

GAPDH PCR modul Manual

Katalog nr. 166-5010EDU



explorer.bio-rad.com

Kopiering kun tilladt til undervisningsbrug

Bemærk: Kittet indeholder temperaturfølsomme dele. Åbn derfor straks kassen og læg de pågældende dele til opbevaring ved den anbefalede temperatur.

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

Indledning

PCR er i dag en meget benyttet teknologi i forskning, i retsgenetiske analyser og i laboratorier. Blandt de mange anvendelsesmuligheder af PCR er også muligheden for at bruge PCR til at klonere gener også i tilfælde, hvor man ikke kender genomet. Ved at designe primerne ud fra kendte beslægtede organismers DNA er det muligt at få amplificeret de gener, man ønsker. Metoden, der kaldes *nested DNA*, er en to-trinsproces. I den første PCR-runde amplificeres de gener, der har sekvenser, der ligner det gen, der skal undersøges. I den anden runde PCR amplificeres mere specifikt de gener, der har interesse efter første runde.

Overblik

Teori: DNA, DNA-replikation, PCR, primerdesign, de generede primere, nested PCR
For-forsøg: ekstraktion af genomDNA fra forskelligt plantemateriale
(Nukleinsyre-ekstraktion)

Del 1: Klargøre til første PCR, PCR, elektroforese og analyse af resultaterne

Del 2: Behandling af DNA med exonuclease, klargøre til PCR, PCR, elektroforese og analyse af resultaterne

Afslutning: Opsamling og endelig tolkning af resultaterne

Eleveforudsætninger

Kittet kræver et større overblik og er derfor designet til elever, der har enten molekylær biologi eller bioteknologi på A-niveau. Det forudsættes, at eleverne allerede har kendskab til og prøvet PCR-teknikken.

Tjekliste

<u>I kittet</u>	<u>Mængde</u>
Initial GAPDH PCR-primer 50µL	1
Nested GAPDH PCR-primers 50µL	1
PCR master mix 1,2mL	3
Plasmid control DNA 1 mL	1
Control <i>Arabidopsis</i> genomDNA	1
Exonuclease I, 50µL	1
Molekylær vægt-lineal	1
Sterilt vand 2,5mL	1
PCR-rør 0,2mL	150
Adaptorer til PCR-rør 1,5ml	150
Farvede mikrocentrifugerør	120
Skumholdere til mikrocentrifugerørerne	12

Nødvendigt udstyr

Mikropipette 2-20µL	1 pr. gruppe
Mikropipette 20-200µL	1 pr. gruppe
Pipettespidser med aerosolbarriere til ovennævnte pipetter	
PCR-maskine	
Elektroforeseudstyr	

Udstyr det er rart at have

Nyt ekstraheret plante DNA (fra kittet "Nukleinsyre-ekstraktion")

Ultracentrifuge

Vortexer

Enten ethidium-agarose elektroforeseudstyr eller fast-blast-agarose elektroforeseudstyr

Teori

xxx

Lærerens forberedelse

Teoretiske noter

I dette forsøg skal eleverne lave to runder med PCR. For at amplificere en del af GAPC-genet fra genom DNA. Genom-DNA kan skaffes på 3 måder 1) GenomDNA udvundet ved ekstraktion af plantemateriale eller 2) fra et forskningslaboratorium eller 3) ved at bruge det i kittet medfølgende *Arabidopsis* genom DNA. I den første PCR benyttes degenererede primere for at amplificere en større del af DNA stykkerne. I modsætning til normale primere, der er syntetiserede med en nucleotid på hver position har degenererede primere en eller flere positioner, hvor der er syntetiseret forskellige nukleotider.

Start (initial) primeren ser sådan ud:

GABTATGTTGTTGARTCTTCWGG

Degenereringen ses i position 3, 15 og 21

Position	IUB kode	Baser
3	B	G/T/C
15	R(purin)	G/A
21	W(Weak)	A/T

Den reverse primer er dannet på samme måde.

