

Biotechnology Explorer

Orensning af genomisk DNA fra plantemateriale



Manual

Katalog nr. 166-5005EDU

explorer.bio-rad.com

**Oversat og bearbejdet af
Birgit Sandermann Justesen ,
Nærum Gymnasium, februar 2009**

Indhold:

Introduktion

Tjekliste

Sikkerhedsforhold

Om forsøgets gang

Velegnet plantemateriale

Lærerens forberedelse

Elevvejledning

Nukleinsyre-ekstraktion

I dette kit, nukleinsyre-ekstraktion, benyttes en relativ simpel metode, hvorved det er muligt at ekstrahere op til 5 µg genom-DNA (gDNA) fra forskellige planter. Der benyttes en silica-membran teknologi og optimerede vandopløselige reagenser. Den mængde plantemateriale hvorfra DNA et udtrækkes er ca 50-100 mg.

I første omgang udvælges den planteart, hvorfra man vil udtrække DNA. Det kan enten være en plante, som i forvejen er meget kendt forskningsmæssigt fx Arabidopsis eller det kan være planter, der ikke er så gennemstuderede. Der er mere end 250.000 arter at vælge imellem, så der er masser af muligheder.

Eleverne bør have grundlæggende viden om molekylærbiologi, kunne regne med molaritet, og have kendskab til de mest grundlæggende mikrobielle teknikker som at pipettere.

Ikke al teori vil blive gennemgået her, idet der henvises til gængse lærebøger
Det tager ca 2 timer at udføre forsøget

Tjekliste:

<u>I kittet</u>	<u>mængde</u>
DTT	0,3g
Lyseringsbuffer	20 mL
Vaskebuffer	20 mL
Sterilt vand	2 mL
Mikropistiller	25
Opsamlingsrør (uden låg)	25
Mikrocentrifugerør, 1,5mL	30
Mikrocentrifugerør, 2 mL flere farver	60
Mini DNA-ekstraktionssøjler, lilla	25

Eget udstyr

95-100% ethanol	300 mL
Demineraliseret vand	14 mL
Vandbad (70 °C)	
Vægt	
Vejebåde/vejepapir	
Mikrocentrifuge (12.000 rpm)	
Mikropipetter 20-200 µL	
Spidser til ovennævnte	
Mikropipette 1000µL	
Spidser til ovennævnte	
Holder til mikrocentrifugerør	1 pr. gruppe
Mærkepenne	1 pr. gruppe
Skalpel e.l.	2 pr. gruppe
Ekstra mikrocentrifugerør til fordeling	4 pr. gruppe
Planter! – helst 2 forskellige	

Nukleinsyreekstraktion

Det er muligt at købe refill #166-5006EDU, der indeholder DTT, lyseringsbuffer, vaskebuffer og sterilt vand

Sikkerhed

Almindelig laboratoriesikkerhed. Det anbefales at man bærer kittel og evt. handsker. Lyseringsbufferen indeholder guanidin thiocyanat i opløsning – kontakt med huden, øjne og tøj skal undgås.

Ved uheld fx at man får noget fra opløsningerne i øjnene skylles øjnene med vand i 15 minutter

Trinene i forsøget:

- Indsaml plantemateriale
- Åbning cellemembranen og cellevæggen ved kemiske (lysering) og fysiske processer (cellerne knuses)
- Fjernelse af cellerester (centrifugering – DNA vil forblive i supernatanten)
- Fjernelse af de sidste celle-proteiner ved silica membran-teknologi eller ion-bytnings-kromatografi)
- Oprensning af DNA
- Opkoncentrering af DNA (hvis nødvendigt)
- Bestemmelse af renhed og koncentration af DNA (hvis nødvendigt)

Udvælgelse af plantematerialet

Bemærk unge friske blade egner sig bedst. Placer plantematerialet i mørke 1-2 dage før de friske blade skal bruges – derved reduceres mængden af polysaccharider i materialet.

Liste over velegnet plantemateriale

gulerod
kålblade
løg
græs
spinatblade
batat – sød kartoffel
mynte

Om den fysiske og kemiske behandling af plantematerialet

På grund af de mere eller mindre genstridige cellevægge er det nødvendigt at gå grundigt til værks for at knuse disse. I nogle tilfælde er det allerbedst, hvis planterne lynfryses i flydende kvælstof, før de knuses, idet selve DNA'et derved skades mindre, da den lavere pH, der ellers opstår, når der frigives syrer fra cellens organeller, minimeres

I lyseringsbufferen er der EDTA som fjerner magnesiumioner, hæmmer nucleaser og ydermere virker destabiliserende på både cellevæg og cellemembran.

XXXX

Lærerens forberedelse (ca 30 minutter):

1. Læs manualen igennem
2. Indsaml af plantemateriale – eller lad eleverne sørge for dette
3. Tænde vandbadet til 70 °C
4. Varm det sterile vand til 70 °C – skal bruges til eludering af DNA
5. Klargøring af lyseringsbufferen.
 - a. Tilsæt 0,3g DTT (dvs. rørets indhold) til 20 mL lyseringsbuffer – slutkoncentrationen bliver 100 mM DTT. Stil straks blandingen i køleskab ved 4°C . Blandingens kan opbevares i fryseren ved -20 °C i op til 2 mdr. Hvis man ønsker at gemme resten af lyseringsbufferen til senere anbefales det, at man kun fremstiller den nødvendige mængde.
6. Klargøring af vaskebufferen
 - a. Fyld 5x vaskebuffer-bøtten op til mærket (etikettekanten) med 96% ethanol – det betyder, at der skal tilsættes 80 mL 96% ethanol. Den færdige vaskebuffer kan opbevares ved stuetemperatur i op til ét år.
7. Klargøring af ethanolen (ca. 75%)
 - a. Tilsæt 6 mL 96% ethanol til 14 mL demineraliseret vand
8. Gør gruppearbejdspladserne klar

