

PCR og gelelektroforese – døgnrytmeforsøg *Andreas Vedel, Aalborg City Gymnasium*

Formål

I dette eksperiment undersøges om genetisk polymorfi (VNTR) er associeret med døgnrytme. I undersøgelsen anvendes

- PCR til at multiplicere specifikke dele af genomet og
- gelelektroforese til genotypeidentifikation
- spørgeskemaundersøgelse til selvbedømmelse af døgnrytme
- en anonymisering af genotypedata (aht GDPR)

Genetisk associering

De fleste fænotyper er komplekse træk med flere genetiske og miljømæssige komponenter (dvs. ikke bestemt af et enkelt gen). Sådanne genetiske associeringsundersøgelser bruges til at finde kandidatgener eller genomregioner, der bidrager til en given egenskab ved at teste for en sammenhæng mellem denne egenskab og genetisk variation. En højere frekvens af en given allel (eller genotype) i en prøve af individer, der udtrykker egenskaben, kan tolkes som at allelen øger sandsynligheden for at have det specifikke træk. Genetisk associering er vanskelig at påvise utvetydigt og kræver, at der indhentes store mængder af data for at vise en evt. statistisk signifikans. Når forskere benytter traditionelle gen-undersøgelsesteknikker, er der en tendens til at kigge efter mutante eller ikke-funktionelle versioner af gener for at bestemme genets funktion. Selvom dette i mange år har resulteret i mange relevante resultater, så har denne tilgang primært været anvendt på modelorganismer dyrket i laboratorier. Det begrænser naturligvis forskernes mulighed for at studere human genetik. Styrken i associeringsundersøgelser er at man bliver i stand til at sammenligne fænotypisk variation hos mennesker med en genetisk variation i populationer.

Hypotese

Hvilken genotype forventer du at have? Skriv om du ser dig selv som A-menneske ("morgentype"), B-menneske ("aftentype") eller midt imellem, og basér din forventede genotype på din egen vurdering (læs s. 1-2 i dokumentet "DøgnrytmeBaggrundsvidenOgOpgaver" for at komme med dit bud).

Materialer pr elevgruppe (4 personer)

- Engangs-laboratoriehandsker
- Vandfast tusch
- Lille bægerglas til affald (pipettespidser m.m.)


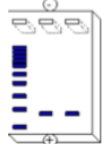
DNA-ekstraktion og PCR (Modul 1)

- PCR-rør med 25 μ L miniPCR EZ PCR Master Mix (eller 5 μ L pr elev)
- PCR-rør med 90 μ L primere (forward og reverse) (eller 20 μ L pr elev)
- Eppendorfrør med 220 μ L X-Tract Buffer (DNA ekstraktion buffer, 50 μ L pr elev)
- DNA-farvestof (GelGreen)
- 2% agarose gel (én brønd pr. elev og 1 brønd til DNA-standard pr. gel)
- Ca. 400 mL 1X TAE elektroforese buffer
- 4 tandstikker til kindskrab
- PCR-maskine
- Mikropipetter: Et stk 2-20 μ L og et stk 20-200 μ L (inkl. spidser)

Elektroforese og aflæsning af gel (Modul 2)

- PCR-rør med 10 µL 100 bp DNA-standard (DNA-ladder)
- Gelelektroforeseapparat med strømforsyning
- Støbt agarosegel (med tilsat Gelgreen)
- 400 mL fortyndet TAE-buffer
- Transilluminator til afbildning af geler

Fremgangsmåde: Oversigt

Modul 1:			
Lærerforberedelse*: Find udstyr og afpipetter reagenser.	A	DNA-ekstraktion i grupper af 4-6 elever (30 min) og <u>anonymisering af elevprøver</u>	
	B	Klargøring til PCR (20 min)	
	C	PCR: Programmering og kørsel PCR-produkter kan opbevares ved stuetemp. op til en uge eller køler/fryser i længere tid.	
Modul 2:			
Lærerforberedelse*: fortynd TAE-buffer og støb geler.	D	Besvarelse af kronotype-spørgeskema (10-15 min)	
	E	Påsætning af prøver og gel-elektroforese	
	F	Aflæsning af gel og dataanalyse/fortolkning	

*Se sidste side i vejledningen for mere detaljeret beskrivelse af lærerforberedelsen.

