

## Undersøgelse af døgnrytmerelaterede genotyper i klassen

Af: *Kresten Cæsar Torp, Aalborghus Gymnasium*

Med relativt få generelle reagenser og udstyr kan man få et fleksibelt laboratorium, så man kan udvikle en række nye eksperimentelle undersøgelser. Det gælder særligt identifikation af alleler, som afviger ved deres længde, som er mest umiddelbare at gå til.

Man starter med at undersøge forekomsten af én allel i klasserne. Så er man i gang. Derefter bestiller man blot primere hjem til den næste undersøgelse osv. Efterhånden bliver man lidt mere opsøgende. Husk derefter at kommunikere gode nye forsøg til kolleger, fx via Biofag.

Her følger en vejledning til hvordan man kommer i gang. For mere udførlige vejledninger se vejledningerne her på hjemmesiden eller fx i Biofag nr. 5 december 2021.

### Indhold

Undersøgelse af døgnrytmerelaterede genotyper i klassen .....	1
Hvilke forsøg kan man lave selv .....	1
Anskaffelser .....	2
Udstyr .....	2
Reagenser .....	2
Primer- og Mastermix (PMM) .....	4
For faggruppens skyld.....	5
Anonymisering.....	5

### Hvilke forsøg kan man lave selv

Det kan umiddelbart være lidt skræmmende at skulle købe reagenser ind fra forskellige firmaer, i stedet for at købe færdige kits. Når man har indkøbt materialerne til dette forsøg har man imidlertid reagenser og en vejledning, der kan tilpasses en række andre undersøgelser også.

Det kræver blot at man finder en artikel, hvor primersekvensen for den pågældende undersøgelse er angivet. Nye primere bestilles hjem og samme procedure og vejledning følges -det bliver hurtigt standard.

Det kan også være DNA fra dyr, planter, svampe eller bakterier der undersøges. Det er faktisk i høj grad at foretrække, da man her undgår datasikkerheds-aspektet. Hvad med at tjekke klassens husdyr for et eller andet?

Nogle forsøg, hvor der allerede foreligger vejledninger er:

- *Per3* døgnrytmealleler (vejledning under systembiologi > Undersøgelse af døgnrytmeallel

- Deletionsmutationen *CCR5 $\delta$ 32*, som giver en vis resistens overfor HIV-virus (vejledning under systembiologi > smittespredning)
- PTC-smagergen (vejledning af Christian Rix og Anders Kristensen i Biofag nr. 5, december 2021)
- *PV-92* (vejledning af Christian Rix og Anders Kristensen i Biofag nr. 5, december 2021)
- Genetisk fingerprinting efter CODIS-systemet, som FBI anvender til retsgenetiske undersøgelser. Her anvendes et antal loci med varierende antal tandem repeats. Jo flere loci man inddrager, jo mere sikker bliver bestemmelsen. Dette aspekt kan uddybes matematisk med Bayesiansk sandsynlighedsregning. Der findes også gode databaser med allelfrekvenser i forskellige populationer rundt omkring på jorden. Primere hertil kan findes på nettet, og man kan udvælge så mange man har mod på (og råd til). Link: [FBI Core STR Loci \(nist.gov\)](https://www.fbi.gov/laboratory/forensic-science/codis) , [Overview of STR Fact Sheets \(nist.gov\)](https://www.fbi.gov/laboratory/forensic-science/codis). Underviser du I Region Nord kan de bestilles som en Biotek Nord forsøgskasse på CFU's hjemmeside. Vejledninger: [DNA-Fingerprinting \(aau.dk\)](https://www.aau.dk/da/undervisning/for-underviserne/vejledninger/dna-fingerprinting)

## Anskaffelser

Man får behov for følgende udstyr og reagenser:

### Udstyr

#### Forbrugsvarer:

- Eppendorfrør
- PCR-rør
- Pipettespidser
- Isbad og rørholdere (fx små stykker skumplast med huller)

#### Apparatur:

- Mikropipetter
- Centrifuge med indsats til eppendorfrør
- Vortex-mixer
- Thermocycler
- Gelelektroforeseudstyr: Kamre, strømforsyning, UV-transilluminator
- Racks til eppendorfrør.

I flere temaer på sysbio.dk er anvendt kits fra firmaet MiniPCR. Apparaterne herfra har flere muligheder for at følge processerne realtime, afbryde fx PCR undervejs ol. I Danmark forhandles MiniPCR af skolebutik.dk. Link: [miniPCR mini16 PCR maskine Bluetooth/USB \(skolebutik.dk\)](https://www.skolebutik.dk/miniPCR-mini16-PCR-maskine-Bluetooth/USB)  
FaDB-medlemmer får rabat på indkøb.

### Reagenser

Tjek: Nogle reagenser står nok allerede i et hjørne af fryseren eller køleskabet.