Materialer pr. gruppe

Skalpeller	2
Spækbræt/skæreplade	2
1,5 mL mikrocentrifugerør	2
2 mL mikrocentrifugerør	2
2 ml opsamlingsrør	4
Mikropistiller	2
Sterilt vand	200µL
Lyseringsbuffer	2 mL
Vaskebuffer	5 mL
Mini-DNA-ekstraktionssøjle, lille	2
1000µL mikropipette	1
spidser til ovenstående	
20-200µL mikropipette	1
Spidser til ovenstående	
Tush	
70% ethanol	
Plantemateriale	

Fremgangsmåde

1. Mærk de to 1,5mL mikrocentrifugerør med jeres initialer og navnet på planten, der skal i røret.
2. Tilsæt 200µL lyseringsbuffer til hvert af de to rør
3. Afvej 50-100 mg af hver plante og noter den eksakte vægt

Plantens navn	Hvilken del af planten analyseres (blad, stængel etc.)	Vægt (mg)

--	--	--

4. Skær plantematerialet i bittesmå stykker (mindre end 1 mm i diameter). Husk at holde de to planter adskilte og brug ikke samme skalpel. Put plantestumperne ned i respektive mikrocentrifugerør med lysteringsbuffer
5. Tag en mikropistil og knus materialet yderligere i 3 minutter. Undgå at spilde lysteringsbufferen. Tjek om materialet er fuldstændigt findelt, hvis ikke fortsættes.
6. Når materialet er blevet til en homogen masse tilsættes yderligere 500 µL lysteringsbuffer og fortsæt med at knuse og blande til en homogen blanding.
7. Luk mikrocentrifugerøret og sæt det i centrifugen. Når alle har sat deres rør i centrifugen centrifugeres der ved 12.000 rpm i 5 minutter ved stuetemperatur.
8. Mens der centrifugeres tilsættes der 500µL 70% ethanol til 2 mærkede mikrocentrifugerør pr. planteekstrakt.
9. Tag rørene i centrifugen. Fra hvert rør flyttes forsigtigt 400µL af supernatanten over i et rør med 500µL 70% ethanol. Sørg for at få materialet over i de korrekt mærkede rør. Undgå at få fast materiale fra pellet med. For at blande supernatanten med ethanol pipetteres **FORSIGTIGT** op og ned med en mikropipette med ren spids. Dette er nu den klargjorte lysat-ethanolblanding
Bemærk: Hvis der kan ses en udfældning (sker fx med stivelse fra kartofler) centrifuger da røret en gang til for at bundfælde stivelsen og brug derefter supernatanten til næste trin.
10. Mærk 2 lilla minikolonne (mini-DNA-ekstraktionssøjler) med jeres initialer og plantens navn. Stil søjlen i et opsamlingsrør
11. Overfør 800µL af lysat-ethanolblandingen til hver søjle. Der må ikke være fast materiale i blandingen
12. Stil opsamlingsrørene med kolonnerne i centrifugen og centrifuger ved 12.000 rpm i 5 minutter.
Hvis der stadig er noget supernatant tilbage i søjlen kasseres dette. Det hjælper **ikke** at centrifugere yderligere.
13. Tilsæt 700µL vaskebuffer til hver søjle. Centrifuger ved 12.000 rp, i 5 minut. Kasser den væske, der er løbet gennem søjlen. Gentag processen så der i alt er vasket 3 gange
14. Tøm det sidste gennemløbsvæske. Stil søjlen tilbage i opsamlingsrøret. Tør søjlerne ved at centrifugere i 2 minutter ved 12.000 rpm. Herved fjernes de sidste eventuelle rester af vaskebuffer.
15. Flyt hver søjle til et farvet, rent mikrocentrifugerør der er mærket korrekt.
16. Tag det sterile vand fra 70 °C vandbadet. *Det varme vand hjælper desorpsprocessen fra kolonnen.* Afpipetter straks 80µL varmt sterilt vand og placer det på filteret i bunden af hver søjle. Sørg for at søjlen derved bliver fugtet. Lad det stå ved stuetemperatur i 1 minut.
17. Flyt mikrocentrifugerøret med søjle over i centrifugen. Sørg for at låget vender nedad. Centrifuger i 2 minutter ved 12.000 rpm. Fjern søjlen fra mikrocentrifugerøret. Luk mikrocentrifugerøret. Røret indeholder genomDNA fra planten og fryses ved -20°C.
Undgå at fryse og tøj hvis muligt, idet det kan ødelægge DNA'et. Plasmid DNA er supercoilet, men fryses detsnoes det efterhånden op.

Nukleinsyreekstraktion

Hvis man, inden man går videre med PCR etc. vil sikre sig, at der er nok DNA i prøven, kan man køre en elektroforese med 10µL prøve på en 0,8-1,0% agarosegel ved 75V i 1 time. GenomDNA (gDNA) vil kunne ses som et fint bånd i toppen af gelen. RNA vil kunne ses som to tyndere bånd længere nede i gelen. Bemærk: Nogle planter viser ikke resultat i denne elektroforesetest, men vil efter PCR have dannet nok materiale til at man kan arbejde videre med det i de næste forsøg.

[Læs nærmere om elektroforese i](#)

[Billede fra Århus...](#)