Navn: _____

Dato: _____

Restriksjons- og DNA-analyse

Bakgrunnstoff

Bioteknologi er en fellesbetegnelse for ulike teknologier som alle benytter biologisk materiale til å lage nyttige produkter. En av disse teknologiene kalles genspleising eller rekombinant DNA-teknologi, og skjer ved å spleise eller rekombinere genetisk materiale fra ulike kilder. Dette skjer ofte i naturen, og er i så måte med på å sikre genetisk variasjon hos en art. Med oppdagelsen av såkalte restriksjonsenzymer, som kutter opp DNA i mindre fragmenter, er dette idag også mulig å gjøre i et laboratorium. I denne øvelsen skal du kutte opp genomet hos bakteriofagen lamda, og ved hjelp av elektroforese skal du deretter separere og visualisere DNA-fragmentene.

Restriksjonsenzymer

Restriksjonsenzymer er proteiner som produseres av bakterier for å hindre invasjon av fremmed DNA (f.eks virus). Restriksjonsenzymene kutter opp det fremmede DNA`et i småbiter, slik at det ikke lengre fungerer. Et restriksjonsenzym gjenkjenner en spesifik dobbelttrådet DNA-sekvens, og kutter/kløyver DNA på spesifikke steder kalt restriksjonsseter. Det finnes mange tusen kjente restriksjonsenzymer, som alle kutter på en spesifik nukleotidsekvens som er unik for hvert enzym. Restriksjonsseter er ofte mellom 4 og 6 basepar (bp) lange, og som regel symmetriske. Slike symetriske sekvenser kalles palindromer, dvs at basesekvensen er identisk i begge ender når man leser fra 5' til 3' enden. For eksempel er sekvensen under her et palindrom:

5'....GAATTC....3'
3'....CTTAAG....5'

Sekvensen over er også restriksjonssetet for restriksjonsenzymet *Eco*RI. Navnet på restriksjonsenzymet er satt sammen av første bokstav i slektsnavnet og de to første bokstavene i artsnavnet til bakterien de er isolert fra. Disse skrives i kursiv. Dette vil i enkelte tilfeller etterfølges av første bokstav i bakteriestammen den er isolert fra. Dersom det er flere restriksjonsenzymer isolert fra samme bakteriestamme skilles disse ved bruke av romertall etter når de ble funnet. Så *Eco*RI kommer fra bakterien escherichia coli, stamme RY13, restriksjonnummer I.

*Eco*RI kutter DNA-tråden mellom G og A i den spesifikke DNA-sekvensen, slik pilene under viser:

*Eco*RI

5'....GAATTC....3'
3'....CTTAAG....5'

5'....G AATTC....3'
3'....CTTAA G....5'

Etter at DNA-tråden er blitt kuttet opp av restriksjonsenzymet holdes de to delene kun sammen av svake hydrogenbindinger mellom de to trådene. Disse bindingene er så svake at de to delene skiller lag. De fleste enzymer kutter DNA-trådene slik at det dannes et kort enkelttrådet overheng i 3'-endene. Disse endene kalles "klebrige" fordi de er komplementære og er enkle å skjøte med andre klebrige ender. Ikke alle restriksjonsenzymer danner klebrige ender, noen danner rette ender uten overheng, f.eks *Hae*III:

*Hae*III

5'....GGCC....3'
3'....CCGG....5'

5'....GG CC....3'
3'....CC GG....5'

Kutting av et DNA-molekyl med restriksjonsenzymer gir et unikt mønster av DNA-fragmenter som kan synliggjøres ved hjelp av gelelektroforese. Dette mønsteret kalles et genetisk fingeravtrykk (eller DNA-profil) og er unikt for et spesifikt DNA-molekyl kuttet med et spesifikt restriksjonsenzym.

I dette forsøket skal du studere DNA fra lamda bakteriofag, og kuttet dette med restriksjoneenzymene *Bam*HI, *Eco*RI og *Hind*III. Lamda er en bakteriofag, et virus som kun infiserer bakterier, og bakteriofagen lambda infiserer E.coli bakterier. Lambda har et relativt lite genom (48 502 basepar langt). At lambda er en såpass enkel organisme, og som er enkel å fremstille på et laboratorium, gjør denne til en egnet organsime å benytte i undervisningsforsøk.