Reagens til DNA-oprensning	Er der tale om prøver fra mennesker eller dyr, anbefales Biorad InstaGene Matrix, eller Chelex Resin som beskrevet i vejledningen til døgnrytmeforsøget. Den er modificeret efter inspiration fra Christian Rix og Anders Kristensens udgave "Klargøring af kindcelle-DNA", Biofag nr. 5, december 2021. Det har sparet lidt tid ift. firmaets vejledning, og fungerer udmærket.
----------------------------	--

	Oprenses DNA fra celler med cellevæg eller fra fx jordprøver eller vandprøver, tilpasses oprensningsproceduren. Under <i>sysbio.dk</i> > <i>Bioinformatik</i> > <i>Hvem gærer din mad?</i> kan findes en vejledning til oprensningsskittet DNeasy power soil (fil 3B), som er en god og alsidig metode.
DNasefrit vand	DNasefrit vand er drøjt i brug. Oftest anvendes kun få µL, og fx 25 mL rækker langt. Det kan fx købes ved: Thermo-Fisher, Sigma-Aldrich, BioNordika (link: <a href="#">Nuclease-free Water - RNA reagents - BioNordika Denmark A/S</a> )
Mastermix	Mastermix kan fremstilles ud fra de indgående reagenser (taq-polymerase, nukleotider og buffer), hvis man orker det. Alternativt kan man købe en færdig Mastermix (pyha..). Her er anvendt PCRBI0 ultra mix red (Link: <a href="#">Taq Polymerases &amp; Mixes - PCRBI0 - Copenhagen Biotech Supply (cobio.dk)</a> ). Dette er en robust Mastermix som er tilsat en rød loading dye, så man ikke skal tilsætte denne før gelelektroforese.
Agarose	I de fleste gymnasiedepoter står nogle dåser med ubrugt agarose fra diverse DNA-kits. Dem kan man fint bruge. Ellers kan agarose købes hos en del laboratoriefirmaer. 2 % agarose-gel fremstilles ved at opløse agarose i vand (2g /100 mL) og opvarme til opløsningen bliver klar. Det kan gøres i mikrobølgeovn (fyld højst en bluecapflaske halvt op, og pas på ikke at koge over) eller med en varmeplade med magnetomrører.
DNA-markør	DNA-markører skal passe med længderne på det undersøgte DNA. Oftest kan en 100 bp-markør, som dækker området 100-1000 bp anvendes. Ved første optøning deles markøren ud i eppentrodør, så gentagen optøning-nedfrysning indgår. Der anvendes typisk 5 µL per gel. DNA-markør kan købes ved de fleste laboratoriefirmaer, som Frederiksen, Skolebutikken, Biorad og Copenhagen Biotech Supply (link: <a href="#">Copenhagen Biotech Supply - Welcome to our website (cobio.dk)</a> ). Det opbevares i køleskab.
DNA-stain	DNA kan farves med forskellige dyes. På <i>sysbio.dk</i> er anvendt SYBRsafe, som kan tilsættes agarosen efter afkøling til ca. 65 °C, mens de stadig er flydende. Herefter støbes gellerne. Alternativt kan gellerne farves efter elektroforese. SYBRsafe og lignende dyes kan købes samme steder som DNA-markør og mastermix.
TAE-buffer	Tjek, om I ikke har nogle flasker med 50x TAE-buffer fra gamle kits. Husk at når man fortynder TAE-buffer til gelelektroforese kan den hældes tilbage på flasker og genbruges nogle gange. Sæt evt. et kryds på etiketten for hver gang den anvendes, så der er historik på hvornår den evt. skal kasseres. Ellers kan det købes de samme steder som de øvrige reagenser.
Primere, som indkøbes til de forskellige alleler man ønsker at undersøge.	Primere (oligos) kan bestilles ved flere firmaer. Her er de bestilt hos Biosearch, som har produktion i Lystrup ved Århus. Link: <a href="#">Order oligos easily from LGC Biosearch Technologies   LGC Biosearch Technologies</a> Vær opmærksom på ikke at bestille på den amerikanske hjemmeside, men kontakt firmaet per mail eller telefon. Herefter fremsendes en bestillingsliste, som udfyldes og returneres per mail.

	<p>Primersekvenser<sup>1</sup> kan oftest findes i forskningsartikler over undersøgelser, hvor de er anvendt. Primersekvensen angives ved bestilling.</p> <p>Primere kan bestilles i flere volumener og oprensingskvaliteter. Til almindelig PCR som her, kan vælges "desalted". Primerne leveres så som salt i eppendorfrør, og selvom der kun bestilles små mængder, er der til rigtig mange klasser.</p> <p>Efter modtagelse opløses primerne i TE-buffer eller DNase-frit vand til en koncentration på 100 µM. Volumen af TE-buffer beregnes ved at multiplicere antal ng primer i prøven med 10. Eks: Indeholder leveringen 20 nmol DNA opløses i 200 µL TE-buffer /DNasefrit vand. 1µL af hver stamopløsning er tilstrækkeligt til 10 reaktioner.</p> <p>Primer-stamopløsningen fordeles i passende portioner, fx klassestørrelse, og nedfryses. Herved undgår man at optø /nedfryse mere end højst nødvendigt. For at spare rør kan man i hver portion blande forward- og reverseprimer i samme rør.</p> <p><b>Godt tip:</b> Husk etiketter med indhold, koncentration og volumen på alle rør. De skal typisk ligge længe i fryseren og evt. kunne anvendes af kolleger. Det er rigtig nyttigt at angive fortyndingsforholdet i forhold til den færdige PCR-prøve, fx "2x MasterMix" eller "50x F+R Primermix" Det er let at benytte, når man skal beregne blandingsforholdet til sidst.</p>
Til nogle undersøgelser anvender man desuden bestemte restriktionszymer.	<p>Restriktionszymer kan købes hos fx Biorad, Bionordika, Cobio. Del dem ud i eppendorfrør i klasseportioner ved første optøning. Husk at etikere, så det er kommunikeret klart til kolleger, hvad der er i.</p>

Nogle af reagenserne ligger sandsynligvis allerede i lab-køleskabet som overskud fra tidligere kits på de fleste gymnasier.

