

Undersøgelse af hyppigheden af allelen *CCR5- δ 32* i klassen

Af: *Kresten Cæsar Torp*

Allelen *CCR5* koder for et membranprotein i immunforsvarets T-hjælpeceller. *CCR5*-proteinet fungerer sammen med membranproteinet *CD4* som receptor for HIV-virus. Mutationen *CCR5- δ 32* (δ =delta) er en mutation på 32 basepar (bp), som gør T-hjælpecellerne modstandsdygtige overfor HIV-virus. Dermed bliver personer som er homozygote for mutantallelen mere modstandsdygtige over for AIDS.

Metoden er udarbejdet med inspiration fra:

Falteisek, Lukáš; Jan Černý og Vanda Janštová: *A Simplified Technique for Evaluating Human CCR5 Genetic Polymorphism*, *The American Biology Teacher*, Vol. 75, No. 9, pages 704–707. Link:

<https://abt.ucpress.edu/content/75/9/704>

Indhold

Undersøgelse af hyppigheden af allelen <i>CCR5-δ32</i> i klassen	1
Undersølgelsesprincip	2
1. Oprensning af DNA og opformering ved PCR	3
Materialer	3
Sikkerhed	3
Fremgangsmåde	3
2. Bestemmelse af genotyper ved gelelektroforese	5
Materialer	5
Fremgangsmåde	5
3. Databehandling og beregning af allelhyppigheder	6
Fremgangsmåde	6

Undersøgelsesprincip

I undersøgelsen skal vi bestemme allelhyppigheden af allelen *CCR5- δ 32* i en befolkningsgruppe i Aalborg. Prøverne anonymiseres vi registrerer dem i en database. Resultatet sammenligner vi med tal fra resten af Verden.

Undersøgelsen består af tre trin:

1. **Oprensning af DNA fra kindceller**, anonymisering og opformering af *CCR5*-allelen ved **Polymerase Chain Reaction (PCR)**.
2. **Gelelektroforese** af de opformede alleler og identifikation af personernes genotyper.
3. **Analyse af resultater**: Beregning af allelfrekvenser, genotypefrekvenser og fænotypefrekvenser og sammenligning med databaser.

Ved **PCR-processen** opformeres et stykke af allelen som indeholder deletionen på de 32 basepar. PCR-produktet, dvs. den DNA-sekvens der opformeres, afgrænses af de to anvendte primere, og er på 198 basepar for normalallelen (*CCR5*, A) og 157 basepar for mutantallelen (*CCR5- δ 32*, a). Primerne har følgende DNA-sekvens:

Forward-primer: 5' CAAAAGAAGGTCTTCATTACACC 3' (basepar 630-653 på *CCR5*-genet)
Reverse-primer: 5' CCTGTGCCTCTTCTTCATTCG 3' (basepar 795-818 på *CCR5*-genet)

Ved **gelelektroforese** adskilles DNA af forskellige længder. Dvs. at man kan identificere hvilke af de to alleler der forefindes i hver prøve, og personernes genotyper kan identificeres.

Ved **analyse af resultater** optælles hvor mange personer der findes i hver genotype. Resultaterne samles i en database. Herefter beregnes hyppighederne af fænotyper, genotyper og alleler i befolkningsgruppen.

1. Oprensning af DNA og opformering ved PCR

Materialer

- Bæger med 10 mL 0,9 % NaCl-opløsning per elev
- 2 stk. 1,5 mL eppendorf-rør per prøve. Mærkes med gruppe og prøve-nummer.
- 200 µL InstaGene Matrix per elev i eppendorf-rør med skrueør (mærket: IGM). Mærkes med gruppe- og prøvenummer. *Indeholder små magnetiske perler, som binder salte ol., som senere vil kunne hæmme PCR-processen.*
- Isbad
- Varmeblok 95 °C. *Varmen åbner cellerne, så DNA diffunderer ud, og denaturerer DNAs (DNA-spaltende enzymer) fra cellerne.*
- 1 stk. 0,2 mL umærket PCR-rør per prøve.
- 30 µL Primer- og Mastermix per prøve (i eppendorf-rør mærket: PMM). *Indeholder 25 µL Mastermix (Nucleotider og DNA-polymerase), 2,5 µL Forward-primer og 2,5 µL Reverse-primer.*
- Mikropipetter til 20-1000 µL og tilhørende spidser
- Affaldsglas
- Centrifuge (fælles)
- Termocycler til PCR (fælles).