Gelelektroforese

Elektroforese er en metode som brukes til å separere stoffer hvor molekylene er elektrisk ladd (som regel proteiner, DNA eller RNA). Sender man elektrisk strøm gjennom en gel vil molekylene bevege seg med forskjellig hastighet og retning mot en av elektrodene (avhengig av molekylenes ladning, størrelse og form).
Ved gelelektroforese av DNA kan vi bruke en gel som er laget av agarose som er et polysakkarid. Agarosen løses i en bufferløsning, varmes opp, avkjøles og helles i elektroforesekaret. Når agarosen kjøles ned stivner den og danner en gel. I gelen er det porer som DNA-bitene vandrer gjennom når det settes strøm på gelen. Når gelen kjøres i et elektroforesekammer er den røde elektroden positivt ladd, mens den svarte elektroden er negativ ladd. Et negativt ladd molekyl som DNA, vil da vandre i gelen mot den positive elektroden.
Porene i gelen er en hindring for store DNA-biter slik at DNA-fragmentene vandrer gjennom gelen med ulik hastighet avhengig av hvor store de er.

Agarosegelen kjøres i en bufferløsning. Bufferløsningen har som oppgave å opprettholde det elektriske feltet som dannes når gelen tilsettes spenning.

Når gelelektroforesen er ferdig, farges gelen med et fargestoff som binder seg til DNA, slik at DNA-bitene blir synlige og danner et mønster.

Spørsmål til bakgrunnsinformasjonen:

1. Fra hvilken organsime stammer DNA du skal benytte i denne laboratorieøvelsen?
2. Hva er et restriksjonsenzym?
3. Hvor kommer restriksjonsenzymer fra, og hvilken rolle spiller de i naturen?
4. Hva vil vandre raskes i en gel; store eller små DNA-fragmenter?
5. Hva viser en elektroforese av DNA kuttet med restriksjonsenzymer?
6. Du har to ulike bakteriofager med ulikt genom. Vil deres finger-avtrykk på en gelelektroforses være likt eller ulikt dersom begge er kuttet med restriksjonsenzymet *Bam*HI? Forklar.

Navn: _____

Dato: _____

Restriksjons- og DNA-analyse

Introduksjon

I dette forsøket skal du kutte DNA (fra bakteriofagen lamda med 48 502 basepar) med restriksjonsenzymer. Restriksjonsenzymer kutter opp lamda-DNA i fragmenter mellom gitte basepar. Fragmentene skal så separeres ved å kjøre en gelelektroforese. Tre prøver med lamda-DNA blir inkubert ved 37 °C med hvert sitt restriksjonsenzym; *Bam*HI, *Eco*RI og *Hind*III. En fjerde prøve, kontrollprøven, inkuberes uten restriksjonsenzym.

Etter inkubasjon overføres DNA-prøvene til brønner i en elektroforesegel. Ved å sette på strøm vil vi få dannet et elektrisk felt i gelen, og de negativt ladde DNA-molekylene vandrer fra den negative polen (hvor prøvene avsettes) til den posive polen. Små DNA-fragmenter vandrer raskere enn større DNA-fragmenter, slik at fragmentene av ulik størrelse blir konsentrert i separate bånd under elektroforesen. Det karakteristiske antallet og mønsteret på båndet som produsereres av hvert restriksjonsenzym, er et såkalt "DNA-fingeravtrykk". Når gelelektroforesen er ferdig, farges gelen med et fargestoff som binder seg til DNA, slik at DNA-fragmentene og mønstrene blir synlige.

