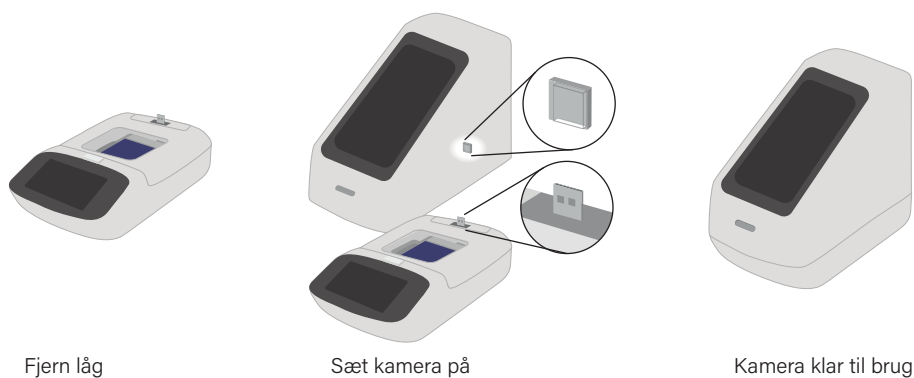
Figur 14. Start af E-gelelektroforese.

Tag billede af gelen, se figur 15:

13. Fjern gummidækslet fra toppen af E-gel apparatet, og placer E-gel Power Snap Camera på apparatet, så forbindelsespunkterne passer i.

Note: Kameraet skal trykkes lige ned og løftes lige op, når det fjernes.

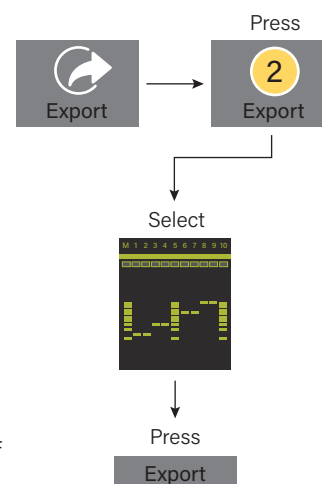
14. Tryk 'View gel' for at se båndene på gelen, der vises på skærmen.
15. Der kan justeres på eksponering, hvis ønsket.
16. Tryk 'Capture' for at tage et billede af gelen.



Figur 15. Montering af kamera på gelapparat.

Eksportering af billeder til USB-stik, se figur 16:

17. Der skal isættes et USB-stik i USB-porten foran på kameraet.
18. Tryk derefter 'Export' på skærmen.
19. Vælg de billeder, der skal eksporteres.
20. Tryk 'Export' for at eksportere billederne fra den aktive session.



Figur 16. Eksportering af billeder af gel.