#### Primer- og Mastermix (PMM)

I vejledningerne på sysbio.dk fremstiller læreren PMM umiddelbart før lektionen, og fordeler dette i eppendorfrør til hver gruppe. Der beregnes et spild på ca. 10 %. Til gengæld minimeres risikoen for kontaminering af de fælles rør.

Man kan diskutere om der er en pædagogisk pointe i at eleverne blander så meget som muligt selv. Man kommer dog nok ikke omkring ved at have nogle dele blandet på forhånd, og må så vurdere hvor mange procedurer klassen kan overskue uden at miste fornemmelsen af hvad de arbejder med.

<sup>1</sup> I eksemplet med døgnrytmeundersøgelsen på sysbio.dk er fx anvendt sekvenser fra : Teresa M. Osland, Bjørn Bjorvatn, Vidar M. Steen & Ståle Pallesen: Association Study of a Variable-Number Tandem Repeat Polymorphism in the Clock Gene PERIOD3 and Chronotype in Norwegian University Students, *Chronobiology International*, 28(9): 764–770, (2011). Link: [Association Study of a Variable-Number Tandem Repeat Polymorphism in the Clock Gene PERIOD3 and Chronotype in Norwegian University Students | Request PDF \(researchgate.net\)](https://www.researchgate.net/publication/312511111_Association_Study_of_a_Variable-Number_Tandem_Repeat_Polymorphism_in_the_Clock_Gene_PERIOD3_and_Chronotype_in_Norwegian_University_Students)

Til PCR-reaktionen kan der arbejdes med forskellige reaktionsvolumener, typisk fra 20-50  $\mu\text{L}$ . Her er valgt 50  $\mu\text{L}$ . Man kan dog uden problemer minimere reagensforbruget ved at halvere volumen.

I den færdige primer/mastermix ønskes en koncentration på ca. 0,2  $\mu\text{M}$ . Man kan derfor fremstille PMM som følger:

Volumen	50 $\mu\text{L}$	
	Per reaktion	Per klasse (35 reaktioner)
2x Mastermix	25 $\mu\text{L}$	875 $\mu\text{L}$
Forward primer stamopløsning	0,10 $\mu\text{L}$	3,5 $\mu\text{L}$
Reverse primer stamopløsning	0,10 $\mu\text{L}$	3,5 $\mu\text{L}$
DNAsefrit vand	4,8 $\mu\text{L}$	168 $\mu\text{L}$
I alt	30 $\mu\text{L}$	1050 $\mu\text{L}$

Mastermix og primer-stamopløsninger optøes på is umiddelbart før blokken. De blandes i et fælles rør og deles ud på rør til hver gruppe.

### For faggruppens skyld

Brug tid på at kommunikere nye forsøg i faggruppen og på at prøve dem af. Gå helst sammen om at få dem indkøbt. Når først man kommer i gang, er det ikke så svært. Det kræver blot orden i fryser og køleskab, god etikettering og et arkiv over vejledninger og tilhørende opgaver.

### Anonymisering

Arbejde med prøver fra mennesker kræver anonymisering, og data som kan spores til enkeltpersoner må ikke opbevares i længere tid. I døgnrytmeundersøgelsen på sysbio.dk er vist en procedure, hvor man kan se sammenhæng mellem genotype og fænotype (DNA-prøve og spørgeskema), samtidig med at anonymiseringen overholdes. Den kan dog sjældent anvendes indenfor en enkelt klasse uden at enkeltelever kan genkende deres egen prøve, men data må lægges ind i en database med flere klassers resultater. Som nøgleregulering må der ikke optræde grupper i data på under 5 personer. Man kan lægge klassens resultater i et fælles regneark med resultater fra andre skoler. For døgnrytmeundersøgelser vedkommende kan skolen sende resultaterne til [kt@aalborghus.dk](mailto:kt@aalborghus.dk). De vil så blive indført i et regneark med elever fra andre skoler og returneret. Når vi har en tilstrækkelig stor mængde data til at anonymiseringen er sikker, vil de blive lagt på sysbio.dk.

Er målet blot at finde en allelfrekvens eller genotypefrekvens i klassen kan anonymiseringen foretages mere enkelt ved at de umærkede PCR-rør blandes i en skål og deles tilfældigt ud igen. Det er en god ide at vende anonymiseringsprocedurer med ledelsen, så alle er indforståede med fremgangsmåden.

God fornøjelse!