Fremgangsmåte

A. Restriksjonskutting

1. Du har fått utlevert 4 ulike prøverør. Tre av disse inneholder restriksjonsenzymer, mens det fjede røret, kontrollrøret, inneholder ikke enzymer. Prøverørene har følgende fargekoder;

*Eco*RI	Rosa rør
*Bam*HI	Blått rør
*Hind*III	Grønt rør
Ikke enzym	Gult rør

   Enzymene inneholder et fargestoff slik at de skal være enkle å observere. De kommer i dehydrert form i bunnen av hvert rør.
2. Tilsett 20 µL DNA til hvert prøverør. Bland det dehydrerte enzymet med DNA ved å pipettere DNA opp og ned i røret flere ganger. Etter blanding plasseres røret stående.
3. **Gjenta denne prosedyren for alle de fire rørene. Bruk en ny pipettespiss for hvert rør for å unngå kontaminering (forurensing) mellom prøverørene.**
4. Sett på lokk på alle de fire rørene, og inkuber dem i minimum 20 minutter ved 37 °C.

B. Støping av agarosegel

1. Forsegl endene på gelkaret og plasser kammen oppi karet. Plasser gelkaret et sted hvor det kan stå uforstyrret i min 20 minutter før du gå videre til neste steg.
2. Hell agaroseløsningen forsiktig oppi karet til ca 5 mm i høyden. Løsningen skal bare dekke omlag 1/3 av høyden på "tennene" i kammen. Bruk en pipettespiss eller tannpirker for å fjerne evt. store bobler og lignende mens gelen fremdeles er flytende.
3. Gelen vil bli matt etterhvert som den stivner. Ikke flytt eller beveg på karet under prosessen. Gelen vil stivne i løpet av ca. 20 minutter.
4. Når agarosegelen er stiv fjernes forseglingene i endene. Dra kammen forsiktig rett opp for å unngå rifter i gelveggene. Plasser så karet i gelelektroforesekaret slik at kammen er ved den negative enden (markert svart).
5. Fyll så karet med 1x TBE-buffer til et nivå slik at hele agarosegelen blir dekt. Sjekk at alle brønnene blir fylt med buffer (et 5 mm lag med buffer over gelen er passe).

NB! Dersom dere har tid, og du har fått beskjed fra læreren din kan dere inkubere prøvene 10 minutter på vannbad ved 65 °C. Dette er ikke nødvendig, men kan ha betydning for om alle båndene blir synlige i gelen.

C. Applisering av prøvene i gelen

1. Tilsett 2 µL med fargestoff (loading dye) til hvert rør. Bland fargestoffet godt ved å pipettere innholdet opp og ned noen ganger. **Gjenta for alle rør, og bruk en ny pipettespis for hvert rør.**
2. Dunk rørene flere ganger mot benken, eller sentrifuger kort i en mikrosentrifuge (krever overgang til 0,2 ml rør). Dette gjøres også for å samle alt innholdet i bunn av røret.
3. Bruk en mikropipette for å overføre innholdet i hvert rør til en brønn i gelen. Merk hvilken prøve som avsettes i hvilken brønn. **NB! Bruk samme rekkefølge som vist i figur 1. Bruk en ny pipettespiss for hver prøve.**
   a. Bruk begge hendene for å holde pipetten stødig over brønnen hvor prøven skal avsettes.
   b. Fjern eventuell luft i mikropipetten før prøven appliseres.
   c. Dypp pipetten ned i bufferen og hold pipettespissen over brønnen. Avsett prøven sakte. Sukrose som er tilsatt i fargestoffet er tyngre enn bufferen og gjør at prøven synker til bunns i brønnen. Det er viktig at du ikke stikker pipettespissen for langt ned slik at du stikker hull på brønnen.

