

## Undersøgelse af døgnrytmerelaterede genotyper i klassen

Af: *Kresten Cæsar Torp, Aalborghus Gymnasium*

### Indhold

Undersøgelse af døgnrytmerelaterede genotyper i klassen .....	1
Undersøgelsesprincip .....	2
1. Besvarelse af spørgeskema .....	4
2. Anonymisering.....	4
3. Oprensning af DNA og opformering ved PCR.....	4
Materialer .....	4
Sikkerhed .....	4
Fremgangsmåde .....	4
4. Bestemmelse af genotyper ved gelelektroforese .....	5
Materialer .....	5
Fremgangsmåde .....	6
5. Databehandling og beregning af allelhyppigheder .....	7
Fremgangsmåde .....	7
6. Resultatbehandling.....	7
Lærervejledning.....	9
Anonymisering.....	10
Primere .....	10
Primer og Mastermix (PMM).....	10
Gelelektroforese.....	11

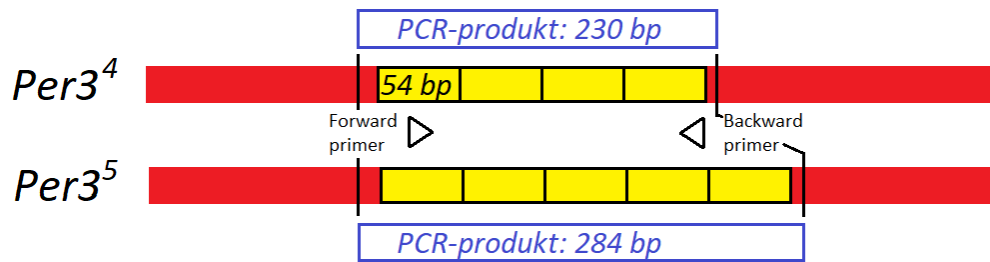
### Baggrund

Genet *Per3* koder for proteinet Per3, som indgår i reguleringen af døgnrytme.

Undersøgelser har peget på at forskellige alleler af genet, *Per3<sup>4</sup>* og *Per3<sup>5</sup>*, sandsynligvis er associerede med en persons kronotype, dvs. hvilken gruppering af foretrukken døgnrytme man placeres i. Det man populært omtaler som A- eller B-mennesker.

Genet *Per3* indeholder et VNTR-område. Dvs. et område med Variable Nuclear Tandem Repeats. I et sådan område er en kort sekvens (her på 54 bp) gentaget et antal gange, og antallet af gange varierer mellem forskellige alleler i befolkningen.

De to alleler *Per3<sup>4</sup>* og *Per3<sup>5</sup>*, vist i figur 1, adskiller sig ved at have henholdsvis 4 og 5 gentagelser (repeats).

**Figur 1.**

De to alleler og de resulterende PCR-produkter.

Vi har alle fået en allel fra hver forældre, enten to *Per3*<sup>4</sup>, to *Per3*<sup>5</sup> eller en af hver. Dvs. at man kan være en af genotyperne: *Per3*<sup>4/4</sup>, *Per3*<sup>4/5</sup> eller *Per3*<sup>5/5</sup>.

### 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).

### Undersøgelsesprincip

I undersøgelsen skal vi bestemme allelhyppigheden af allelerne *Per3*<sup>4</sup> og *Per3*<sup>5</sup> i en befolkningsgruppe i klassen. Prøverne anonymiseres før vi registrerer dem i en database. Resultatet sammenligner vi med tal fra andre undersøgelser.

Undersøgelsen består af fem trin:

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

Ved **PCR-processen** opformeres et stykke af allelen som indeholder VNTR-området. PCR-produktet, dvs. den DNA-sekvens der opformeres, afgrænses af de to anvendte primere, forward- og reverse-primer, som vist i figur 1. De to opformede sekvenser er på 230 basepar for *Per3*<sup>4</sup> og 284 bp for *Per3*<sup>5</sup>.

Primerne har følgende DNA-sekvens:

Forward-primer: 5'-CAAATTTTATGACACTACCAGAATGGCTGAC-3'  
 Reverse-primer: 5'-AACCTTGACTTCCACATCAGTGCCTGG-3'

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.