Sikkerhed

Skyllebæger og eppendorfrør indeholder væv fra mennesker og derfor en potentiel smitterisiko. De indsamles derfor efter anvendelse.

Fremgangsmåde

Indsamling af prøver og oprensning af DNA

1. Skyl munden grundigt i de 10 mL 0,9 % NaCl-opløsning. Sørg for at massere lidt på kinderne med tænderne.
2. Spyt prøven tilbage i bægeret.
3. Overfør 1 mL af prøven til et mærket eppendorfrør.
4. Centrifuger prøven ved 12000 rpm i 2 min. *Husk at afbalancere centrifugen med en tilsvarende prøve overfor!!*
5. Du skal nu gerne kunne se en hvid pellet på siden af røret på størrelse med et tændstikhovet. Den indeholder dine kindceller med DNA. Er pellet for lille gentages punkt 6+3+4+5.
6. Fjern supernatanten ved at hælde den ud. Dup lidt mere ud på lidt papir, men lad en dråbe blive tilbage i bunden sammen med pellet.
7. Resuspender pellet i den tilbageværende dråbe ved at vortexe eller stryge hen ad rørholderen. Der må ikke være klumper tilbage.
8. Overfør 200 µL prøve (ca. det hele) til røret med InstaGene Matrix (IGM). Det vil være hele prøven. Luk røret og bland ved vortexe eller knipse på siden.
9. Inkuber rørene ved 95 °C i 10 min. i varmeblokken. *Brug ventetiden til at forklare hvad der sker med cellerne og DNA for hvert trin i oprensningen og under PCR. Anvend noterne i materialelisten.*
10. Vortex prøven ved høj hastighed i 10 sek. Brug ventetiden på at læse frem og forberede det næste der skal gøres frem til punkt 21. *Prøven opbevares fra nu af på is.*
11. Centrifuger prøven ved 12.000 rpm i 3 min. Husk at afbalancere centrifugen!
12. Overfør 100 µL af supernatanten til et nyt eppendorfrør. Undgå at overføre pellet!
13. Nu har du den oprensede prøve.

Klargøring af prøver til PCR

Husk at opbevare prøverne på is.

14. Med en pipette overføres 30 μ L primer-mastermix (PPM) til pcr-røret.
15. Overfør 20 μ L prøve til røret.
16. Prøven opblandes i PCR-røret ved at pipettere op og ned et par gange. Husk at skifte pipettespidser mellem hver prøve!
17. **Anonymisering:** Låget lukkes godt og klassens prøver blandes i en skål. Grupperne fordeler PCR-rørene tilfældigt imellem sig og anbringer dem igen på is.

Opformering af prøver ved PCR

18. PCR-rørene mærkes med gruppens nummer.
19. Tap rørets indhold ned i bunden af PCR-røret og placer det i termocycleren. Tjek at låget er fast lukket.
20. Termocycleren indstilles på følgende program og tændes:

Step	Antal cykler	Temperatur (°C)	Tid
1. Indledende denaturering	1x	94	2 min
2a. Denaturering	35x	94	30 sek
2b. Annealing		52	30 sek
2c. Polymerisering		72	30 sek
3. Afsluttende polymerisering	1x	72	10 min
4. Hold	1x	4	Uendeligt

2. Bestemmelse af genotyper ved gelelektroforese

Materialer

- 2 % Agarose-gel i TAE-buffer tilsat SYBRsafe-DNA-farve (1 μ L/10 mL agarose) (forberedes af lærer)
- Gel-load markør
- DNA-størrelsesmarkør, 100-1000 bp (i fælles eppendorfrør)
- 5 og 30 μ L automatpipetter med pipettespidser og gel-load-spidseser.
- Affaldsglas.
- Gelelektroforesekammer, støbekasser, kamme og strømforsyning
- TAE-buffer til elektroforesekammer.

Fremgangsmåde

Støbning af geler

1. Agarosen smeltes i mikrobølgeovnen
2. Agarosen afkøles til ca. 65°C og tilsættes SYBRsafe, (af lærer)
3. Gel-bakken lukkes i enderne og kammene anbringes i minus-enden – anvend siden med 10 brønde.
4. Agarosen (ca. 60 mL) hældes i gel-bakken til lige ved overfladen
5. Mens agarosen størkner klargøres prøverne, og alle øver sig i at load geler.