D. Elektroforese

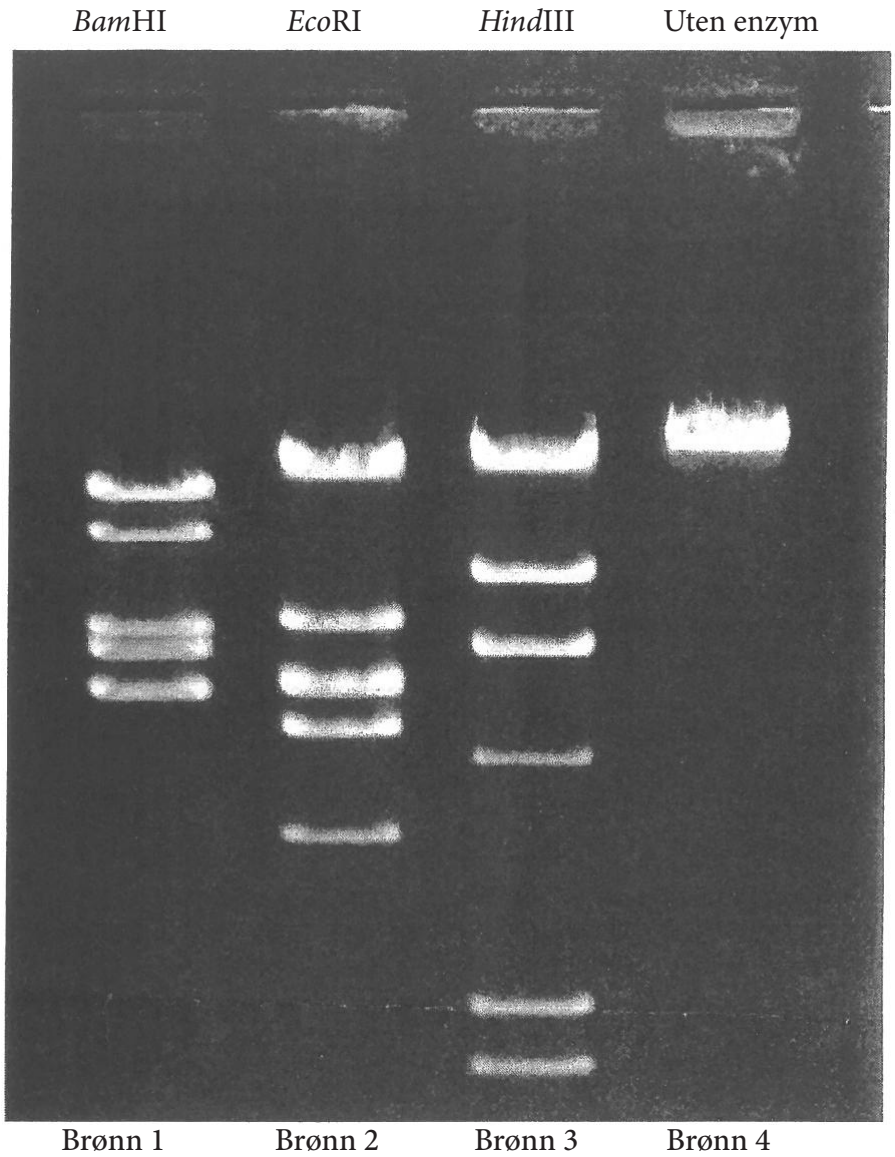
1. Sett på lokket på elektroforesekaret, og koble til spenningskilden. Husk anode til anode (rødt til rødt/+) og katode til katode (svart til svart/-). Sjekk også at begge ledningene er koblet til samme strømuttak på strømkilden.
2. Sett på strømkilden etter anvisning fra din lærer. Når elektroforesen er i gang dannes det små bobler rundt elektrodene og DNA-fragmentene starter å vandre mot den postive elektroden.
3. Det blå fargestoffet som er tilsatt DNA-prøvene vandrer i en hastighet tilsvarende et DNA-fragemnt på 300 basepar.
4. La elektroforesen gå til fargestoffet er nesten helt i enden av gelen. La evt læreren din hjelpe til med å stoppe gelen i tide. Normalt vil det ta 50-60 minutter å kjøre denne gelen med en spenning på rundt 120 V.
5. Når elektroforesen er ferdig slås strømkilden av og ledninger kobles fra. Ta av lokket av elektroforesekaret.
6. Forsiktig løftes gelkaret, og gelen overføres til et fargekar som merkes med ditt gruppenavn.
7. Mål avstanden som fargestoffet har vandret i gelen og fyll inn svaret under. Dette gjøres ved å måle avstanden fra fremre del av brønnen til fremre del på fargebåndet (fargebåndet nærmest enden).
   Avstand (i cm) migrert for fargebånd: _____
8. Ta med gelen til læreren din for videre instruksjon av farging/avfarging av gelen for å få frem DNA-båndene.

Dataanalyse

Mål: Du skal nå bestemme størrelsen til DNA-fragmentene i gelen din.

