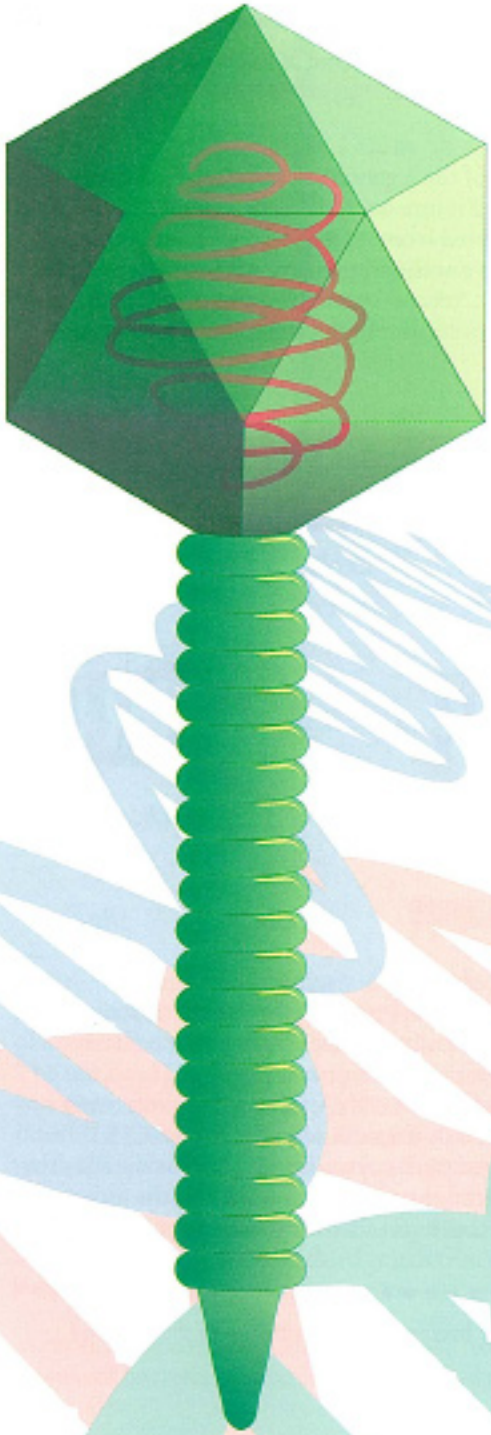
UTFORSK

Restriksjonsanalyse & Elektroforese av DNA

STUDENTVEILEDNING



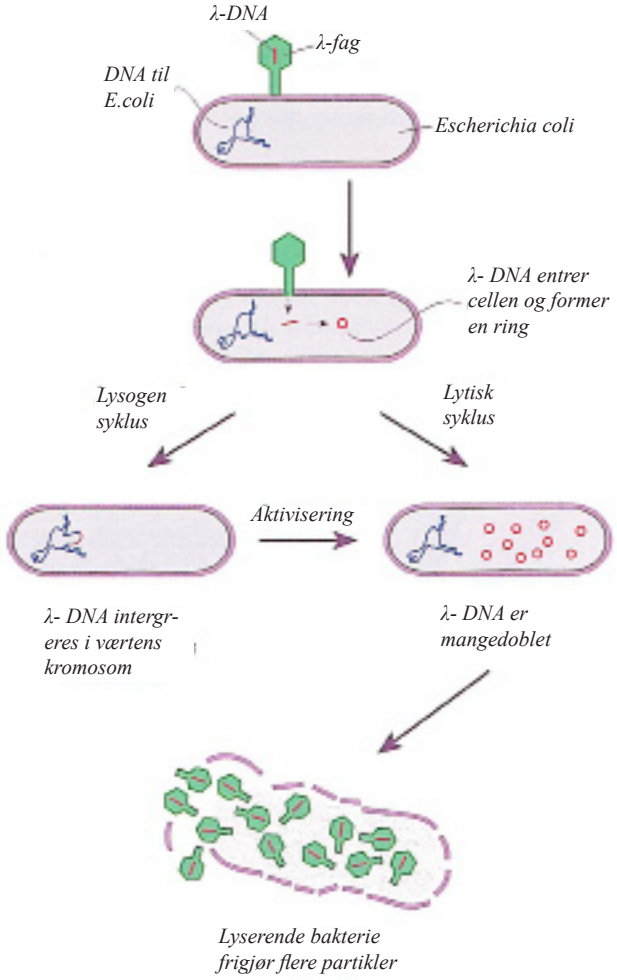
CAROLINA™

FYBIKON AS

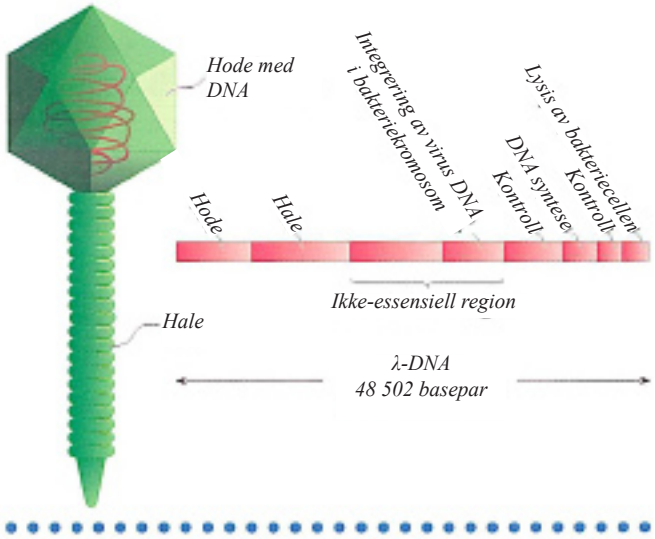
Bakteriofag lambda

Bakteriofag er virus som infiserer bakterier (av «bakterie» og det greske phagein, å spise, altså «den som spiser bakterier»). For å reprodusere seg må bakteriofager (eller bare fager) infisere en bakterievert og overta kontrollen over de molekylære prosessene. Fag lambda benytter tarmbakterien *Escherichia coli* som vert. Lamda kan velge 2 livssykluser inne i *E.coli*; den kan reprodusere seg selv før den ødelegger vertscellen (lytisk syklus), eller den kan intergrere sitt DNA i bakteriens DNA og forbli i dvale i flere generasjoner (lysogen syklus). Visse typer ytre stimuli (f.eks UV-lys) kan så aktivere bakteriofagen til å gå inn i en lytisk syklus.