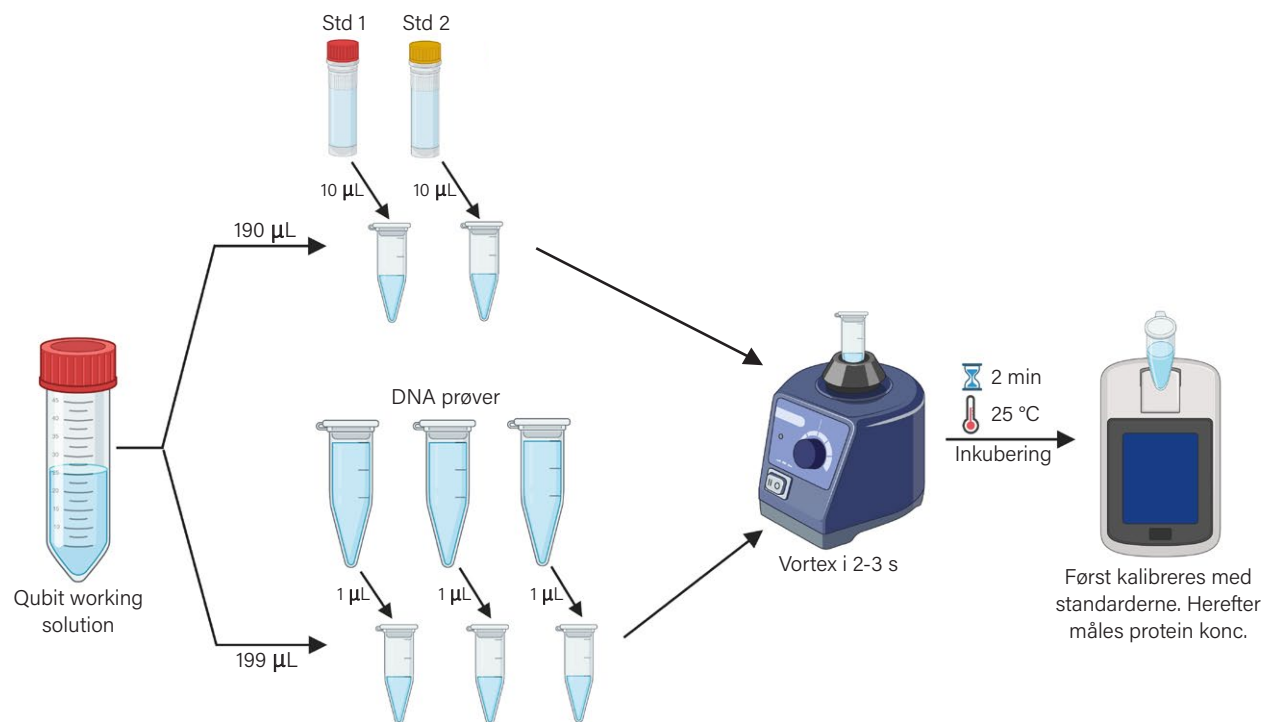
DEL C - Måling af DNA-koncentration

Formålet med DEL C er at undersøge om det oprensede DNA findes i en tilstrækkelig koncentration ved hjælp af fluorometri.

Materialer

- Qubit™ dsDNA Assay kit der indeholder følgende:
 - DNA-standard 1 (0 ng DNA/ μL i TE-buffer)
 - DNA-standard 2 (10 ng DNA/ μL i TE-buffer)
 - Working solution
- Qubit™ Assayrør, 0,5 mL (2 til standarder + 1 pr. Prøve)
- Qubit™ fluorometer
- Pipetter + spidser (1-10 μL , 20-200 μL)

Flowdiagram, se figur 17.



Figur 17. Oversigt over arbejdsgang i DEL C.

Fremgangsmåde

1. Klargør to assayrør for standard 1 og 2 samt et assayrør for hver prøve.
2. Overfør 190 μL working solution til hvert standardrør og 10 μL af standard 1 til det ene rør og 10 μL standard 2 til det andet rør.
3. Overfør 199 μL working solution og 1 μL prøve i et assayrør.
4. Vortex alle rør i 2-3 s.
5. Lad prøverne hvile i 2 min. ved stuetemperatur.
6. Klik på dsDNA High Sensitivity på fluorometeret.

7. Indsæt Standard 1 i fluorometeret – efterfulgt af Standard 2.
 - rfu for Standard 1 skal være omkring 40-75.
 - rfu for Standard 2 skal være omkring 16000-19000.
 - rfu står for 'relative fluorescence units', og er således en relativ måleenhed for koncentrationen af DNA.
8. Vortex en prøve igen, og indsæt den i fluorometeret. Aflæs koncentration.
9. Hvis DNA-koncentrationen er under 2 ng/μL eller skærmen viser 'Sample concentration too low', gentag da DNA-ekstraktionen (DEL A).
10. Fortynd prøven, hvis skærmen viser 'Sample concentration too high'. Lav eksempelvis en 1:10 fortynding (1 μL prøve og 9 μL DNase-frit vand), og gentag trin 3-8 med denne fortynding.

DEL D - Opformering af DNA ved PCR

Formålet med DEL D er at opformere bestemte områder af DNA'et ved PCR, så de efterfølgende kan visualiseres på en gel, og det kan bestemmes, om de er til stede i prøven.

Materialer

- Genomisk DNA fra oprensningen i DEL A
- Primersæt – der er 6 forskellige primersæt. Der laves en prøveserie med hvert primersæt.
- Reaktionsmix som indeholder:
 - DNA H₂O
 - DreamTaq Buffer
 - dNTP mix (25 mM)
 - MgCl₂ (25 mM)
 - DreamTaq Hot Start DNA Polymerase
- PCR-maskine (Thermocycler)
- Pipetter + spidser (1-10 μL, 20-200 μL)
- 6 PCR-rør per DNA-prøve
- 1 PCR-rør til negativ kontrol pr. gruppe

Fremgangsmåde

1. Start med at tænde PCR-maskinen (MyCycler), se figur 18, ved at holde 'standby' knappen nede.
2. Vælg 'Protocol Library' (F1).
3. Vælg følgende program: HoB DNA Fingerprint.