I anden PCR-runde i 'nested PCR' benyttes mere specifikke primere til at amplificere et specifikt GAPCgen fra genom-poolen. Disse primere er ikke degenererede, men findes inde i sekvensen fra de første primere. Se fx:

Initial primer	GABTATGTTGTTGARTCTTCWGG
Nested primer	CTACTGGTGTCTTCACTGACAA

Primerne binder ikke lige godt til alle plantearter, hvorfor der vil være forskellig PCR-effektivitet hos de forskellige arter. Det kan sagtens ske, at eleverne allerede efter første PCR-runde får fragmenter, der er gode nok til at kloner. Det vil sige at der er nok DNA (der kan ses bånd på en gel), kvaliteten er god nok (der er et eller flere bånd) og fragmenterne har den forventede størrelse. Men for at være på den sikre side anbefales det på det kraftigste, at man gennemfører begge PCR-runder. Det kan dog stadig ske, at nogle elever selv efter to PCR-runder ikke har fået nok DNA.

Hvis eleverne benytter det DNA, de selv har ekstraheret fra plantemateriale anbefales det, at de som kontrol benytter de *Arabidopsis* genom-DNA, der følger med kittet.

Derudover følger der med kittet plasmid DNA, der koder for target(mål)delen af GAPDHgenet fra *Arabidopsis* og hvis dette benyttes som skabelon i begge PCR-runder er man sikker på, at PCR'en virker. Ved at lave disse forskellige

kontrolforanstaltninger lærer eleverne noget om kontrollers betydning, men samtidig

kan kontrolreaktionen fungere som en slags klonbar PCRprodukt, hvis deres egne prøver ikke virker.

Endelig anbefales det at man også arbejder med en negativ kontrol.

Lærerens forberedelse

1. Fortynd 5x genom *Arabidopsis* DNA (25ng/ μ L) med sterilt vand til 5ng/ μ L. Det gøres ved at tage 20 μ L DNA og blande med 80 μ L vand. Blandes godt. Hver gruppe har brug for 6 μ L.
2. Læreren kan evt. blande mastermixen med primere. Elevvejledningen lægger dog op til, at eleverne ud fra beregninger af molaritet selv blander deres mastermix med primere. Tidligst 30 minutter før forsøget blandes mastermixen. Hver gruppe skal bruge 120 μ L 2x mastermix med primere til 5 PCR reaktioner. Tilsæt 30 μ L specifikke primere (blå i første runde, gul nested primere i anden runde) til 1500 μ L BioRad2x mastermix bland godt
3. Før anden PCR-runde placeres exonuclease I på is
4. Fremstil 500bp molekylær vægtlinealen: Tilsæt 100 μ L 5x orange G Loading Dye til den medfølgende 500bp molekyl-vægt-lineal
5. Læreren eller elever gør klar til at lave elektroforese. Der støbes 1% agarosegel i TAE-buffer. Hver gruppe har brug for to geler.
6. Programmer PCR-maskinen

Første PCR-runde – initial GAPDHPCR:

Start denaturering 95 °C i 5 minutter

Derefter 40 cykler:

Denaturering 95 °C i 1 minut

Annealing 52 °C i 1 minut

Extension 72 °C i 2 minutter

Afslutnings extension 72 °C i 6 minutter

Slut 15 °C uendeligt

Anden PCRrunde – nested GAPDHPCR:

Start denaturering 95 °C i 5 minutter

Derefter 40 cykler:

Denaturering 95 °C i 1 minut

Annealing 46 °C i 1 minut

Extension 72 °C i 2 minutter

Afslutnings extension 72 °C i 6 minutter

Slut 15 °C uendeligt

Elevvejledning

Det gen, der skal analyseres skal studeres i dette forsøg koder for GAPDH – dvs. **glycerolaldehydfosfatdehydrogenase**, - et af glykolysens enzymer. GAPDH er et meget vigtigt enzym i glykolysen (Læs selv om glykolysen i din biokemibog) og det udtrykkes konstant og samtidig er det livsvigtigt for cellens overlevelse. Eftersom der er rigeligt med GAPDH i cellerne og det er muligt at oprense enzymet ved man også meget om enzymet proteinstruktur og dets funktion. GAPDH består af 4 underenheder der holdes sammen af ikke-kovalente bindinger. I nogle tilfælde er alle fire underenheder ens, i andre tilfælde er der små forskelle. Hver underenhed har et aktivt område, hvor der kan bindes en NAD^+ co-faktor.