Lambda er enkelt bygd opp. Den består av dobbeltrådet DNA innkapslet i en protein kappe. Hele genomet er på 48 502 basepar. Innen dette genomet finner vi gener som koder for bygging av virusets protein kappe, ødeleggelse (lysis) av bakteriecellen, integrering av eget DNA til vertens kromosomer, osv. Rekkefølgen for aktivering av disse genene er viktige. F.eks vil det være liten vits å ødelegge bakteiens cellevegg før nye virus er blitt dannet. Derfor har ambda utviklet et genreguleringssystem som er blitt nøye studert.

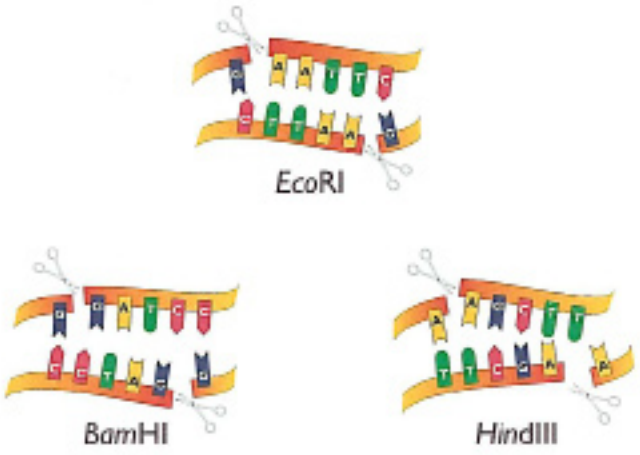


Figur 1: Syklusskifte hos Lambabakteriofagen



Figur 2: Noen av lamdas gener

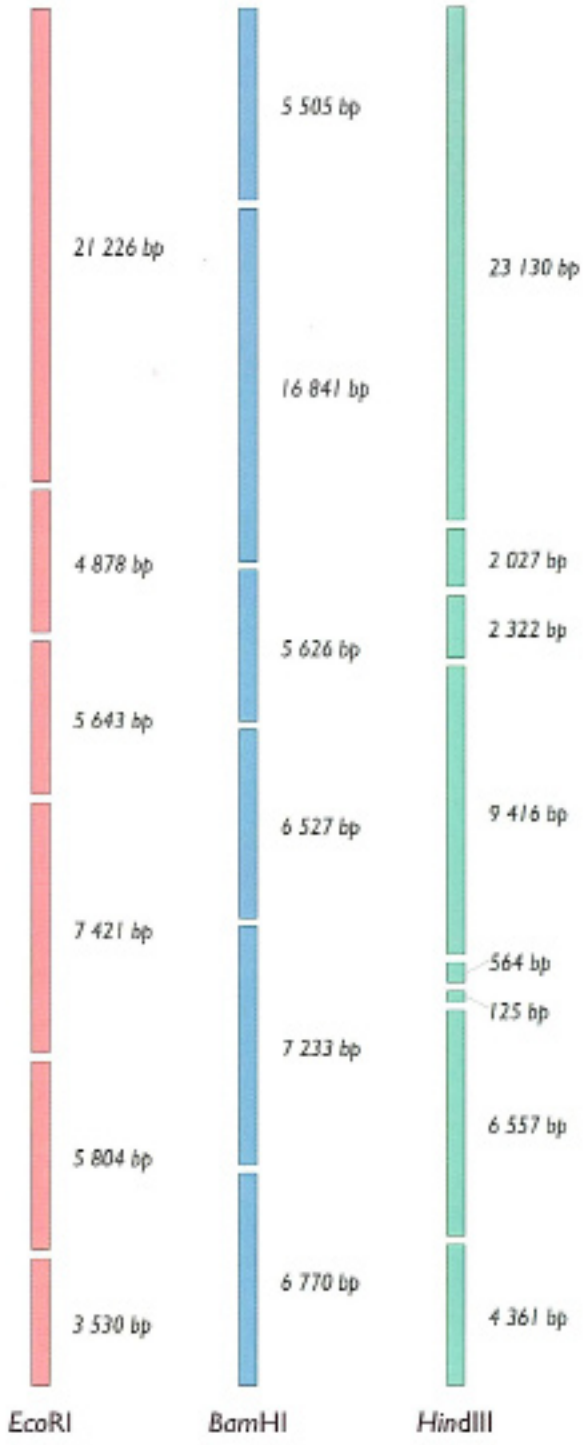
Det kreves relativt lite av lambdas genom for å pakke inn DNA og få det inn i bakteriecellen. Ca. 20 000 basepar kan bli slettet fra dens sentrale områder og bli erstattet med DNA fra andre organismer uten negative konsekvenser. Flere former av lambda benyttes av molekylærbiologer til å overføre nye gener til bakterier.



