

DNA HALSKJEDE

Hensikt

Hensikten med forsøket er å isolere eget DNA fra kinnceller, se hvordan det ser ut og hva det kan brukes til videre.

Bakgrunn

Det humane genomet består av omtrent 2.9 milliarder basepar. Bare 5 % utgjør genene våre som koder for proteiner. Mange av de ikke-kodende DNA-sekvensene har ukjent funksjon. Når cellene lyses (åpnes), frigjøres DNA som dermed kan isoleres og renses. DNA-ekstraksjon/isolasjon er ofte første steg i molekylærbiologiske og bioteknologiske forsøk. Isolert DNA er løselig i vann, og kan sees som en klar væske. DNA er imidlertid ikke løselig i alkohol og saltløsning, og vil da danne lange, trådaktige fibre. Når DNA først er isolert og renses, kan det oppbevares i lang tid uten at det nedbrytes. Nesten alt vev og alle kroppsvæsker (unntatt urin) kan brukes som en kilde til DNA. Vanligvis benyttes prøver fra hår, kinnceller, blod og spytt til å isolere DNA fra mennesker. DNA isolert ved metoden som benyttes i dette forsøket kan brukes til f. eks. DNA-profilering og analyse av et individs genetikk i forbindelse med medisinsk behandling eller rettsmedisin/kriminaletterforskning.

Aktuelle læringsmål

Naturfag, Bioteknologi. Forklar genetisk kode og hovedtrekkene i proteinsyntesen og gi eksempler på hvordan arv og miljø samspiller.

Biologi 1, Cellebiologi. Gjør greie for oppbygningen av eukaryote celler og forklar hvilke funksjoner ulike deler av cellen har.

Biologi 2, Genetikk. Forklar strukturen til DNA og hvordan DNA blir kopiert før cellene deler seg.



LÆRERNOTATER

I den engelske veiledningen er det beskrevet to alternative fremgangsmåter, A og B. Her har vi valgt å oversette fremgangsmåte A, som krever mindre tilleggsutstyr enn alternativ B samtidig som den gir godt utbytte av DNA. Forsøkssettet inneholder tilstrekkelig materiale til å gjøre 26 DNA-isolasjoner, enten ved fremgangsmåte A ELLER B. Dersom du ønsker å benytte fremgangsmåte B, finner du denne i den engelske veiledningen.

Utstyr

Medfølgende innhold: Lysisbuffer, NaCl-løsning, protease, Tris-buffer, FlashBlue fargeløsning, salt, prøverør med kork, sterile vattpinner, engangspipetter (1 og 3 ml), plastbeger, mikrosentrifugerør (0.5, 1.5 og 2 ml), snor. Forsøkssettet inneholder materialer til 26 elever.

Oppbevaring: Alle komponenter oppbevares ved romtemperatur.

Nødvendig tilleggsutstyr (foreslåtte varenumre i parentes): Isopropanol (8420.00-4), vannbad (0666.00), stativ til prøverør (0311.60).

Anbefalt tilleggsutstyr (foreslåtte varenumre i parentes): Hansker (0860.46-49), stoppeklokke (1485.15).

Forsøkstid

30-45 minutter

Forberedelser

1. Legg isopropanolen i fryseren dagen før forsøket. Under forsøket oppbevares den på is slik at **den er så kald som mulig. Konsentrasjonen bør være $\geq 95\%$.**
2. Tilsett 200 μ l Tris-buffer til røret med protease. La det løse seg i noen minutter, bland godt og overfør hele volumet tilbake i flasken med Tris-buffer. Bland godt og alikvoter 100 μ l til hver elevgruppe med to elever. Sett rørene på is til de skal brukes.
3. Alikvoter 3 ml isopropanol (eller etanol) til hver elevgruppe. Sett på is til de skal brukes.
4. Alikvoter 200 μ l NaCl-løsning til hver elevgruppe.
5. Alikvoter 200 μ l FlashBlue (Methylene Blue) fargeløsning til hver elevgruppe.
6. Alikvoter 1 ml lysisbuffer i de store, klare rørene med kork – ett rør til hver enkelt elev.
7. Valgfritt: Løs alle åtte saltposene i 500 ml drikkevann for å lage saltløsningen. Alikvoter 3 ml i plastbeger – ett til hver enkelt elev.

I tabellen på neste side finner du utstyr og reagenser til hver elev. Enkelte av reagensene deles av en elevgruppe.