Træning i gel-load

Alle træner, hvordan man loader geler. Det gøres i plasticgeler med en trænings-dye.

I de rigtige geler er det vigtigt at få prøven forsigtigt afpipetteret i brønden. Det er også vigtigt ikke at prikke hul i bunden af brønden. Støt pipettehånden med den anden hånd.

Forberedelse og loadning af prøve

1. 5 μ L Gel-load tilsættes hver prøve – *husk at skifte pipettespidser!*
2. Fjern enderne på gel-bakken og monter gelen i elektroforesekammeret.
3. TAE-buffer hældes i kammeret, så det netop dækker gelen.
4. Prøverne (25 μ L i alt) loades på gelerne, en i hver bane
5. 5 μ L DNA-størrelsesmarkør loades i første bane af hver gel.

Gelelektroforese

Sikkerhed:

Strømmen må kun tilsluttes til elektroforeseapparatet, når låget er fast monteret!

UV-transilluminatoren må kun betjenes med ansigtsbeskyttelse!

6. Låget monteres på kammeret og strømmen tilsluttes på 100 V
7. Når markørfarven er ca. $\frac{3}{4}$ gennem gelen, afbrydes spændingen.
8. Gelen placeres i geldoc eller på UV-transilluminatoren og affotograferes.
9. Alle billedfiler deles i klassen.

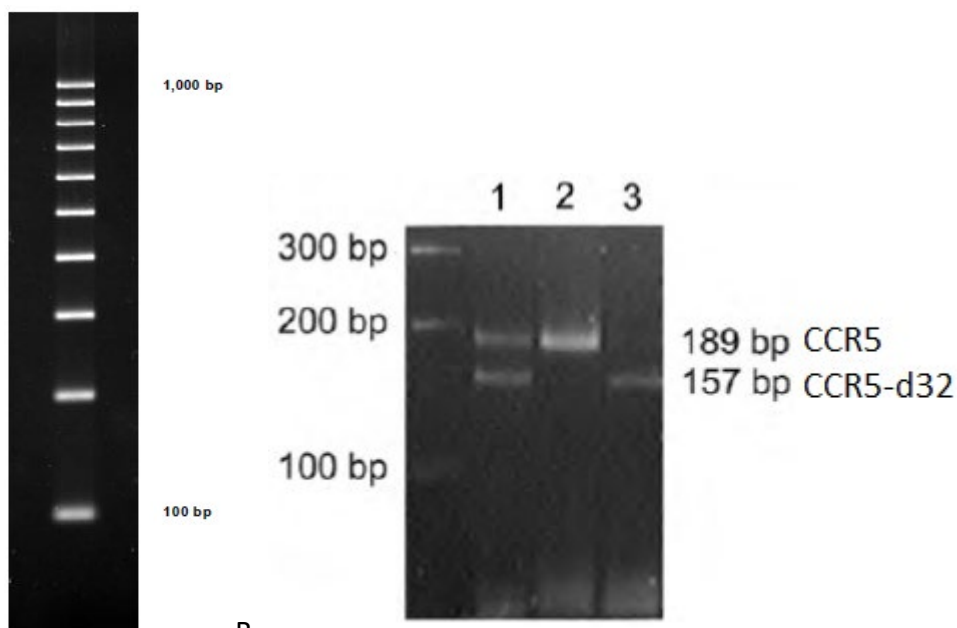
3. Databehandling og beregning af allelhyppigheder

Fremgangsmåde

1. Gelen affotograferes, og der arbejdes videre med fotoet af gelen.
2. DNA-markøren i yderste bane indeholder et bånd for hver 100 basepar (bp), fra 100 – 1000 bp, se billede A. Nogle af de øverste kan være komprimerede pga. gelens størrelse, så billedet vil sikkert ligne B.
3. Identificer bånd hos personerne, som repræsenterer:

Genotype	Bånd (sæt kryds hvor du forventer bånd)	
	189 bp (A)	157 bp (a)
Homozygot for normalallelen (AA)		
Heterozygot (Aa)		
Homozygot for mutantallelen (aa)		

4. For hver bane aflæses nu personens genotype. Resultaterne tælles sammen og indføres i den fælles database.
5. Ud fra de samlede resultater beregnes hyppigheden af de tre genotyper, de to alleler og de to fænotyper.



- A. Størrelsesmarkørens bånd og deres størrelser.
 B. Eksempel på resultater