**Opgave:**

- Angiv i skemaet hvilke bånd du forventer at finde i gelen hos personer med hver af de tre mulige genotyper:

Genotype	Bånd (sæt kryds hvor du forventer bånd i gelen ved gelelektroforese)	
	230 bp	284 bp
<i>Per3</i> <sup>4/4</sup>		
<i>Per3</i> <sup>4/5</sup>		
<i>Per3</i> <sup>5/5</sup>		

## 1. Besvarelse af spørgeskema

Spørgeskemaet besvares mens du venter på prøven i varmeblokken i 15 minutter

## 2. Anonymisering

1. Hver elev trækker et nummer, som skal anvendes til udfyldelse af spørgeskemaet, og det er nummeret på prøven under DNA-oprensningen. *Din lærer må ikke se dit nummer, dine gruppe-medlemmer må godt.*
2. Når du efter DNA-oprensningen afleverer din prøve i et umærket rør, sætter du den i et nummereret hul i eppendorfrør-holderen. Din lærer tildeler nu hvert nummer en bogstavkode, som skrives på røret. Den kan nu relateres til spørgeskemaet, men ikke til eleven.

## 3. Oprensning af DNA og opformering ved PCR

### Materialer

- Bæger med 10 mL 0,9 % NaCl-opløsning per elev
- 2 stk. 1,5 mL eppendorfrør per prøve. Mærkes med elevernes prøvenummer.
- 200 µL InstaGene Matrix per elev i eppendorfrør med skrueør. Mærkes med 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 eppendorfrør 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 og bortskaffes 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 eppendorfrør mærket med dit nummer.
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. Der vil være en dråbe tilbage i bunden sammen med pellet (< 50 µL).

7. Resuspender pellet i den tilbageværende dråbe ved at vortexe eller stryge hen ad rørholderen. Der må ikke være klumper tilbage.
8. Overfør 20 µL prøve (ca. det hele) til røret med InstaGene Matrix (IGM). Luk røret og bland ved vortexe eller knipse på siden. Mærk røret med dit nummer.
9. Inkuber rørene ved 95 °C i 15 min. i varmeblokken. Efter 5 min tages prøven kortvarig op og mikses ved at knipse på siden af røret, hvorefter det sættes stilbage. *Brug ventetiden til at udfylde spørgeskemaet. Mærk det med dit elevnummer.*
10. Vortex prøven ved høj hastighed i 10 sek. *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 umærket eppendorfrør. Undgå at overføre pellet!
13. Placer din prøve i klassens eppendorfrørholder ved dit nummer.
14. Den bliver nu tildelt en bogstavkode, som kan sættes i forbindelse med dit nummer og spørgeskemaet, men som ikke kan relateres til dig.

#### Klargøring af prøver til PCR

*Husk at opbevare prøverne på is.*

15. Alle prøver mærkede med bogstavkode blandes i en skål.
16. Vælg en prøve. Du arbejder nu videre med denne prøve. Husk at mærke de efterfølgende rør med bogstavkoden.
17. Mærk et PCR-rør med bogstavkoden. Skriv på siden af røret. Mærkning på låget kan gå af i PCR-maskinen.
18. Med en pipette overføres 30 µL primer-mastermix (PPM) til pcr-røret mærket med bogstavkode.
19. Overfør 20 µL prøve til røret.
20. Prøven opblandes i PCR-røret ved at pipettere op og ned et par gange.  
*Husk at skifte pipettespidser mellem hver prøve!*
21. Låget lukkes godt og anbringes igen på is.

#### Opformering af prøver ved PCR

22. Tap røret ned i bordpladen, så dens indhold samles i bunden af PCR-røret.
23. Placer det i termocycleren. *Tjek at låget er fast lukket -det skal klikkes på.*
24. 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

## 4. Bestemmelse af genotyper ved gelelektroforese

### Materialer

- 2 % Agarose-gel i TAE-buffer tilsat SYBRsafe- eller GelGreen- DNA-stain (1 µL/10 mL agarose) (forberedes af lærer). *DNA-stain farver DNA, så båndene i gelen kan ses under uv-lys.*
- Gel-load markør (hvis den ikke er tilsat mastermix). *Gel-load er en farve som viser, hvor langt prøven er løbet i gelen.*
- DNA-størrelsesmarkør, 100-1000 bp (i fælles eppendorfrør)

- 5 og 30  $\mu\text{L}$  automatpipetter med pipettespidser og gel-load-spidseser.
- Affaldsglas.
- Gelelektroforesekommer, støbekasser, kamme og strømforsyning
- TAE-buffer til elektroforesekommer.
- Papir med skitse af gelen til notering af hvor prøverne loades.