Figur 18. MyCycler PCR-maskine.

Temperatur	Tid	Cyklusser
98 °C	3 min.	1
98 °C	30 sek.	35
55 °C	30 sek.	
72 °C	1 min.	
72 °C	10 min.	1
4 °C	Pause	

4. Tryk 'enter'.
5. Tryk 'enter' igen.
6. Brug pile-tasterne:
 - a. Mode = Algorithmic Measurement
 - b. Sample volume = 25 μ L
 - c. Hot Start = NO
7. Tryk 'Begin run' (F5).
8. Tryk 'Pause run' (F1) og gør dine PCR-prøver klar.

Der skal bruges 10-20 ng genomisk DNA pr. reaktion. For at beregne, hvor meget prøve der skal tilsættes, skal der bruges koncentrationsberegning. Fortynd prøven med DNase-frit vand således at 10 μ L fortyndet prøve indeholder 10-20 ng genomisk DNA.

Klargøring af prøver (pr. DNA-prøve)

1. Gør 6 PCR-rør pr. DNA-prøve klar. Skriv på låget, så du kan kende forskel på dine prøver.
Person A navngiver sine rør: A1, A2, A3, A4, A5, A6.
Person B navngiver sine rør: B1, B2, B3, B4, B5, B6.
2. Der anvendes 1 rør til en negativ kontrolprøve (10 μ L DNase-frit vand). Der udvælges et tilfældigt primersæt af de medfølgende primer sæt til den negative kontrol. Der kan i alt laves 6 forskellige negative prøver. Fordel disse på grupperne. Den negative prøve er en test af, at ens PCR-reaktionsmix ikke er forurenede. Sæt PCR-rørene på is.
3. Tilsæt et volumen genomisk DNA så der overføres 10-20 ng DNA i hvert rør, og tilsæt derefter DNase-frit vand op til et volumen på 10 μ L. Husk der skal udføres 6 reaktioner pr. gruppe.

Der skal altså laves 6 rør (primers) + 1 rør (negativ kontrol) pr. gruppe, og der kan maksimalt være 13 grupper, dvs. 91 rør i arbejde.

4. Der er i alt 6 forskellige primersæt (fx FGA, D3, D16, D8, D21, D18 – det kan variere). Tilsæt 1,25 μ L (20 μ M) af et primersæt til hvert rør (et sæt indeholder både forward og reverse primer). **Husk at notere hvilket primersæt, der kommer i hvilket rør!**

MEGET VIGTIGT: Skift pipettespids HVER GANG, så primer og prøver ikke forurenes eller bliver blandet med hinanden!

5. Bland følgende PCR-reaktionsmix på is og i den givne rækkefølge:

Pr. reaktion		x10 reaktioner
10,9 μ L	DNAase-frit vand	109 μ L
2,5 μ L	10X DreamTaq Buffer	25 μ L
0,2 μ L	dNTP mix (25 mM)	2 μ L
0,15 μ L	Dream Taq Polymerase	1,5 μ L

Note: Bland PCR-reaktionsmix til tre ekstra reaktioner – udover antallet der skal bruges. Blandes til 10 reaktioner, er der ikke nok til 10, universet er forunderligt. Pipettér forsigtigt op og ned for at blande PCR-mixet.

6. Tilsæt 13,75 µL PCR-reaktionsmix til hvert rør med primersæt. Pipetter op og ned 3-5 gange for at blande. Hvis der er bobler i reaktionsmixet, så bank PCR-røret let ned i bordet til de er væk.
7. Når **ALLE prøver** er klar: Tag gruppens isbakke med prøver hen til PCR-maskinen.
8. Organiser rørene i den grønne PCR-rørholder. Denne kan sættes direkte i PCR-maskinen.

Sæt hurtigt gruppens prøver i, og luk PCR-maskinen.