Selvom der er GAPDH i alle organismer er det ikke ensbetydende med, at organismernes genetiske kode for GAPDH er ens, idet mængde og størrelsen af fx introns kan variere. I første PCR runde bruges der en primer, der stammer fra nærtbeslægtede organismer, som Arabidopsis (også en plante) og denne primer vil nok virke, men ikke optimalt. Men der amplificeres dog en del Dna og i anden PCR-runde kan man være mere specifik med hensyn til at ”fange” det DNA, der koder for GAPDH.

Materialer pr. gruppe:

BioRad 2x master-mix	120 μL
Blå initial primer	4 μL
gDNA fra planter (tidligere forsøg)	2
1x Arabidopsis gDNA (fortyndet til 5ng/ μL)	6 μL
Kontrol pGAP plasmid DNA	6 μL
2-20 μL mikropipette	
spidser til mikropipetten	
PCR-rør	5
PCR-adaptorer	5
Mikrocentrifugerør	1
Holder til rørene	
Tusch	
isbad	

Første PCR-runde (Initial PCR)

Bemærkning: Såfremt læreren fremstiller mastermixen springes punkt 3 over.

1. Gruppen starter med planlægningen af første PCR-runde. I startrunden skal der laves PCR på Arabidopsis gDNA (gDNA=genomDNA), på pGAP plasmid DNA (positiv kontrol), på mindst én plantes gDNA samt på en negativ kontrol, som består af sterilt vand i stedet for DNA. Tegn en tabel så I har styr på, hvad der står på de pågældende rør, hvilken skabelon, der er benyttet og hvilke primere, der har været brugt.

Mærke på PCR-røret	Skabelon	Primere

--	--	--

2. Tidligst 30 minutter før PCR-reaktionen skal starte, fremstiller I jeres mastermix.

Mastermix er en blanding bestående af alle de reagenser, der er nødvendige for PCR nemlig Taq polymerase, dNTP, buffer og salt. Mastermixen er dog først klar til brug, når der også er tilsat primere.

I kittet er der en 2x mastermix (klar væske). Denne vil, når den blandes i PCR-rørene med en tilsvarende mængde DNA-skabelon (jeres prøver, der skal køres PCR på) opnå den rette koncentration; 1x.

Vi skal nu beregne, hvor meget mastermix, der skal bruges:

Hver PCR-prøve kræver 40µL. Dvs. hver prøve skal bruge 20µL 2xMMIP (dvs 2x **mastermix initial primere**) plus 20µL DNA-skabelon.

Hvis I således regner med at køre 5 prøver skal I i alt bruge 5 x 20µL 2xMMIP. Dertil skal I nu beregne, hvor megen initial-primer, der skal tilsættes: Primeren leveres i en koncentration på 100µM og den er **blå**. Til selve PCR'en kræves kun en koncentration på 2µM.

Beregn nu hvor meget initial-primer, der skal tilsættes 2xMMIP:

Formel: $M_1 \times V_1 / M_2 = V_2$

Vi har altså:

Mængde initial-primer i µL=

(koncentration af primer i µM)x(volumen af 2xMMIP i µL)

(given primer-koncentration i µM)

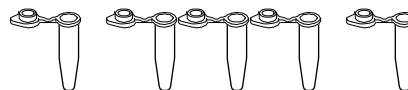
Tidligst 30 minutter før starten på PCR tilsætter I den beregnede mængde initial-primer til den afmålte mængde 2xMMIP (mastermix) i et skruelågs-mikrocentrifugerør. Bland grundigt ved at knipse på røret eller brug en vortexer. Den færdige blanding er **blå**

Stil det på is!