## Fremgangsmåde

### Støbning af geler

1. Agarosen smeltes i mikrobølgeovnen
2. Agarosen afkøles til ca.  $65^{\circ}\text{C}$  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 loades 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. Fjern enderne på gel-bakken og monter gelen i elektroforesekommeret. Husk at brøndene skal være ved minus-polen.
2. TAE-buffer hældes i kammeret, så det netop dækker gelen.
3. 5  $\mu\text{L}$  DNA-størrelsesmarkør loades i første bane af hver gel.
4. *Hvis der ikke er tilsat gel-load i Mastermix: 5  $\mu\text{L}$  Gel-load tilsættes hver prøve – husk at skifte pipettespidser!*
5. Prøverne (25  $\mu\text{L}$  i alt) loades på gelerne, en i hver bane.
6. **Vigtigt:** På papiret med skitsen af gelen skrives, hvilken prøve der er loaded i hvilken brønd.

### Gelelektroforese

#### Sikkerhed:

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

**UV-transilluminatoren må kun betjenes med ansigtsbeskyttelse!**

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

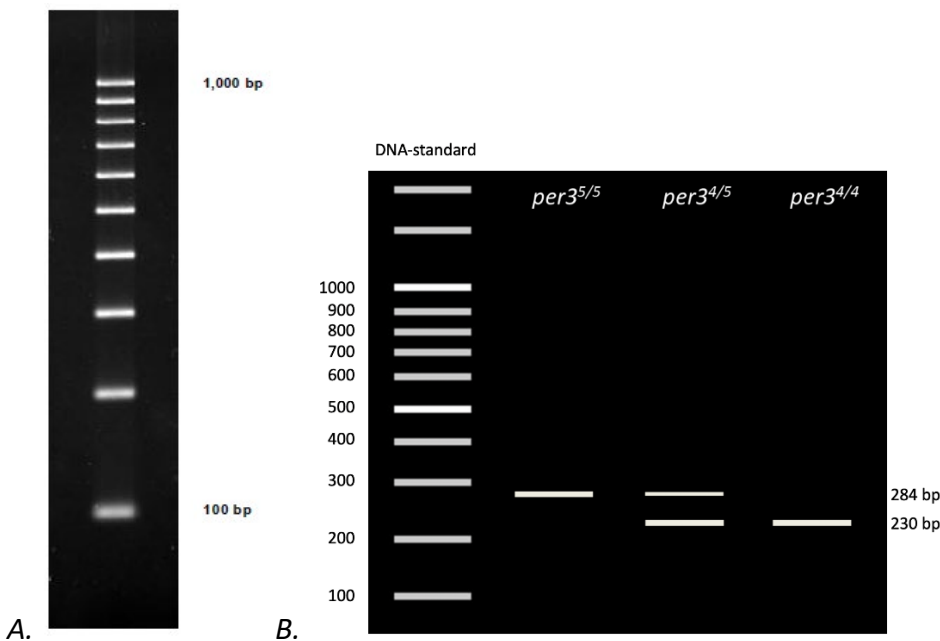
## 5. Databehandling og beregning af allelhyppigheder

### 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. Identifier bånd hos personerne, som repræsenterer de tre mulige genotyper:

Genotype	Bånd (sæt kryds hvor du forventer bånd)	
	230 bp	284 bp
$Per3^{4/4}$		
$Per3^{4/5}$		
$Per3^{5/5}$		

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.

## 6. Resultatbehandling

1. Skriv din pointscore fra spørgeskemaet, og hvilken kronotype du er ifølge det. Husk forklarende tekst.
2. Tyder resultaterne fra spørgeskemaet på, at du er en "aften-type", "morgen-type" eller "mellemtpe"? 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 genotype?
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 resultaterne fra alle de 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?
6. Forskellige genetiske associationsstudier har vist forskellige resultater i forhold til om der er en sammenhæng mellem genotyper for  $Per3$  og kronotype. Flere har vist at det er tilfældet, mens andre ikke har kunnet påvise en sådan association. Diskuter mulige årsager til at resultaterne kan være forskellige. Inddrag overvejelser fra jeres egne erfaringer med den metode I har anvendt.
7. Forklar, hvorfor man skal bruge store datasæt og en statistisk test for at undersøge om en genetisk associering er sandsynlig eller ej.