Fremgangsmåde: Detaljeret udførelse

A Indsamling af kindceller og DNA-ekstraktion og anonymisering

1. Hver elev får udleveret et 200 µL tyndvægget PCR-rør af læreren UDEN mærkning
2. Hver elev tilsætter 50 µL X-Tract DNA-ekstraktionsbuffer til sit eget 200 µL rør. Skrab indersiden af kinden flere gange med den flade ende af en steril tandstik. Gnid forsigtigt langs kinden og pas på ikke at perforere huden. Det skal ikke gøre ondt!
3. Dyp tandstikkeren i røret med X-Tract DNA-ekstraktionsbuffer. Drej tandstikkeren grundigt rundt i bufferen for at frigive celler. Observer om væsken i røret er blevet uklar. Ellers udføres endnu et kindskrab med en ny tandstik (pkt. 1-3).

Anonymiseringsprocedure:

4. **Se særskilt dokument eller spørg din lærer.**
5. Inkubér rørene i 10 minutter ved 95 °C i PCR-maskinen eller tilsvarende varmekilde.
6. Fjern rør fra varmen og placer dem i et rørstativ. Gå straks videre til pkt B.

B Klargøring til PCR

1. Hver elev mærker et nyt PCR-rør (200 µL) på siden med det lærerudleverede "prøvenummer" (f.eks. "C8").
2. Tilføj PCR-reagenser til hvert mærket PCR-rør:

Reagenser	Mængde pr. PCR-rør
SleepLabPrimer (SLP)	20 µL
5x EZ PCR Master Mix (MM)	5 µL
Elev DNA-ekstrakt	3 µL
Volumen i alt	28 µL

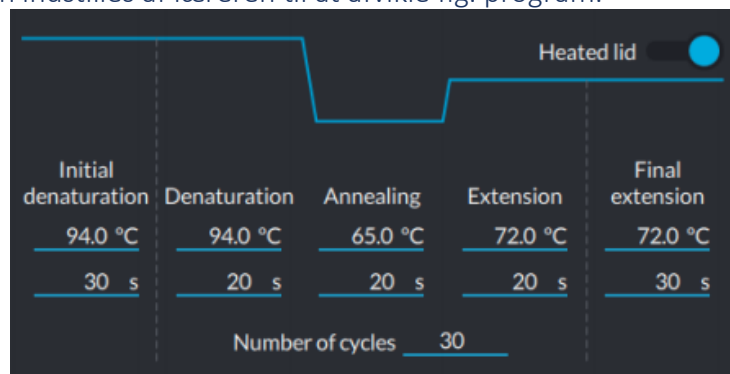


Husk at skifte pipettespids mellem hver tilførsel af reagenser!

3. Bland reagenserne forsigtigt ved at pipettere op og ned 3-4 gange. Sæt omhyggeligt hættten på dit PCR-rør. Sørg for, at al væskevolumen samles i bunden af røret. Brug om nødvendigt en centrifuge (1 min, 1000 rpm).
4. Placer rørene i PCR-maskinens varmeblok. Tryk hårdt på rørhætterne for at sikre, at de slutter tæt. Luk dækslet på PCR-maskinen.

C PCR: Programmering og kørsel

1. PCR-maskinen indstilles af læreren til at afvikle flg. program:



2. Når PCR-kørslen er afsluttet, åbnes låget og gruppens PCR-rør overføres til en holder (gøres af læreren, hvis PCR ikke er slut ved timens afslutning). Vær forsigtig med ikke at røre ved varmeblok og metallåg, som stadig kan være varme.