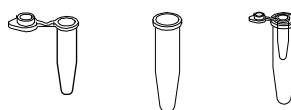
Note: Initial-primerne sætter sig fast udenfor selve target-området. (Se mere i jeres teoribøger om dette)

3. Mærk 5 PCR-rør med jeres initialer og følgende numre:

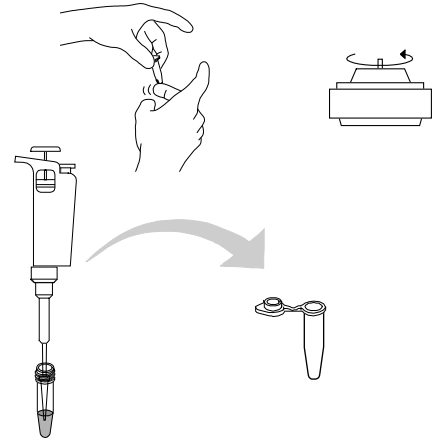
- 1 Negativ kontrol (sterilt vand)
- 2 *Arabidopsis* gDNA
- 3 Positiv kontrol pGAP plasmid
- 4 Plante 1 gDNA
- 5 Plante 2 gDNA



4. Stil rørene i en PCR-adaptor, luk hvert rør og stil PCR-adaptorerne med PCR-rørene på is.



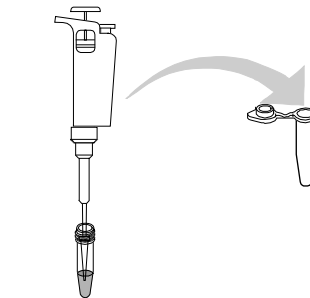
5. Tag den færdigblandede blå mastermix og knips på røret og giv det evt. en kort centrifugering for at få indholdet ned i bunden



6. Tilsæt 20µL færdigblandet blå mastermix til hvert af de 5 mærkede rør

Blå mastermix

7. Skift pipettespids og tilsæt 15µL sterilt vand til hvert rør



sterilt vand

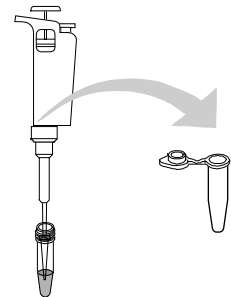
8. Tilsæt 5µL negativ kontrol til det første rør.
Sug forsigtigt op og ned med pipetten for at blande godt.

Skift spids og tilsæt 5µL *Arabidopsis* gDNA til rør nr. 2 – bland

Skift spids og tilsæt 5µL positiv kontrol til rør 3 – bland

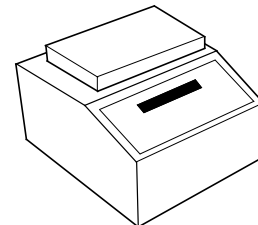
Skift spids og tilsæt 5µL plante 1 gDNA til rør 4 - bland

Skift spids og tilsæt 5µL plante 2 gDNA til rør 5 – bland



DNA-prøver

9. Når alle grupper er klar stilles rørene i PCR-maskinen



10. Start PCRreaktionen:

Første PCR-runde – initial GAPDHPCR:

Start denaturering 95 °C i 5 minutter

Derefter 40 cykler:

Denaturering 95 °C i 1 minut

Annealing 52 °C i 1 minut

Ekstension 72 °C i 2 minutter

Afslutnings-ekstension 72 °C i 6 minutter

Slut 15 °C uendeligt

GAPDH PCR modul

Hvis der er overskydende gDNA stilles det straks i fryseren

11. Gør klar til elektroforese. Støb en 1% agarosegel i TAE-buffer
12. Tag prøverne ud af PCR-maskinen
13. Mærk 5 mikrocentrifugerør som før og tilsæt 5 μ L 5x Orange Loading Dye til hvert rør.
14. Afpipetter 20 μ L fra hvert af de respektive rør til de nye rør. Sug op og ned med pipetten for at blande. **Vigtigt! De resterende 20 μ L i PCR-rørene skal bruges til anden PCR-runde!**
15. Sæt 10 μ L 500bp molekyl-vægt-lineal i første brønd og derefter 20 μ L af hver prøve i de næste brønde. Noter rækkefølgen. Kør elektroforesen

Bemærk: Båndene i molekyl-vægt-linealen er: 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500 og 5000bp

16. Studer resultatet og noter det.

Bemærk: pGAP-plasmidkontrollen skulle gerne vise et bånd ved ca 1kb. For plante gDNA er det relativt normalt, at der ses flere bånd eller modsat kun yderst svage bånd. Der kan dog sagtens stadig være gode muligheder for amplificering i anden PCR-runde.

