

Tag dine gener om halsen.
Isoler dit eget DNA, og lav et halssmykke ud af det.

Denne øvelse er baseret på øvelseskittet: Genes in a bottle fra firmaet Bio-Rad Laboratories.

Øvelsens formål er at isolere DNA fra slimhindeceller i mundhulen og fremstille et halssmykke, der indeholder en *suspension* af det isolerede DNA i ethanol.

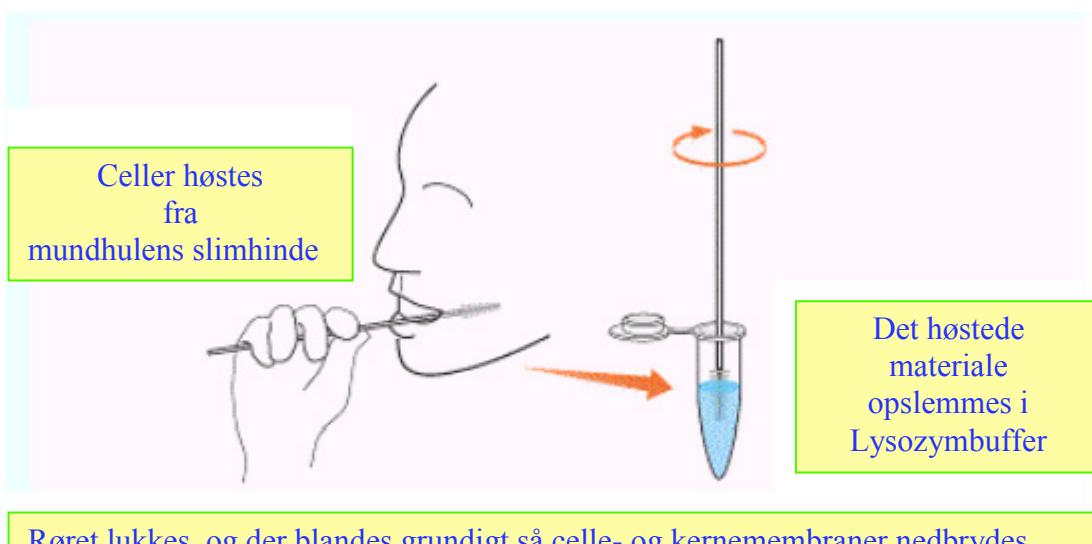
Man får således mulighed for at se sit eget DNA, samtidig med at man lærer en metode til oprensning af DNA, som er første trin i mange bioteknologiske procedurer fx kloning, kortlægning, sekventering mv.

Kemien, som ligger til grund for oprensningsmetoden, er beskrevet i teoriafsnittet.



Indledningsvis gives en oversigt over eksperimentets fire trin.