D Kronotype-spørgeskema og pointscore-tildeling (mens PCR foregår)

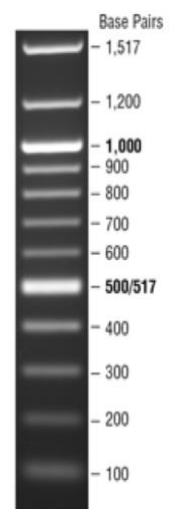
1. Det udleverede kronotype-spørgeskema besvares individuelt af hver elev.
2. Efter besvarelsen udleverer læreren en printet udgave af dokumentet "Døgnrytme-Pointscore" og hver elev sammentæller sin pointscore.
3. Det udfyldte pointscore-papir og det besvarede spørgeskema afleveres til læreren, der noterer hver enkelt elevs pointscore i et Excell-regneark.

E Påsætning af prøver og gelelektroforese

1. Placer gelen i elektroforesekammeret. Vær opmærksom på, at gelen vender rigtigt! Brøndene skal være tættest på den negative pol.
2. Overhæld gelen med 1X TAE-buffer, så gelen er helt nedsænket i elektroforesebuffer. Sørg for, at der ikke er luftbobler i brøndene (ryst evt. gelen forsigtigt for at fjerne bobler). Fyld alle reservoirer i elektroforesekammeret, og tilsæt lige nok buffer til at dække gelen og brøndene. Overfyld ikke bufferkammeret.
3. Overfør DNA-prøver på gelen således:
 - Brønd 1: **10 µL** DNA-standard (100 bp)
 - Brønd 2-5: **14 µL** PCR-produkt fra elev 1-4
 - Brønd 6: **10 µL** DNA-standard (100 bp)
 Bemærk: Det er IKKE nødvendigt at tilføje påfyldningsfarve til dine prøver. Master Mix og DNA-standard er forblandet med påfyldningsfarve og klar til at blive påført gelen!
4. Anbring dækslet på gelelektroforesekaret.
5. Tænd strømmen og udfør elektroforese i ca. 30 minutter eller indtil farvestoffet er vandret mindst halvvejs i gelen. Kontroller, at der dannes små bobler tæt ved elektrodeklemmerne.
6. Når elektroforesen er afsluttet, slukkes for strømmen og gelen udtages (kan evt. opbevares i køleskab til næste lektion).

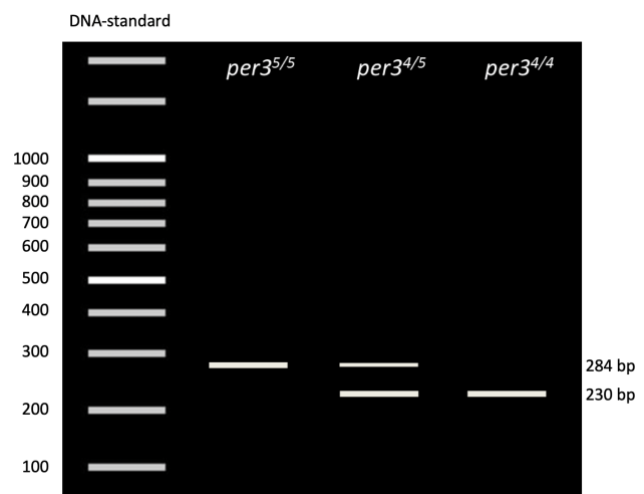
F Aflæsning af gel

1. Placer gelen på en transilluminator.
2. Kontroller om gelen indeholder PCR-produkter.
3. Undersøg om der er tilstrækkelig DNA-båndopløsning i 100-400 bp-området på 100 bp DNA-standard (se billedet til højre). Kør gelen længere, hvis det er nødvendigt for at øge opløsningen. DNA-standardens skal ideelt se omtrent ud som vist på billedet til højre.
4. Bestem størrelsen af PCR-DNA-fragmenter ved at sammenligne båndenes placering med størrelsesmarkøren (100bp DNA-standard) og noter genotypen for hvert elevnr.
5. Billedet til nederst til højre viser skematisk de *forventede* resultater.