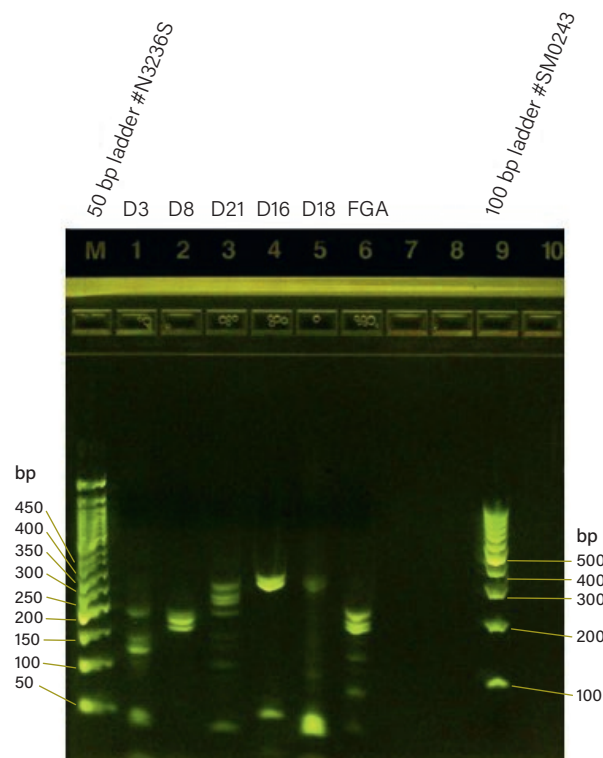
Det er vigtigt at prøverne ikke står og lumrer i PCR-maskinen, fordi alle prøverne ikke er klar!

9. Tryk 'Resume Run' (F1).
10. Tjek at PCR-programmet kører, ved at tiden tæller ned. PCR-programmet varer ca. 1,5 time og kan stoppes, når maskinen har nået 4 °C. PCR-prøverne kan opbevares i køleskab ved 4 °C til næste dag. Hvis prøverne ikke skal bruges indenfor 2 dage, kan de fryses ned ved -20 °C.

DEL E - Fremstilling af DNA-profil ved gelelektroforese

Formålet med DEL E er at visualisere og sammenligne størrelsen af de opformerede DNA-fragmenter fra PCR-reaktionen, for at bestemme hvem den ukendte prøve tilhører. Følg beskrivelsen i DEL B.

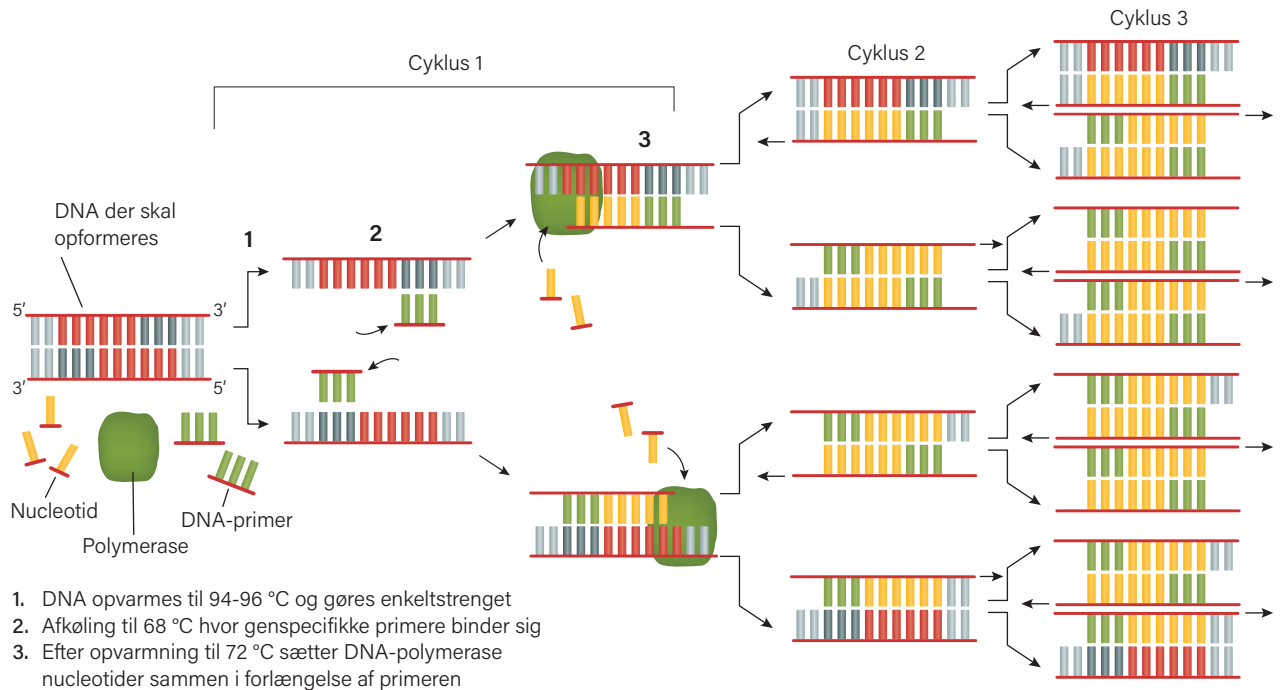
Figur 19 viser et eksempel på hvordan resultatet af en gelelektroforese fra en person kan se ud efter kørsel af DNA-fragmenter fra seks forskellige locus opformeret ved PCR ved hjælp af hvert sit primersæt.