1. Cellerne høstes. Cellemembran samt kernemembran nedbrydes enzymatisk, og cellens indhold frigives til opløsningen.

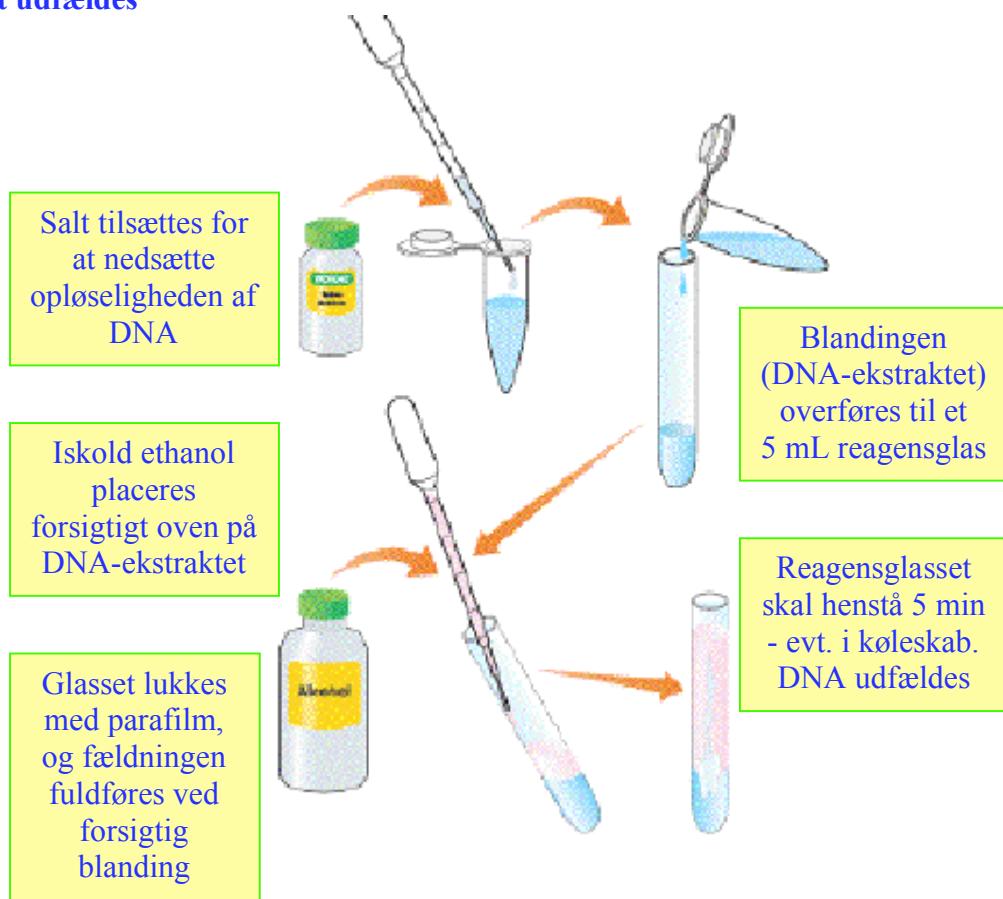


Røret lukkes, og der blandes grundigt så celle- og kernemembraner nedbrydes

2. Cellernes proteiner nedbrydes med protease.



3. DNA'et udfældes



4. Halssmykket fremstilles



Teoretisk baggrund

DNA - struktur, funktion, placering, egenskaber - kort fortalt.

Deoxyribonucleic acid (DNA) er et macromolekyle, som findes i stort set alle levende celler. DNA bærer den genetiske information altså arveegenskaberne, idet molekylet indeholder koder for alle vores individuelle fysiske egenskaber, såsom hudfarve, øjenfarve, hovedform, blodtype og mange flere.

På det molekulære niveau ligner DNA en snoet stige, eller en vindeltrappe.

Stigen indeholder to DNA-strenge, som er snoet sammen i en spiralform, og kaldes derfor en dobbelhelix.

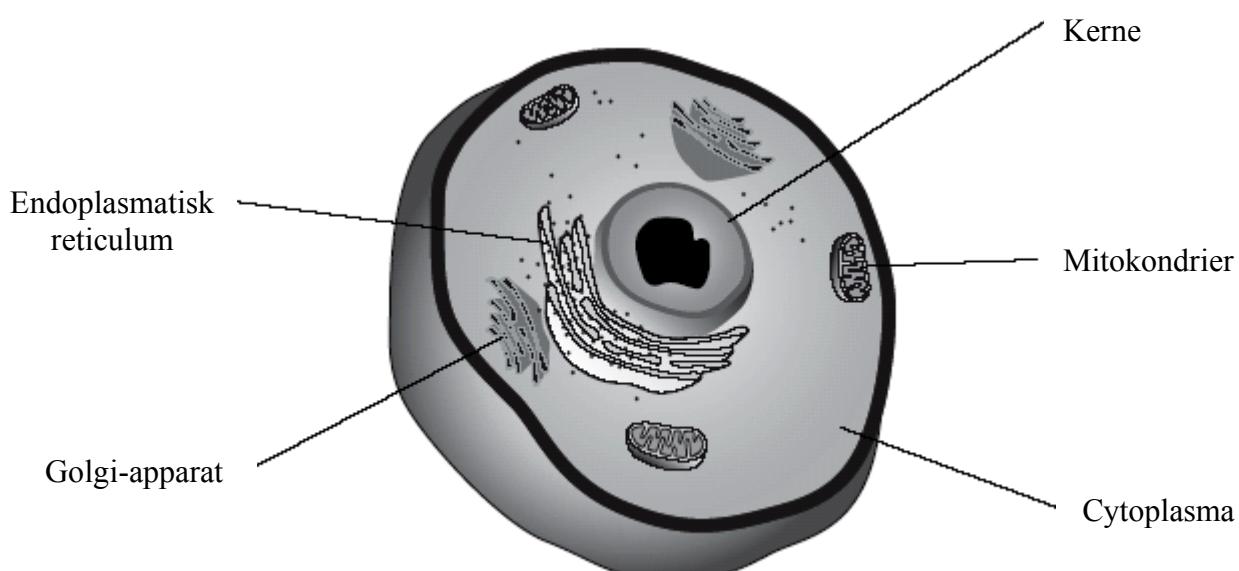
Hver DNA-steng er opbygget af nucleotider, som er sammensat af ribose, phosphat og en base, som kan være A (adenin), G (guanin), T (thymin) og C (cytosin). Disse baser danner basepar, som udgør trinnene i stigen.



Ligesom bogstaver kan kombineres til ord, kan de fire baser kombineres til gener, så de koder for dannelse af proteiner, som er basis for næsten alle cellestrukturer og funktioner.