Tabell 1. Oversikt over utstyr og reagenser til den enkelte elev/elevgruppe.

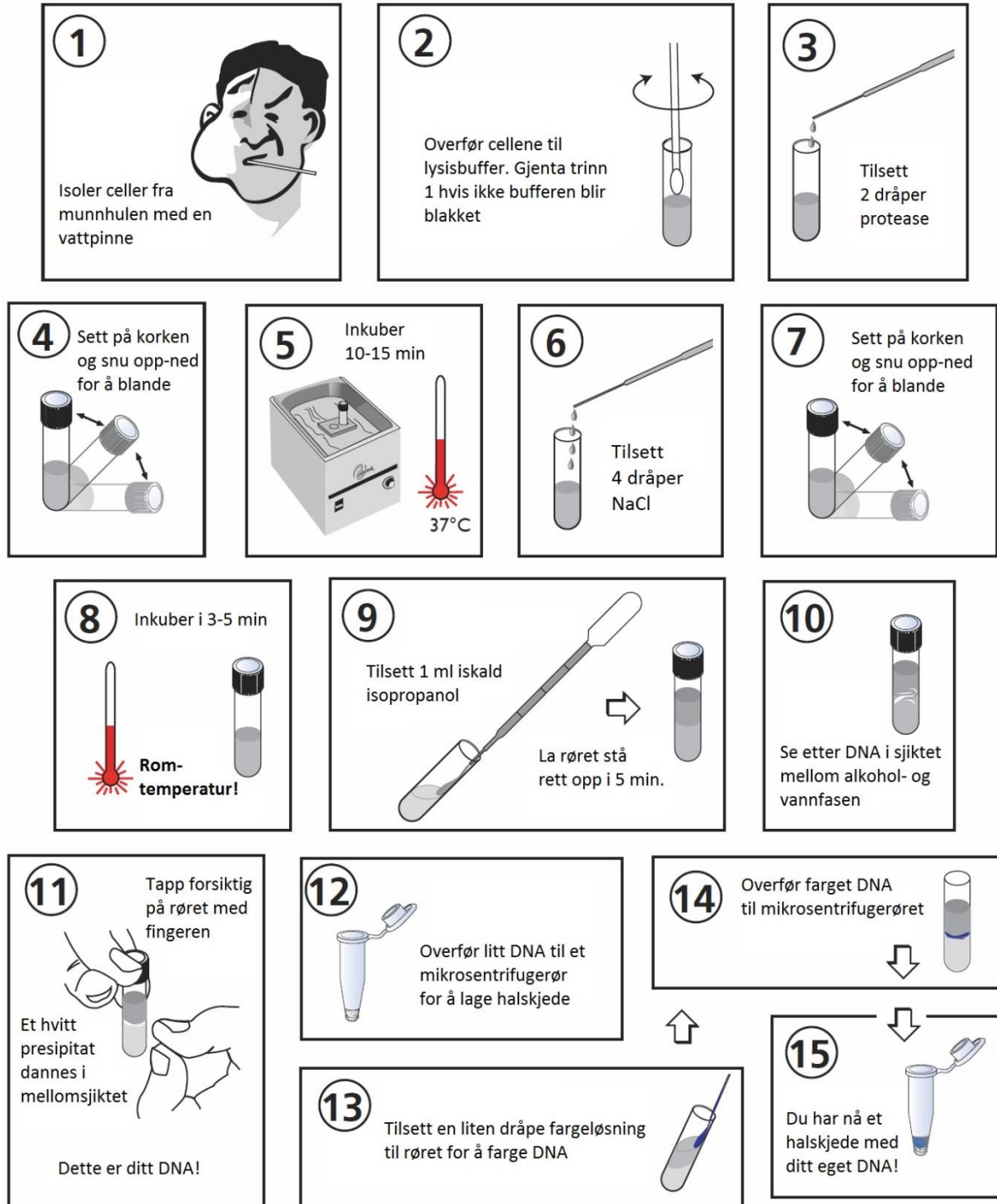
Reagenser til en elevgruppe (2 elever)	Reagenser og utstyr til hver enkelt elev
100 µl protease-løsning	1 prøverør m/ kork med 1 ml lysisbuffer
200 µl NaCl-løsning	1 pakke med to sterile vattpinner
200 µl FlashBlue fargeløsning	3 små plastpipetter
3 ml iskald isopropanol	1 stor plastpipette
	1 mikrosentrifugerør (1.5 ml) med hengslet lokk og 75 cm farget snor til halskjedet
	Eventuelt 1 plastbeger med saltløsning