Figur 3: Forskjellige restriksjonsenzymer klipper ved spesifikke basesekvenser

Restriksjonsenzymer

Restriksjonsendonukleaser er enzymer som gjenkjenner og kutter dobbelttrådet DNA-molekyler på spesifikke basesekvenser. Enzymene blir dannet av bakterier som forsvar for å forhindre bakteriofager i å formere seg inne i bakterien. Bakteriens eget DNA blir imidlertid beskyttet ved at en metylgruppe ($-CH_3$) er festet til enten adenosin eller cytosin basen på det spseifikke stedet som enzymet normalt gjennkjenner (figurene over viser gjennkjenningsseter for tre slike enzymer).



Figur 3: Restriksjonskartet viser hvor et spesifikt enzym klipper. Tre kart for hele lamda genomet er vist her. Fragmentenes størrelse er vist i basepar (bp).

Restriksjonsenzymene har fått navn etter hvilken bakterie de er isolert fra (f.eks. *Eco*RI fra *Escherichia coli* art RY13). Nummeret I indikerer at dette er det første restriksjonsenzymet som er funnet i *E.coli*. *Bam*HI er isolert fra *Bacillus amyloliquenfaciens* H (nummer I indikerer igjen at dette stammer fra første enzym funnet i bakterien).

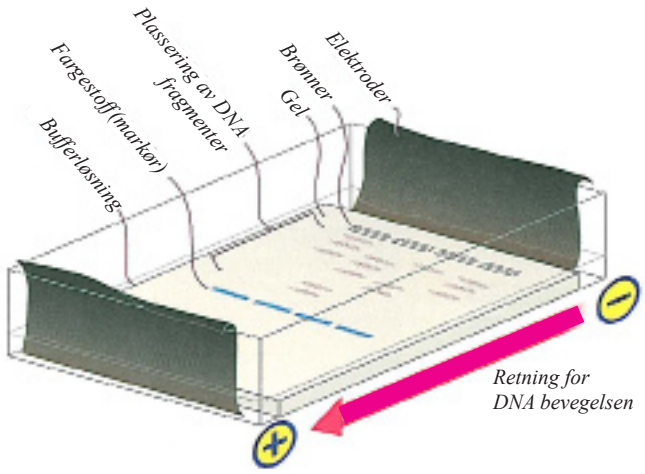
*Hind*III produseres fra *Haemophilus influerzae* R_d. Her vil tallet III referere til det tredje restriksjonsenzymet isolert fra *H. influerzae*.
Mange restriksjonsenzym blir i dag isolert fra genmodifiserte bakterier som gir høyt utbytte.

Gelelektroforese

Gelelektroforese kan benyttes for å separere DNA sekvenser av ulik størrelse.

Først støpes en gel laget av agarose (utvinnes fra alger fra havet), som er elektrisk nøytral. Derfor benytter vi en buffer som vi heller over gelen. Det er ioner i denne bufferen som leder elektrisitet under elektroforesen. DNA molekylene er negativt ladet. Dette skyldes at DNA molekylet inneholder negativt ladet fosfatgrupper. I gelen er det porer som DNA-sekvensene vandrer gjennom når det settes på strøm. De negativt ladde partikler vil vandre fra den negative mot den positive polen i gelen. Porene er en hindring for store DNA-sekvenser slik at DNA vandrer gjennom gelen med ulik hastighet avhengig av størrelsen.
I gelen plasserer man DNA prøvene i brønner (lages under gelstøpingen vha en kam). Prøvene er da blandet med et fargestoff(markør (NB! selve DNA farges ikke) som gjør at du ser hva du gjør. I tillegg hjelper det deg å se progresjonen under elektroforesen. Fargen i prøvene oppfører seg som de korteste DNA-sekvensene og vil derfor vandre raskest i gelen. Du skal stoppe elektroforesen når du ser fargestoffene nærmere seg den positive siden.

Når gelelektroforesen er ferdig, farges gelen med et fargestoff som binder seg til DNA slik at DNA-sekvensene blir synlige. Hvert DNA bånd man ser på gelen består av millioner av DNA-fragmenter av samme størrelse.