Studer gelen din og sammenlign den med den ideelle gelen i figur 1 på neste side. Matematiske modeller er blitt utviklet for å finne forholdet mellom molekylvekten av et DNA-fragment og dens mobilitet (hvor langt det vandrer i en gel). Generelt kan man si at den relative migrasjonslengen (R_f) til et DNA-fragment i en gel er omvendt proporsjonal med logaritmen til molekylvekten (baseparlengden) til DNA-biten. Dvs at jo lavere molekylvekten er for DNA-fragmentet, jo lengre vandrer det i gelen. Dette gir et lineært forhold som danner grunnlag for en standardkurve.

Størrelsen på DNA-fragmentene kan bestemmes ved å finne den relative migrasjonslengden (R_f) til de ulike fragmentene (fra brønn 1 og 2) og sammenligne dem med kjente DNA-fragmenter i en DNA-standardprøve (brønn 3) hvor dere vil få opplyst hva molekylstørrelsen er (gitt i antall basepar). Brønn 4 benyttes kun som en kontroll.



Figur 1 Ideel gel

1. <u>Lag en standardkurve:</u> Mål avstanden de ulike DNA-fragmentene som er blitt kuttet med *Hind*III restriksjoneenzym (brønn 3) har vandret i gelen. I hvert tilfelle måles avstanden fra fremre del av brønnen til fremre del på båndet i gelen. Sett inn resultatet i tabell 1. Du skal så finne den relative migrasjonslengden (R_f) for hvert DNA-fragment, og sette inn resultatet i *Tabell 1* på neste side.

$$R_f = \frac{\text{avstand DNA-fragmentet har vandret}}{\text{avstand fargebåndet har migrert}}$$

<u>f.eks</u>
dersom fargebåndet migrerte 6 cm i gelen, og du skal finne R_f for en fragment som har migret 3 cm i gelen vil du få;

$$R_f = \frac{3}{6} = 0{,}5$$

Lag en standardkurve basert på *Hind*III på semilogaritmepapiret bakerst i hefte. Baseparlengden er logaritmisk på y-aksen, mens R_f er på x-aksen (ikke logaritmisk). Tegn inn koordinatene for sammenfallende x- og y-verdiene som punkter i logaritmepapiret. Til slutt benyttes en linjal og tegn en best mulig linje mellom alle punktene (NB! utelat punktet for 27 491 eller 23 130 bp-fragment). Dette er nå din standardkurve.

*Hind*III kutting			*Bam*HI kutting				*Eco*RI kutting			
Migrert avstand	R_f	Reell bp	Migrert avstand	R_f	Interpol-ert bp	Reell bp	Migrert avstand	R_f	Interpol-ert bp	Reell bp
		27 491 *								
		23 130 *								
		9 416								
		6 557								
		4 361 †								
		2 322								
		2 027								
		564 * *								
		125 * *								