Båndenes intensitet afhænger af:

- Effektiviteten af PCR-reaktionen
- Effektiviteten af gel-loading af PCR-produkter
- Kvaliteten af detekteringsreagenserne
- Elektroforese-spændingen og tidslængden af elektroforesen.



Resultatbehandling

1. Skriv din pointscore fra spørgeskemaet, og hvilken type du er ifølge det. Husk forklarende tekst.
2. Tyder resultaterne fra spørgeskemaet på, at du er en "aften-type", "morgen-type" eller "mellemtypen"? Stemmer dit resultat overens med hvordan du opfatter dig selv?
3. Hvis det antages at den genetiske associering stemmer, hvad betyder det for din forventede fænotype?
4. Dine personlige data er blevet anonymiseret, så du kender ikke din egen genotype, men prøv alligevel at beskrive og forklare nogle årsager til, at din genotype og den forventede fænotype muligvis ikke stemmer overens.
5. Betragt evt. resultaterne fra andre undersøgte gymnasieelever. Hvad er den gennemsnitlige score fra spørgeskemaet for elever, der er henholdsvis $Per3^{4/4}$ homozygoter, $Per3^{4/5}$ heterozygoter og $Per3^{5/5}$ homozygoter? Hvorfor er det vigtigere at se på gruppegennemsnit end individuelle score?

Lad os nu se på undersøgelsens data på en lidt anderledes måde.

6. Hvor mange $Per3^4$ -alleler er der i alt hos de undersøgte personer? Husk, at $Per3^{4/4}$ homozygoter hver har to alleler, mens $Per3^{4/5}$ heterozygoter kun har én.
7. Hvor stor en procentdel af de samlede alleler udgør $Per3^4$ -alleler for hver fænotype?
8. Hvor mange $Per3^5$ -alleler er der i alt hos de undersøgte personer? Husk, at $Per3^{5/5}$ homozygoter hver har 2 alleler, mens $Per3^{4/5}$ heterozygoter kun har én.
9. Hvor stor en procentdel af de samlede alleler udgør $Per3^5$ -alleler for hver fænotype?
10. Hvorfor skal man bruge store datasæt og en statistisk test for at undersøge om en genetisk associering er sandsynlig eller ej?

Konklusion

Skriv her, om du kan be- eller afkræfte din hypotese og hvorfor. Kom også ind på, om din egen vurdering af om du er A- eller B-menneske stemmer overens med spørgeskema-resultatet.

Lærerens forberedelse til forsøget

Oversigt over udstyr og materialer

Udstyr der kan købes som kit¹	240 µL 5x EZ PCR Master Mix 960 µL SleepLabPrimer (forward og reverse) 1,6 mL DNA ekstraktion buffer (X-Tract Buffer) 100 µL DNA-standard (100 bp DNA-ladder)
Udstyr på de deltagende skoler	DNA-farvestof (fx "GelGreen x 10.000") eller hvad man har på skolen 10 g agarose gel (nok til 10 stk 2 % geler på 50 mL) 100 mL 50 X TAE elektroforese buffer ² Tandstikker til kindskrab PCR-maskine 20-200 µL mikropipetter (én pr. elevgruppe) inkl. spidser 2-20 µL Mikropipetter (én pr. elevgruppe) inkl. spidser En 20-200 µL lærer-mikropipette inkl. spidser En 2-20 µL lærer-mikopipette inkl. spidser 200 µL PCR-mikrorør (to rør pr. elev) 1,7 mL eppendorfrør til reagenser (to rør pr. elevgruppe) Gelelektroforeseapparat med strømforsyning Transilluminator til aflæsning og dokumentation af geler ³ Engangs-laboratoriehandsker Vandfast tusch, en pr. elevgruppe (4 personer) Lille bægerglas til affald (pipettespidser m.m.) Vægt til afvejning af agarose