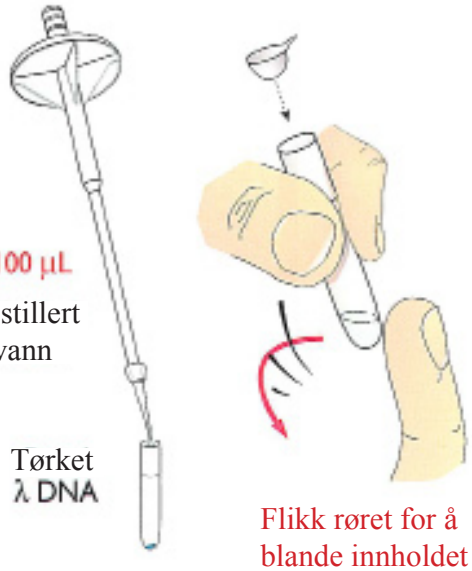


1

Mikrolitersprøyte

Spiss

2

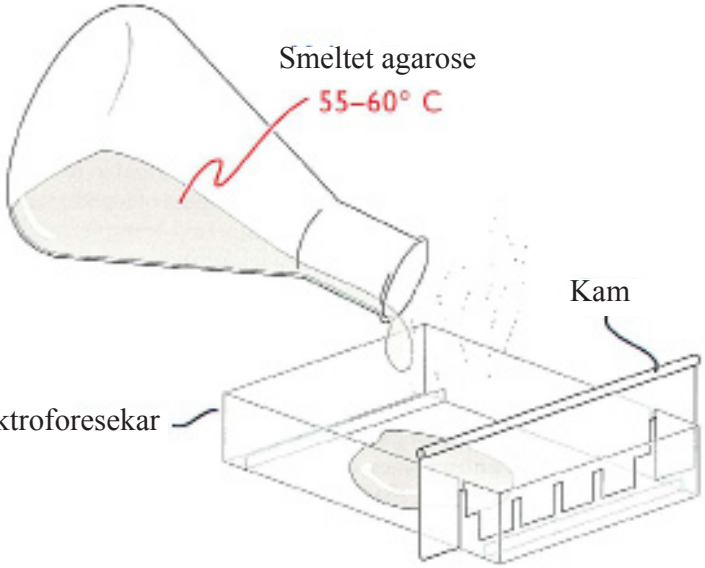


Destillert vann

Tørket λ DNA

Flikk røret for å blande innholdet

5



Smeltet agarose

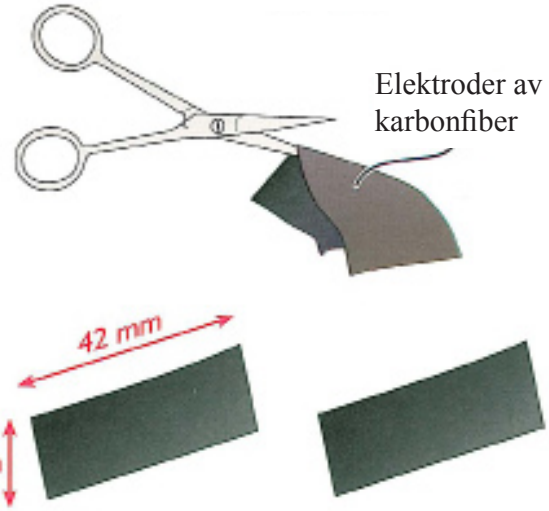
Kam

Elektroforesekar

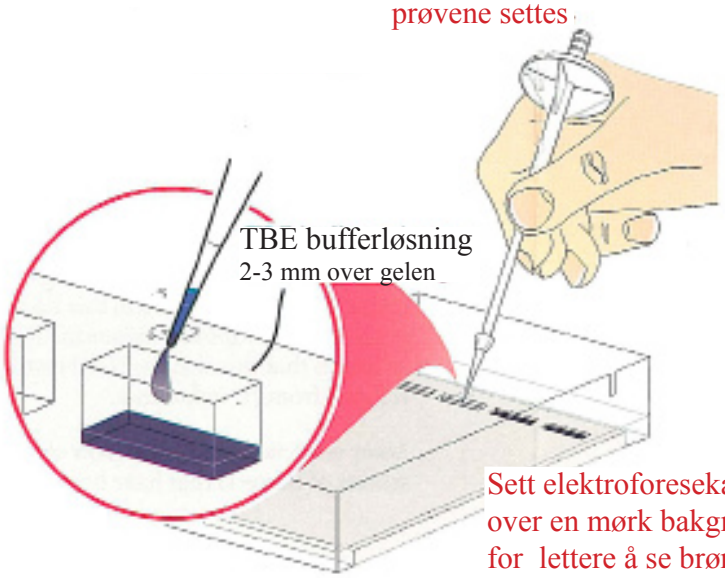
6

Farge

Bland godt før prøvene settes

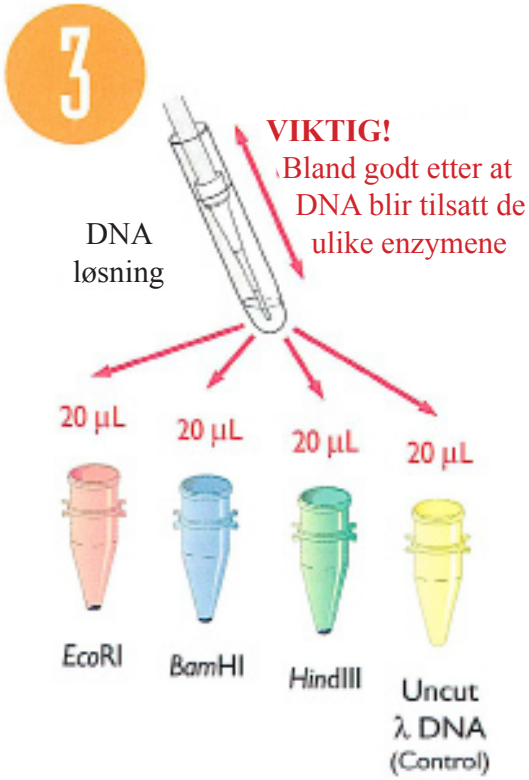


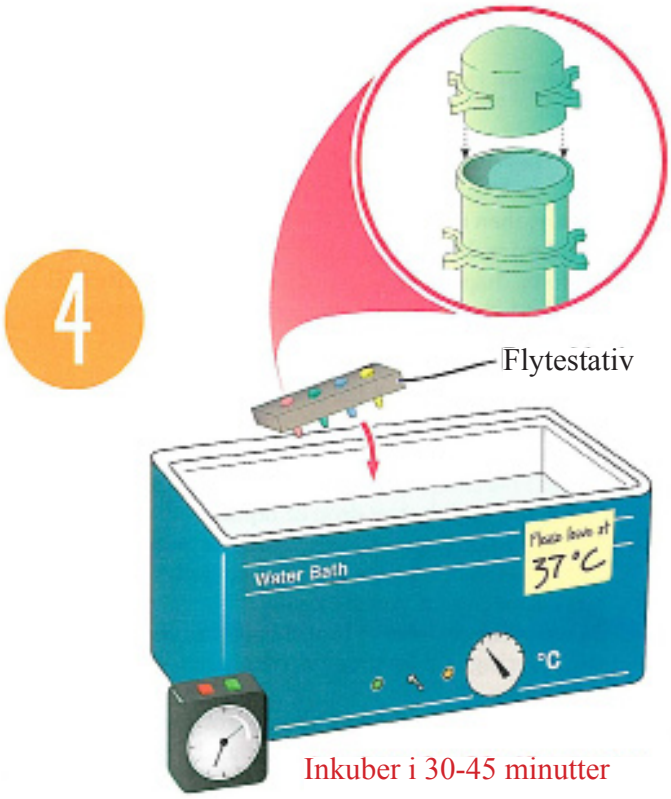
Elektroder av karbonfiber

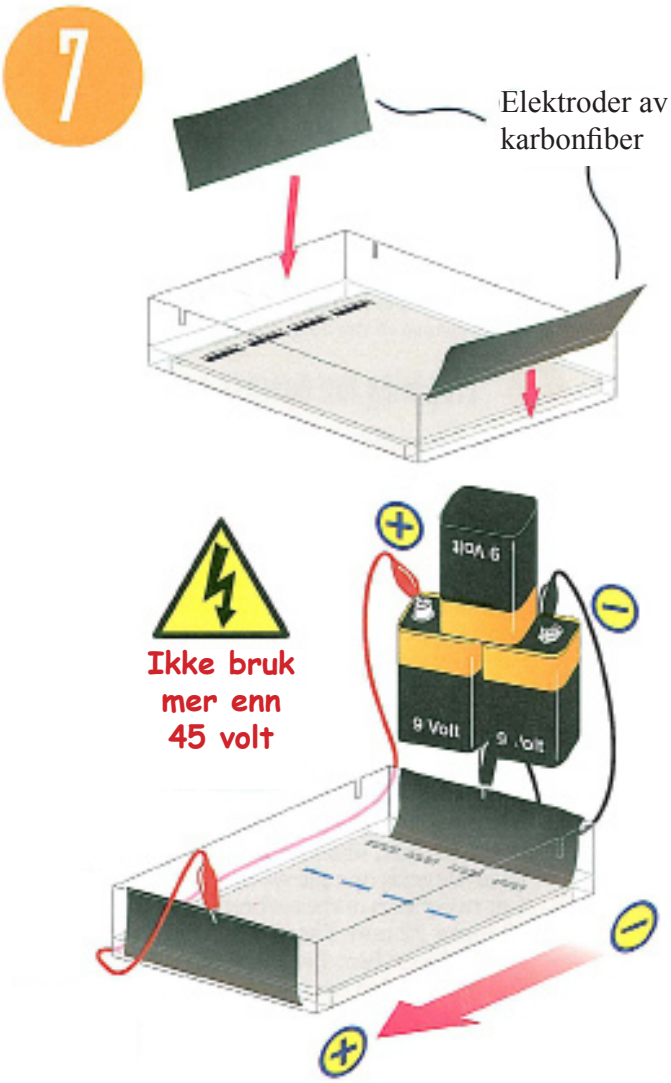


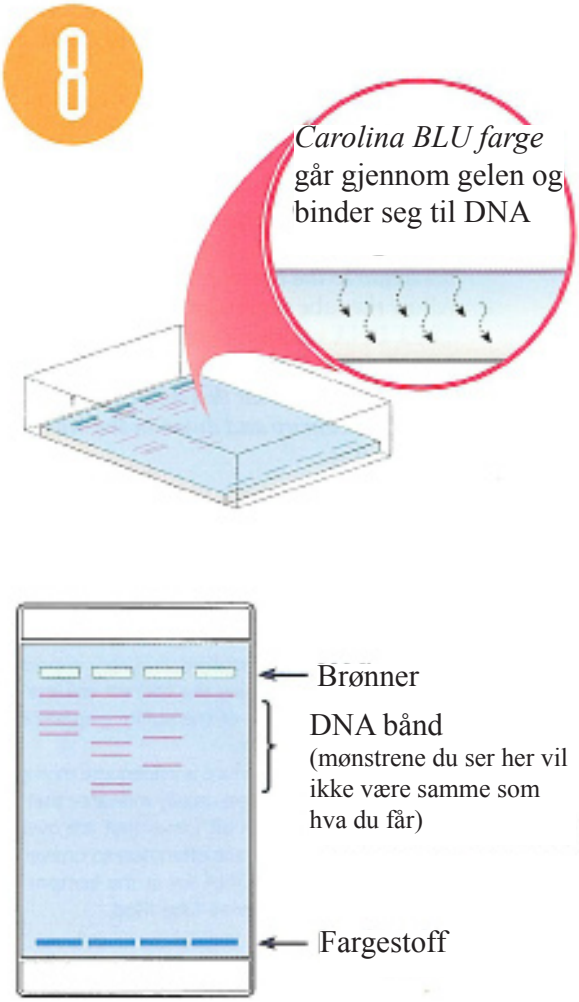
TBE bufferløsning
2-3 mm over gelen

Sett elektroforesekaret over en mørk bakgrunn for lettere å se brønnene.


3
VIKTIG!
Bland godt etter at DNA blir tilsatt de ulike enzymene
DNA løsning
20 µL
20 µL
20 µL
20 µL
EcoRI
BamHI
HindIII
Uncut λ DNA (Control)


4
Flytestativ
Water Bath
Please leave at 37 °C
°C
Inkuber i 30-45 minutter


7
Elektroder av karbonfiber
Ikke bruk mer enn 45 volt
9 Volt
9 Volt
9 Volt


8
Carolina BLU farge går gjennom gelen og binder seg til DNA
Brønner
DNA bånd
(mønstrene du ser her vil ikke være samme som hva du får)
Fargestoff

1. Hvordan bruke mikrolitersprøyten