Tabell 1

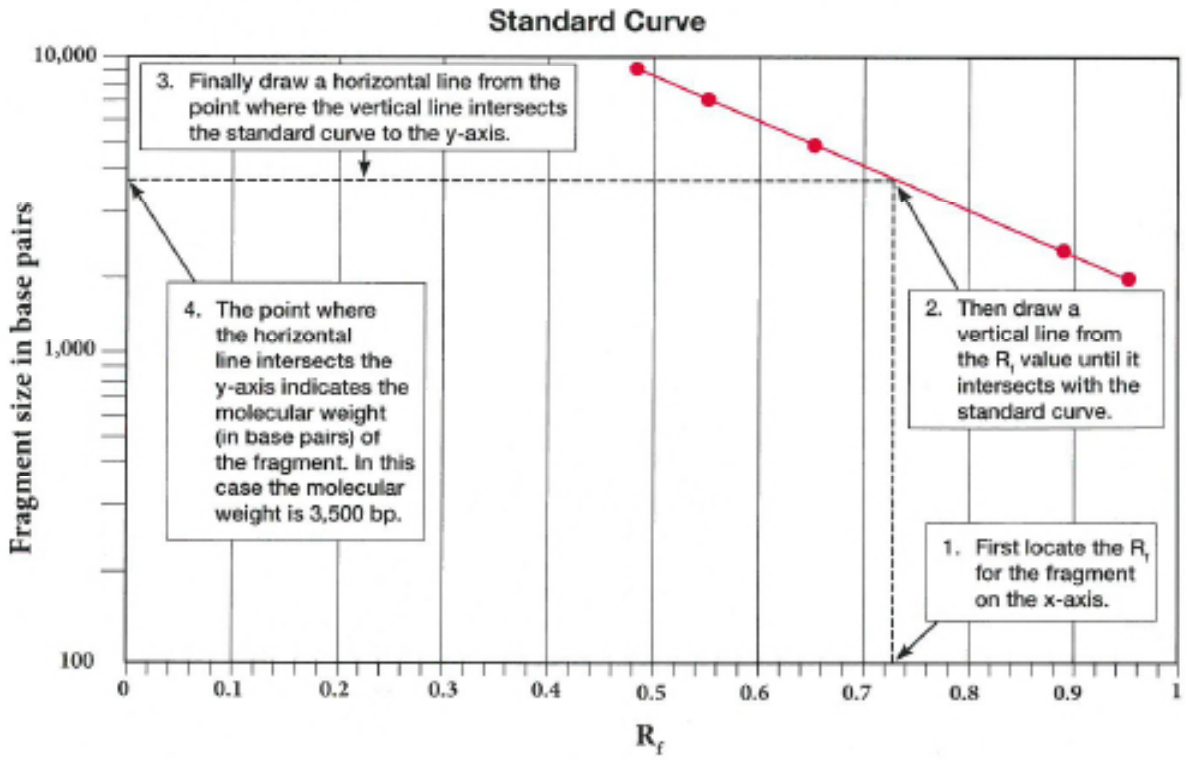
* *Baseparene vises kun som et enkelt bånd på gelen*

* * *Disse to baseparene vil ikke vises på denne gelen*

† *Vises kun dersom du gjorde oppvarming på 65 °C i 10 minutter rett før elektroforesen. NB! Båndet på 23 130 bp vil også kunne vises da.*

2. Bruk standardkurven til å finne de interpolerte baseparstørrelsene for *Bam*HI og *Eco*RI-fragmentene. Med interpolert størrelse mener vi størrelsen funnet ved hjelp av standardkurven.