99,9% af det humane DNA er ens for alle og mindre end 0,1% varierer således fra person til person.

For at kunne forstå metoden til isolering af DNA-molekyler fra celler, skal bl.a. molekylets placering være kendt. DNA findes i cellekernen (nucleus). Se nedenstående figur.



DNA findes i cellekernen og udgør arvematerialet. Det er vundet stramt op og organiseret i 46 kromosomer, som tilsammen indeholder ca. 40.000 gener. Et gen er et stykke DNA, som koder for et protein, og det er de enkelte stramtopvundne DNA-molekyler, som kaldes kromosomer. Hvis man folder de 46 kromosomer ud og placerer DNA strengene efter hinanden, bliver den samlede længde ca. 2 m, og bredden bliver 2 nm. Samles DNA fra mange celler, bliver DNA-materialet synligt i form af lange tynde tråde.

Isolering af DNA

Mundhulens slimhinde er et godt område til indsamling af celler, fordi cellerne her ofte fornyes. Det første trin i DNA-oprensningen består i at nedbryde cellemembraner og kernemembraner ved hjælp af en detergent, som er opløst i lysozymbuffer. Herved frigøres celleindholdet (DNA, proteiner, carbohydrater og salte) og samtidig sikrer bufferen en pH, hvor DNA er stabilt.

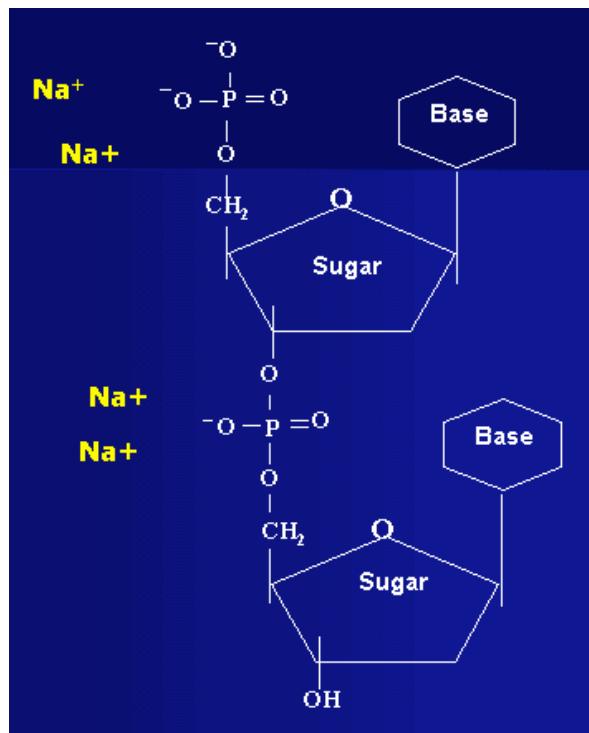
Det er kun DNA, der skal udfældes fra opløsningen, men specielt proteinerne kan udfældes efter de samme principper, som benyttes til udfældning af DNA. Dette udgør et problem, som kan imødegås ved at tilsætte et enzym, der specifikt nedbryder peptidbindingerne mellem aminosyrerne i proteinerne, hvorimod DNA forbliver intakt. Det enzym, der anvendes, er protease. Alle celleproteiner nedbrydes, herunder også de proteiner, som er bundet til DNA. En ikke uvæsentlig effekt er, at de celleenzyme, som kan nedbryde DNA, destrueres.

Temperaturen har betydning, fordi den har indflydelse på enzymaktiviteten. 50°C er den optimale temperatur for protease-aktivitet. Derfor anvendes denne temperatur i forsøget.

Når lysozymbuffer og protease har gjort sin virkning, har vi en blanding, som hovedsageligt består af lipider, som holdes opløst af detergensen, samt vandopløselige partikler som carbohydrater, aminosyrer, salte og DNA.

Det forudsætter kendskab til kemisk binding at forstå opløselighedsforholdene.

Her gennemgås kort udsaltnings af DNA.



DNA er opløseligt i vand, fordi phosphatgrupperne i DNA "backbone" har en negativ elektrisk ladning. Den gensidige elektriske frastødning mellem de ladede DNA-strenge gør, at DNA ikke fælder ud, men forbliver opløst.

Ved høje koncentrationer af natriumchlorid vil natriumioner bindes til phosphat i DNA, så DNA ikke længere er opløseligt. DNA kan nu klumpe sammen, fordi der ikke længere er tilstrækkelig frastødning.

Tilsætning af kold ethanol resulterer i et tofasesystem, som vil fremme udfældningen af DNA i grænselaget. Hvis man er omhyggelig, kan man se store mængder DNA-tråde trække op i ethanolfasen.

De andre cellesubstanse forbliver i saltvandet, og vi har på den måde fået isoleret DNA.