Sprøyten som følger med i dette settet skal passe til engangsspissene. Hver spiss skal kun benyttes en gang, deretter kastes. Spissen er avmerket ved 2 og 10 mikrolieter (µL). Det kan være lurt å øve seg med noen testprøver før de virkelige prøvene benyttes.

- Dra aldri stempelet helt ut av sprøyten ettersom den kan ødelegges når den settes inn igjen.
- Sett på spissen.
- Før du fyller sprøyten skal du dra ut stempelet litt (1-2 mm), slik at du får litt ekstra luft inn som hjelper til å få ut den siste dråpen. (dersom du ikke får ut den siste dråpen, kan du avsette den ved å holde spissen inntil innerveggen på testrøret).
- Når du skal avsette væskenprøven bør du holde mikrolitersprøyten i vertikal posisjon, og samtidig være så nær at du ser godt hva du gjør.
- Forsøk å ikke vær nær spissen med fingrene dine. Det er DNA i svetten din som kan forurense og bryte ned prøvene.

2. Rehydrer det tørkede lambda DNA

1. Tilsett 100 µL destillert vann til lambda DNA. dersom du ikke har en egnet mikropipette kan du benytte mikrolitersprøyten 10 ganger ved å fylle opp til 10 µL merket.
2. Sett forsiktig lokket på røret og la det stå i ro i 5 minutter.
3. Hold øverst i røret og flikk røret med en finger gjentatte ganger for å blande innholdet. Gjør dette i omlag 1 minutt.
4. La røret stå rolig ytterligere 5 minutter. Det er svært viktig at DNA løsningen blir godt blandet. Derfor bør du bruke mikrolitersrpøyten til å suge opp og ned i mikrospissen et par ganger.