Figur 19. Resultat af E-gelelektroforese af opformerede STRs fra 6 forskellige loci. Den første og næstsidste bane er størrelsesmarkører, mens bane 1-6 repræsenterer hver af de seks loci og deres tilhørende primersæt.

Efterbehandling

1. Forklar formålet med de enkelte trin i oprensningen af DNA fra mundhulen (DEL A). Inddrag en forklaring af, hvad der sker med DNA og/eller andre stoffer ved til-sætningen af en given opløsning eller ved en given behandling.
2. Forklar princippet i PCR (DEL D). Inddrag nedenstående figur 20 i forklaringen.



Figur 20. PCR-metoden.

3. Forklar hvorfor det er vigtigt at udføre gelelektroforese (DEL B) inden opformering af DNA ved metoden PCR.
4. Forklar hvorfor det er vigtigt at måle DNA-koncentrationen (DEL C) inden opformering af DNA ved metoden PCR.
5. Sammenlign klassens resultater fra DEL E, og udpeg den skyldige.

EKSPERIMENT 6

DNA-profiler

Læreplanen

Øvelsen belyser følgende kernestof i læreplanen for bioteknologi A (og tilsvarende for biologi A):

- Nucleinsyrers opbygning, forekomst og egenskaber
- Nedarvningsprincipper
- Replikation
- DNA-teknikker, herunder PCR og elektroforese

Øvelsen kan indgå i temaer der perspektiverer kernestoffet indenfor sundhed og sygdom samt ny forskning og nye bioteknologiske metoder.

Teori

For at få det bedste faglige udbytte af øvelsen er det en fordel at kende til:

- DNA's struktur og funktion
- DNA-opformering (PCR)
- DNA-elektroforese
- Klassisk genetik, herunder nedarvningsprincipper

Det kan der læses om i de biologi- og/eller bioteknologilærebøger der i forvejen anvendes i undervisningen.

Desuden er det en fordel at kende til:

- Human genom analyse
- Short tandem repeats
- Teknikker der anvendes i forbindelse med DNA-ekstraktion, -oprensning og -vask
- Fluorometri der anvendes i forbindelse med koncentrationsbestemmelse af DNA
- E-gelelektroforese

Disse emner beskrives i de teori afsnit, der knytter sig til eksperimentet.

Flow

Eksperimentet har følgende flow og tidsforbrug:

- DEL A – Ekstraktion og oprensning af DNA fra mundhulen – 90 min.
- DEL B – Gelelektroforese af oprenset genomisk DNA – 25 min.
- DEL C – Tjek af DNA-koncentration – 20 min.
- DEL D – Opformering af DNA-molekyler ved Polymerase Chain Reaction (PCR) – 120 min.
- DEL E – Fremstilling af genetisk fingeraftryk ved gelelektroforese – 180 min.

HANDS ON BIOTECH

EKSPERIMENT 6

DNA-profiler

Dette hæfte (DNA-profiler) indgår i en serie på seks hæfter skrevet som del af udviklingsprojektet 'Hands on Biotech'. Det er skrevet til undervisningen i bioteknologi A/biologi A i gymnasiet.

Hæftet er delt op i tre kapitler:

- Teori
- Elevvejledning
- Lærervejledning