Vejledning til det eksperimentelle arbejde.

Materialer:

Genes in a bottle kit – DNA extraction module, Bio-Rad Laboratories 166-2000ED

Genes in a bottle kit – DNA necklace module, Bio-Rad Laboratories 166-2200EDU

Micropipetter med spidser

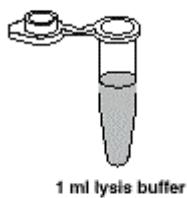
96 % ethanol (is-afkølet)

Vandbad (50°C)

Fremgangsmåden:

1. Cellehøst i mundhulens slimhinde

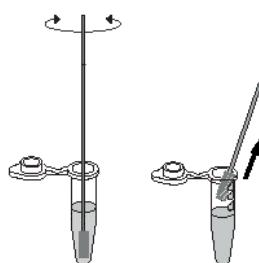
- Overfør 1 mL lysozymbuffer til et microcentrifugerør (testrør).



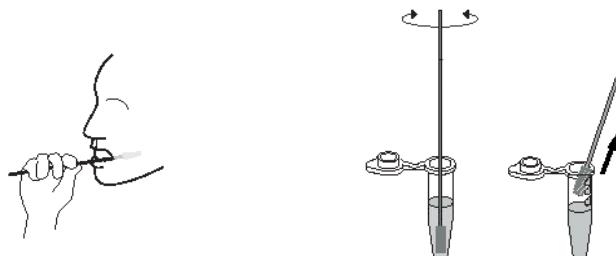
- Tag en børste, og børst forsigtigt - men omhyggeligt - celler fra indersiden af højre kind og området mellem kind og gummer. Skrab i 1 min for at få mange celler.



- Dyp børsten med celleskrabet i testrøret med lysozymbuffer. Snur børsten rundt i opløsningen, og afslut med at skrabe børsten af på kanten af røret, så celler og væске bliver i røret. **Børsten kasseres.**



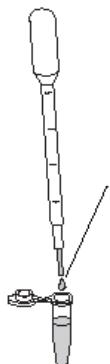
- Med en ny børste gentages processen, dog børstes der nu i den anden side af munden.



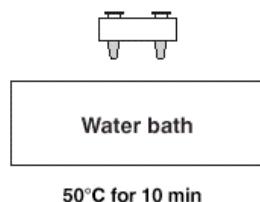
Testrøret lukkes og vendes **forsigtigt** 5 gange.

2. Cellernes proteiner nedbrydes med protease

- Med plasticpipette overføres 1 dråbe proteaseopløsning (mærket PROT) til testrøret. Luk røret, og vend det igen **forsigtigt** 5 gange.



- Mærk røret med navn, og placer det i et skumplast stativ, som er anbragt i et vandbad (50 °C).
Lad det stå i 10 min.



3. DNA'et fældes

- Tag røret op af vandbadet, og tilsæt 2 dråber saltopløsning (mærket SALT).
Luk røret, og vend det **forsigtigt** 5 gange.



- Mærk et 5 mL rundbundet reagensglas (plastic) med navn (benyt permanent tusch).
Overfør indholdet af testrøret hertil.



- Fyld en engangspipette med iskold ethanol.



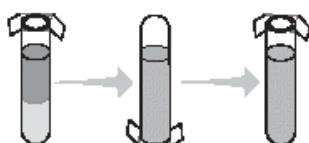
- Vip reagensglasset ca. 45°, og lad forsigtigt den iskolde ethanol flyde ned langs reagensglassets side, så det lægger sig oven på vandfasen. Noter dine iagttagelser.



- Anbring forsigtigt reagensglasset i et stativ, og lad det stå urørt i 5 min ved stuetemperatur. Det skal stå lodret.
Hvad kan der observeres?



- Anbring et stykke parafilm over rørets åbning, og vend røret **forsigtigt** 5 gange.
DNA vil udfældes som tynde hvide tråde.



4. Halssmykket fremstilles

- Det udfældede DNA overføres med en engangspipette til et glas-hjerte. Husk, der skal være plads til proppen.
- Isæt proppen.
- Lim den metaldims, som skal lukke hjertet fast til glashjertets åbning. Undgå at få lim på fingrene.
Hvis det alligevel sker, skal du have hjælp til at få det opløst igen (benyt acetone).
- Isæt snoren, og dit halssmykke er færdigt.



Spørgsmål til eksperimentet.

- A. Hvorfor blandes cellerne med lysozymbuffer? (Giv to begrundelser)
- B. Hvorfor tilsættes protease? (Der er flere årsager)
- C. Hvorfor opvarmes blandingen på vandbad?
- D. Forklar udsaltningen af DNA.
- E. Forklar betydningen af at tilsætte kold ethanol til blandingen.