NB!
DNA festes lett til glass. Derfor benyttes det engangsspisser i plast til dette forsøket. Innholdet på 10 µg tørket lambda DNA inneholder en buffer som opprettholder stabiliteten til DNA når det kommer i løsning. Blått fargestoff er også blitt tilsatt for lettere å bestemme når DNA er blitt oppløst. Det er også svært viktig å bruke korrekt mengde med vann for å løse opp DNA. En vanlig feil er ufullstendig oppløsning av DNA. Det er derfor svært viktig å blande godt.

3 og 4. Kutte DNA med restriksjonsenzymer

1. Sett på en ny spiss på mikrolitersprøyten. Overfør 20 µL lambda DNA løsning til et av plastrørene med restriksjonsenzym (se fargekode under for de ulike enzymene). Bland DNA løsningen og det tørkede enzymet ved å suge væsken forsiktig opp og ned i røret et par ganger.
2. Gjenta for hvert av enzymene, også for det gule "kontroll" røret. Bruk en ny, ren spiss for hver gang.
3. Sett passende farge lokk på hvert av rørene.
4. Sett rørene i flytestativet (kan klippes opp silk at hver gruppe for hvert sitt stativ). Inkuber ved 37 °C (i vannbad eller varmeskap/bakteriologiskap) i 30-45 minutter.
5. Plasser så rørene på vannbad ved 65 °C i 10 minutter for å denaturere enzymene.