### Undersøgelse af frekvensfordeling i klassen (A-niveau).

8. Beregn genotypefrekvensen for  $Per3$  i klassen:

Genotype	Antal i klassen	Genotypefrekvens i klassen
$Per3^{4/4}$		
$Per3^{4/5}$		
$Per3^{5/5}$		
I alt		

9. Beregn allel-frekvensen af  $Per3^4$ -allelen og  $Per3^5$ -allelen i klassen. Husk, at homozygoter hver har to ens alleler, mens  $Per3^{4/5}$ -heterozygoter har én af hver.

Allel	Antal alleler i klassen	Allelfrekvens i klassen
$Per3^4$		
$Per3^5$		
I alt		

10. Diskuter, om man kan forvente, at en population vil være i Hardy-Weinberg-ligevægt mht. fordelingen af genotyper for  $Per3$ .



## Lærervejledning

Hack-laboratoriet giver mange muligheder

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?

For at starte hack-laboratoriet skal man have anskaffet følgende:

Reagenser:

- Reagens til DNA-oprensning
- DNasefrit vand
- Evt. TE-buffer
- Primermix
- Agarose
- DNA-stain
- TAE-buffer
- Primere, som indkøbes til de forskellige alleler man ønsker at undersøge.

Udstyr:

- Eppendorfrør
- PCR-rør
- Pipetter med spidser
- Isbad og rørholdere (fx små stykker skumplast med huller)
- Centrifuge med indsats til eppendorfrør
- Thermocycler
- Gelelektroforeseudstyr: Kamre, strømforsyning, UV-transilluminator.

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

### DNA-oprensning

Denne vejlednings oprensningsprocedure er modificeret efter 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 tilpasses oprensningsproceduren.

Under [sysbio.dk](http://sysbio.dk) > *Bioinformatik* > *Hvem gærer din mad?* kan findes en vejledning til oprensningskittet DNeasy power soil (fil 3B), som er en umiddelbar alsidig mulighed.

### Anonymisering

Arbejde med prøver fra mennesker kræver anonymisering, og data som kan spores til enkeltpersoner må ikke opbevares i længere tid. I dette tema er vist en procedure, hvor man kan se sammenhæng mellem genotype og fænotype (DNA-prøve og spørgeskema). 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 nøglerregel må der ikke optræder grupper i data på under 5 personer.

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.

### Primere

Primere (oligos) kan bestilles ved flere firmaer. Her er de bestilt hos Biosearch, som har produktion i Lystrup ved Århus. Link: [Order oligos easily from LGC Biosearch Technologies | LGC Biosearch Technologies](#)

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.

Primersekvensen<sup>1</sup> angives ved bestilling:

Forward-primer: 5'-CAAATTTTATGACTACTACCAGAATGGCTGAC-3'

Reverse-primer: 5'-AACCTTGTACTTCCACATCAGTGCCTGG-3'

Primere kan bestilles i flere volumener og oprensingskvaliteter. Til almindelig PCR som her, kan vælges "desalted". Primerne leveres som salt i eppendorfrør.

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.

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.

**Godt tip:** Sæt etiketter med indhold, koncentration og volumen på alle rør, de skal typisk ligge længe i fryseren og evt. kunne anvendes af kolleger.

### Primer og Mastermix (PMM)

I denne vejledning fremstiller læreren PMM på forhånd, 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> Kilde: 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 \(researchgate.net\)](#)

Mastermix kan fremstilles ud fra de indgående reagenser (taq-polymerase, nukleotider og buffer). Alternativt kan man købe en færdig Mastermix. Her er anvendt PCR BIO ultra mix red (Link: [Tag Polymerases & Mixes - PCR BIO - Copenhagen Biotech Supply \(cobio.dk\)](http://cobio.dk)). Dette er en robust Mastermix som er tilsat en rød loading dye, så man ikke skal tilsætte denne før gelelektroforese. 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	25 $\mu\text{L}$	
	Per reaktion	Per klasse (35 reaktioner)
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.

#### Gelelektroforese

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 kan farves med forskellige dyes. Her er anvendt SYBRsafe, som kan tilsættes agarosen efter afkøling til ca. 65 °C, mens de stadig er flydende. Herefter støbes gelerne. Alternativt kan gelerne farves efter elektroforese.