Før modul 1 (DNA-ekstraktion og PCR)

1. Print øvelsesvejledning, spørgeskema og pointscore
2. Mærk et eppendorfrør med "X" pr elevgruppe
3. Mærk et 200 µL PCR-mikrorør med "SLP" pr elevgruppe
4. Mærk et 200 µL PCR-mikrorør med "MM" pr elevgruppe

Fordel flg. til hver elevgruppe

5. 4 PCR-rør (200 µl)
6. Optø og overfør 250 µl X-Tract Buffer til eppendorfrøret "X" (eller 50 µl pr. elev)
7. Optø og overfør 100 µl SleepLabPrimer til PCR-røret "SLP" (eller 20 µl pr. elev)
8. Optø og overfør 25 µL Master Mix ("MM") til PCR-røret "MM" (eller 5 µl pr elev)
9. Rørene med "X", "SLP" og "MM" sættes på is indtil de skal bruges.

Før modul 2 (Elektroforese)

1. Forbered elektroforese-buffer ved at fortynde 50x koncentreret buffer med demineraliseret vand:
Eks. 500 mL 1x TAE-buffer fremstilles ved at tilføre 10 mL koncentreret buffer til en 500 mL målekolbe og påfylde demineraliseret vand op til strengen.
2. Til elektroforese med 8 geler (hver med et volumen på 50 mL) fremstilles 8 x 500 mL buffer, altså 4,0 L fortyndet buffer.

¹ Dette kit, "miniPCR Sleep Lab" er oprindeligt indkøbt fra USA (minipcr.com), men kan fra efteråret 2021 købes hos skolebutik.dk. Kontaktperson: Henrik Høvdinhof.

² I den oprindelige forsøgsvejledning fra minipcr.com anvendes TBE-buffer, men TAE-buffer er valgt i stedet fordi det er nemmere at opløse i forbindelse med fortyndingen og desuden kan købes i en mere koncentreret udgave. Bemærk at GelGreen, agarose og TBE-buffer kan købes som en samlet pakke, "Learning Lab Companion Kit" fra minipcr.com eller skolebutik.dk.

³ Kan fx købes hos www.frederiksen-scientific.dk. Hvis skolen ikke råder over en transilluminator kan man alternativt farve gelen efter elektroforesen med fx "Fast Blast DNA stain" der kan købes ved biorad.com.

3. Fremstil 2 % agarosegel:
Til en gel med volumen på 50 mL afvejes 1,0 g agarose, der overføres til 50 mL fortyndet TAE-buffer og opvarmes i mikrobølgeovn indtil agarosen er opløst og væsken er klar og ensartet.
4. Forsegl enderne af støbeformen.
5. Afkøl agaroseopløsningen i ca. 2-3 minutter ved stuetemperatur. Sving forsigtigt kolben ind imellem for at afkøle jævnt.
6. Tilsæt DNA-farve til agaroseopløsningen:
Der tilsættes 1 μl "Gel Green 10.000X" pr. 10 ml agaroseopløsning.
7. Sving forsigtigt kolben for at blande DNA-farven jævnt i agaroseopløsningen.
8. Kammen placeres i støbeformen og agarose-buffer-opløsningen med Gelgreen hældes i elektroforesekarret.
9. Når gelen er størknet (efter ca. 20 min) fjernes kammen forsigtigt.
10. Optø røret med DNA-standard og afpipetter til hver elevgruppe 12 μl til et PCR-rør. Placer røret på is indtil det skal bruges.

NB! Ovenstående beskrivelse til modul 2 er gældende for et elektroforesekarret, der kan rumme ca. 300 mL buffer og for en gel med volumen på ca. 50 mL.