NB!
- Hvert rør inneholder 10 enheter med restriksjonsenzym. En enhet med enzym kutter 1 µg med lambda DNA i en time ved 37 °C.
- Restiksjonsenzymene er fargekodet:

- Enzymene har blitt tilsatt en buffer og farge akkurat som det tørkede DNA. Det er svært viktig å tilsette korrekt mengde væske til enzymene og blande godt. Dette skyldes at restriksjonsenzymene kan blir mindre spesifikke dersom de beyttes med uriktig blandingsforhold.

5. Klargjør agarosegelen

- Bruk en mikrobølgeovn, varmeplate eller vannbad for å smelte agarosegelen (0,8% i TBE buffer). Rør underveis dersom du varmer opp på plate, eller vannbad. Det skal ikke være klumper i den smeltede agarosen. Oppbevar den på vannbad ved 55-60 °C til du trenger den.
- Plasser elektroforesekaret på et jevnt underlag. Sett ned kammen i den ene enden av karet.
- Hell omlag 10 ml smeltet agarose i midten av elektroforesekaret slik at hele fordypningen i midten er dekket. Forsøk å ikke søl agarose i endene av karet (dersom noe kommer der likevel, la det stivne før du fjerner det).
- La karet stå uforstyrret i 20-30 minutter til agarosen har stivnet.
- Klipp to biter av karbonfibertøyet, hver på omlag 42 x 22 mm. Dette skal være elektrodene på hver side av elektroforesekaret. Legg dem til side til etter du har fylt karet med agarosegel.

6. Klargjør og fyll brønnene med prøver

- Hell omlag 10-12 ml med TBE buffer løsning i elektroforesekaret. Væsken skal akkurat dekke over gelen og samtidig fylles i områdene hvor elektrodene er.
- Løs forsiktig kammen fra elektroforesekaret slik at bufferløsningen fylles i brønnene. Når du gjør dette er det viktig å være forsiktig slik at brønnene ikke ødelegges.
- Plasser elektroforesekaret på en jevn overflate hvor det kan stå uforstyrret mens elektroforesen utføres.

NB! Det kan være lurt å plassere karet på en mørk bakgrunn for lettere å se hva du gjør videre nå.

- Fest en ren gul spiss til sprøyten. Tilsett 2 µL med farge til DNA blandingen du skal bruke. Bland godt ved å suge blandingen opp og ned i pipettespissen noen ganger.
- Pipetter ut løsningen i en av brønnene. Hold spissen over brønnen, men under bufferløsningen (se illustrasjon). Vær forsiktig slik at du ikke stikker hull i brønnen med spissen.
- Noter deg hvilken DNA prøve du har plassert i hvilken brønn (plasser et papirark i front som du notere på, eller skriv direkte på boksen med en penn som kan vaskes bort).
- Repeter punktene ovenfor med resten av prøvene. Husk å bytt til en ny spiss for hver nye prøve.

7. Kjør elektroforesen

- Koble batteriene til elektrodene vha krokodilleklemmene. Batteriene (koblet i serie) skal totalt aldri gi mer enn 45 volt. Se etter at den positive enden på batteriet er koblet til elektroden som er lengst fra brønnene.

Antall 9-volt batterier	Varighet for elektroforesen	Antall elektroforeser fra ett sett nye batterier*
1	12 timer (over natten)	1
2	4-5 timer	2
3	3,5 timer	2

* *Duracell alkaliebatteri*

Dersom man kobler utstyret til en strømkilde kan det resultere i alvorlig eller dødelig elektrisk sjokk.

- La elektroforesen kjøre uforstyrret. Dersom utstyret er i et varmt tom bør man sette hele karet i en plastikkpose for å redusere fordampning.
- Batteriene frakobles med en gang fargestoffene er i andre enden fra brønnene.
- Vask og tørk krokodilleklemmene godt for å hidre korrosjon.

NB!

- Ioner i TBE bufferløsningen leder elektrisitet. Denne bufferen er basisk, og da vil fosfatgruppene i DNA være negativt ladet, og derfor bevege seg mot den positive elektroden (anoden) når det settes på strøm. EDTA i bufferen chelaterer (binder) toverdige kationer. Dette hindrer at DNA ødelegges ettersom slike ioner er nødvendige (som kofaktorer) for enzymer som bryter ned DNA.
- Fargestoffet i DNA prøvene inneholder bromfenolblått. Dette fargestoffet reagerer ikke med DNA, men vandrer gjennom gelen (litt raskere enn de minste DNA sekvensene). Sukker i fargeblandingen sørger for at både DNA og bromfenolblått synker til bunns i brønnen.
- Ved å benytte høy spenning vil DNA sekvensene vandre raskere gjennom gelen, men DNA båndene vil ikke separeres og bli like tydelige.