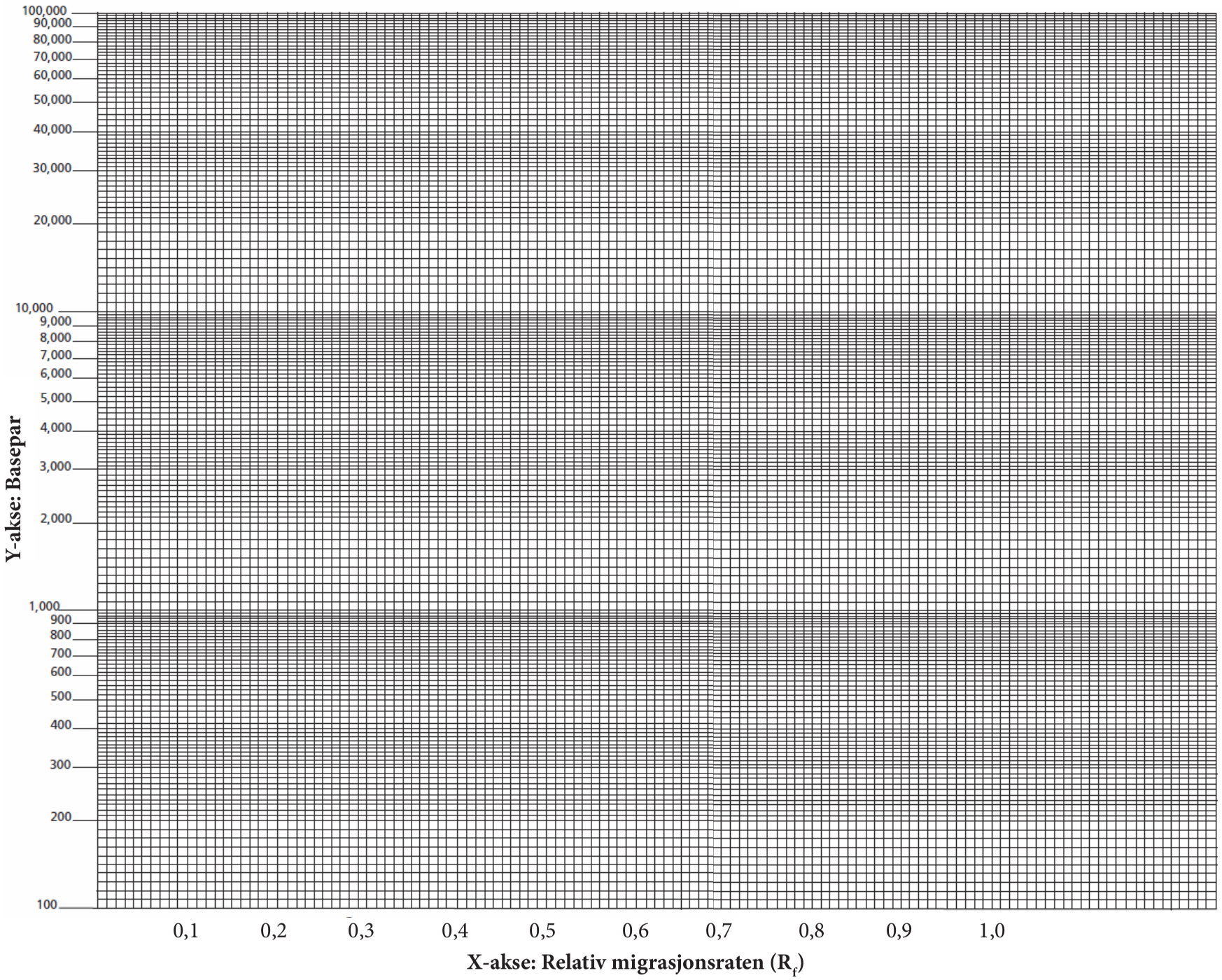
- På x-aksen finner du R_f-verdien av det første *Eco*RI-fragmentet. Bruke en linjal og tegn en vertikal linje opp til standardkurven.
- fra dette punktet på standardkurven bruker du linjalen for å trekke en horisontal linje til y-aksen. Les av verdien av baseparstørrelsen på y-aksen. Dette tilsvarer den interpolerte størrelsen av fragmentet. Figur 2 viser eks. på hvordan man finner størrelsen på et DNA-fragment med en R_f-verdi på 0,724.
- gjenta prosedyren for hvert *Bam*HI og *Eco*RI-fragment. Noter de interpolerte bp-størrelsene i tabel 1.



3. Når du har fått skrevet ned alle de interpolerte verdiene vil læreren din opplyse om de reelle eller virkelige størrelsene på DNA-fragmentene (oppgitt i basepar). Skriv inn disse verdiene i tabell 1. De reelle verdiene vil variere noe i forhold til interpolerte verdiene.

Resultater og diskusjon

1. Hvorfor fikk du beskjed om å utelate datapunktene for fragmentene på 27 491 og 23 130 basepar når du skulle lage en standardkurve? Hvordan tror du de interpolerte verdiene villa blitt påvirket av å ha dem med?
2. Hvorfor ble restriksjonsenzymene inkubert ved 37 °C?
3. Du appliserer prøvene dine i gelen og kobler til spenningskilden og sjekker at du har stilt inn på korrekt spenning. Så forlater du rommet i 10 minutter og når du kommer tilbake er det ingen tegn på fargestoffet (loading dye) noensteder på gelen. Du vet du har benyttet korrekt konsentrasjon av bufferen. Hva kan du ha gjort galt?
4. Se på bildet av den ideelle gelen i figur 1, og sammenlign med din gel. Kan du forklare eventuelle forskjeller i seperasjon, intensitet og mønstre?


100,000
90,000
80,000
70,000
60,000
50,000
40,000
30,000
20,000
10,000
9,000
8,000
7,000
6,000
5,000
4,000
3,000
2,000
1,000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
Y-akse: Basepar
0,1
0,2
0,3
0,4
0,5
0,6
0,7
0,8
0,9
1,0
X-akse: Relativ migrasjonsraten (R_f)