Resultatanalyse og diskusjonsspørsmål – fasit

1. DNA ser ut som en klar, viskøs, vandig væske og er altså ikke synlig. Presipitert DNA ser det ut som lange, transparente eller hvite tråder.
2. DNA finnes i cellekjernen, i form av kromosomer (som består av proteiner i tillegg til DNA).
3. Menneskeceller har 46 kromosomer (23 par, 22 par autosomer og kjønnskromosomene XX eller XY).
4. Cellelysis er ødeleggelse/nedbrytning av cellemembranen slik at innholdet frigjøres.
5. Protease er et enzym som bryter ned proteiner. Det tilsettes for at DNAet ikke skal degraderes/nedbrytes av proteiner det kommer i kontakt med når cellene lyses og kjernemembranen går i oppløsning.
6. Isopropanol er en alkohol som har lavere tetthet enn vann. Derfor vil den «flyte» på toppen av den vandige DNA-løsningen.

ELEVVEILEDNING

Flytskjema – oversikt over forsøket



Utførelse

Laboratoriesikkerhet

Bruk hansker og vask hendene godt med såpe og vann etter å ha jobbet i laboratoriet.

DNA-isolasjon

Valgfritt, innledende trinn: Rens/skyll munnen godt med saltløsning i 45 sekunder. Dette hjelper å løsne flere kinncellene i munnen med vattpinnen i trinn 1.

1. Bruk en steril vattpinne til å samle celler fra munnhulen. Gni/skrap vattpinnen mot innsiden av kinnet, langs gummene og under tungen i 1 minutt - vær litt hardhendt uten at det gjør vondt.
2. Plasser vattpinnen i røret med lysisbuffer. Snurr den rundt i bufferen og press spissen mot innsiden av røret for å få overført så mye som mulig av cellene på vattpinnen til bufferen i røret. Viktig: Bufferen SKAL bli blakket/uklar. Dersom den fremdeles er klar eller lite blakket, gjentas trinn 1 og 2 med en ny vattpinne. Gjenta gjerne uansett.
3. Tilsett 2 dråper protease-løsning til røret med en liten plastpipette.
4. Sett på korken og snu forsiktig røret opp-ned omtrent 5 ganger for å blande.
5. Inkuber røret ved 37 °C i 10-15 minutter (proteasen er mest aktiv ved 37 °C).
6. Bruk en ren, liten plastpipette og tilsett 4 dråper NaCl-løsning til røret.
7. Sett på korken og bland ved å snu røret opp-ned 5 ganger.
8. Inkuber røret ved romtemperatur i 4 minutter.
9. Felling av DNA: Hold røret i 45 ° vinkel. Bruk en stor plastpipette til å tilsette 1 ml iskald isopropanol forsiktig til røret. Hold pipettespissen inntil rørets innside slik at isopropanolen renner sakte ned langs kanten. Sett røret rett opp i et stativ og la stå i 3-5 minutter.
10. Undersøk om DNAet ditt er synlig i interfasen (mellomsjiktet) mellom alkoholen og saltløsningen. Noe DNA kan nå være synlig som grå-hvite tråder.
11. Sett på røret og tapp forsiktig på røret med fingeren 5-10 ganger. Et presipitat (tråd-aktig, hvit eller klar materie) vil dannes i mellomsjiktet. Dette er ditt DNA!
12. Overfør litt av DNAet til et mikrosentrifugerør.
13. Tilsett 1 liten dråpe FlashBlue DNA-farge ved å trykke på halsen av en liten plastpipette i stedet for på smokken øverst. Blåfargen gjør DNAet enklere å se.
14. Overfør det fargede DNAet til mikrosentrifugerøret.
15. Fest en snor i mikrosentrifugerøret, og du har nå ditt eget DNA i et halskjede.

Avfallshåndtering

Plastavfall kan kastes i restavfallet. FlashBlue fargeløsning kan helles ut i vasken. Skyll godt med vann etterpå.

Resultatanalyse og diskusjonsspørsmål

1. Beskriv hvordan det isolerte DNA ser ut.
2. Hvor i cellen finner du DNA?
3. Hvor mange kromosomer har mennesket?
4. Hva mener man med cellelysis (lysring av celler)?
5. Hvorfor tilsetter vi protease til lysisbufferen?
6. Hvorfor legger isopropanolen seg i et separat lag på toppen av DNA-løsningen?