DNA staining (farging)

- Fjern elektrodene og hell av bufferløsningen (bufferen kan benyttes flere ganger, men ikke i det uendelige).
- Ta på deg engangshansker slik at du ikke får fargestoffet på huden din.
- Hell omlag 10 ml av DNA-staining løsningen (*Carolina BLU consentrate*) over geloverflaten.
- Lå det stå i ro i nøyaktig 4 minutter før du da heller løsningen over i en flaske (*Denne kan benyttes flere ganger, men etter flere gjenbruk kan det være den må sitte lengre enn 4 minutter).*
- Vask geloverflaten forsiktig med kaldt vann. Gjennta vaskingen 3-4 ganger for å fjerne alle rester. Bruk helst destillert eller ionisert vann ettersom dette vil bevare DNA båndene lengre.
- Putt elektroforesekaret i en plastpose, slik at gelen ikke tørker ut, og la den utvikle seg til neste dag.
- Neste dag, bør du avfarge gelen igjen. Denne gangen ved å la "vaskevannet" bli værende i karet og skiftet det omtrent 4 ganger (en gang hver 2. time). Dette vil gradvis vaske bort all "bakgrunns" farge.

NB!

- Ukuttet DNA vandrer svært kort i gelen, og danner dermed et enkelt tykt bånd.
- DNA kuttet med restriksjonsenzym vil danne særpregede bånd av kjent størrelse (se s. 3).
- Fargede geler kan oppbevares uendelig dersom de oppbevares i plastpose i kjøleskap.

SIKKERHETSVEILEDNING

DNA
DNA materialet som følger med i dette settet er absolutt sikkert for skolene å benytte. Ingen levende organismer benyttes, slik at det ikke er nødvendig å benytte strenge sterile teknikker. Likevel er det viktig å følge gode rutiner slik at man hindrer kryss-forurensning mellom prøver. Dersom det søles DNA skal det tørkes opp skikkelig. Brukte prøverør og spisser kan kastes i vanlig søppel.

Agarosegel
Dersom du benytter en mikrobølgeovn til å smelte agarosen må du passe på at den plasseres i en uforseglet beholder. Dersom en mikrobølgeovn ikke er tilgjengelig kan du bruke vannbad eller varmeplate istedet. Når agarosen smeltes på denne måten må du røre i den underveis for å hindre at den brenner seg fast. NB! kke bruk en laboratoriebrenner til å smelte agarosen.

Varm, smeltet agarose kan skolde huden. Den bør derfor behandles med forsiktighet.

Elektroder
Karbonfiber elektrodene kan frigi små fibre som igjen kan gi små hudirritasjoner dersom man tar mye i dem. Dersom man vet at man lett kan reagere bør man benytte beskyttelseshansker. Fibrene er imidlertid for store til å komme inn i lungene, slik at det ikke er nødvendig å benytte ansiktsmaske. I tillegg er fibrene løselige i kroppsvæske, og er fullstendig nedbrytbare.

Elektrisk tilkobling
Dette elektroforeseutstyret skal kun benyttes med lav spenning (≤ 45V) med tørrcellebatterier. Ikke under noen omstendigheter må denne spenningen overstiges, ettersom de elektriske komponentene ikke er isolert fra brukeren.

Dersom man kobler utstyret til en strømkilde kan det resultere i alvolig eller dødelig elektrisk sjokk.

DNA stain (Carolina BLU consentrat)
DNA fargen er *Carolina BLU konsentrat*. Når den benyttes som anvist vil den ikke representere noen sikkerhetsfarer. Likevel bør en vise hensyn slik at den ikke kommer i kontakt med hud eller øyne, bruk f.eks beskyttelsesbriller og engangshansker. Brukt DNA stain kan fortynnes med vann og skylles ut i avløp.

TBE bufferløsning (Tris-Borate-EDTA)
Når løsningen fortynnes og benyttes som beskrevet vil løsningen ikke representere noen sikkerhetsfare. Brukt bufferløsning kan skylles ut i avløp.

Tilleggsinformasjon
Mer informasjon om sikkerhet knyttet til det praktiske arbeidet med DNA kan finnes i følgende artikkel:

Horn, T.M. (1992). *Working with DNA and bacteria in a pre-college science classro*m.
National Association of Biologi Teachers

Og på NABT sin hjemmeside:

http://www.nabt.org/

Annen nyttig informasjon samt instruksjon for å tilpasse utstyret til bruk for studenter med svekket syn kan finnes på NCBE og Carolinas web sider:

www.reading.ac.uk/NCBE
www.carolina.com

PLEASE NOTE

The manufacturers of this product have made every effort to check that recognized hazards have been identified and that suitable precaution are suggested. Where possible, the proposed procedures are in accordance with commonly adopted general risk assessments. If a special risk assessment may be necessary, this has been indicated. However, users should be aware that errors and omissions can been made, and that different employers and educational authorities adopt different standards. Therefore before initiating any activity, users should always carry out their own risk assessment. In particular any rules issued by employers and educational authorities MUST be obayed, whatever else is suggested by the manufacturers.

VIDERE LESNING

Kreuzer, H. and Massey, 1996. *Recombinant DNA and biotechnolgy: A guide for Teachers*, American Society for Microbiology Press, Washington, DC. See Chapter 18 and 24.

Mullis, K., 1990. *The unusual origin of polymerase chain reaction*. Scientific American 262(4): 56-65.

Nowak, R., 1994. *Forensic DNA goes to court with O.J.* Science 265:1352-1354.