17. Den del af prøverne, der skal arbejdes videre med, stilles i køleskabet!

Anden PCR-runde (Nested PCR)

1. I skal nu planlægge jeres nested-PCR eksperiment. Der vil blive udført nested-PCR på de prøver, der indeholdt gDNA (gDNA=genomDNA). Derudover laves der såvel en positiv kontrol som en negativ kontrol. Som i første del laver I en oversigtstabel over indholdet i de forskellige rør:

Mærke på PCR-røret	skabelon	Fortyndingsfaktor	Primere

2. Tidligst 30 minutter før PCR-reaktionen skal starte, fremstiller I jeres mastermix.

Mastermix er en blanding bestående af alle de reagenser, der er nødvendige for PCR nemlig Taq polymerase, dNTP, buffer og salt. Mastermixen er dog først klar til brug, når der også er tilsat primere.

I kittet er der en 2x mastermix (klar væske). Denne vil, når den blandes i PCR-rørene med en tilsvarende mængde DNA-skabelon (jeres prøver, der skal køres PCR på) opnå den rette koncentration; 1x.

Vi skal nu beregne, hvor meget mastermix, der skal bruges:

Hver PCR-prøve kræver 40µL. Dvs. hver prøve skal bruge 20µL 2xMMNP (dvs 2x **mastermix** nested **primere**) plus 20µL DNA-skabelon.

Hvis I således regner med at køre 5 prøver skal I i alt bruge 5 x 20µL 2xMMNP. Dertil skal I nu beregne, hvor megen nested-primer, der skal tilsættes: Primeren leveres i en koncentration på 25µM og den er **gul**. Til selve PCR'en kræves kun en koncentration på 0,5µM.

Beregn nu hvor meget nested-primer, der skal tilsættes 2xMMNP:

$$\text{Formel: } M_1 \times V_1 / M_2 = V_2$$

Vi har altså:

Mængde nested-primer i µL=

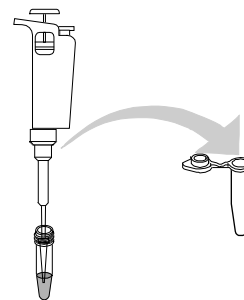
$$\frac{\text{(koncentration af primer i } \mu\text{M)} \times \text{(volumen af 2xMMNP i } \mu\text{L)}}{\text{(given primer-koncentration i } \mu\text{M)}}$$

Tidligst 30 minutter før starten på PCR tilsætter I den beregnede mængde gul nested-primer til den afmålte mængde 2xMMNP (mastermix) i et skruelågs-mikrocentrifugerør. Bland grundigt ved at knipse på røret eller brug en vortexer. Den færdige blanding er **gul**

Stil det på is!

Note: nested-primere arbejder på selve target-området. (Se mere i jeres teoribøger om dette)

3. Først skal ikke-inkorporerede primere fra første runde fjernes ved hjælp af exonuclease I. Brug en ny pipettespids hver gang når I pipetterer 1µL exonuclease I til hvert 'Første-runde-PCR-rør, der indeholder gDNA (dvs. rør 2, 4 og 5). Bland godt.



4. Inkuber i 15 minutter ved 37 °C



37°C vandbad

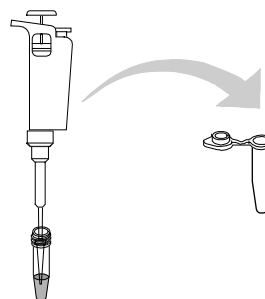
5. Inaktiver enzymet ved derefter at inkubere i 15 minutter ved 80 °C.



80°C vandbad

Hvorfor er det nødvendigt at inaktivere exonucleasen?

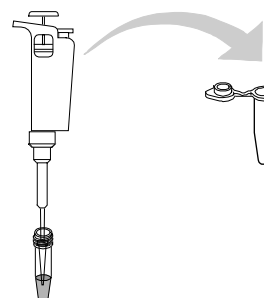
6. Mærk et mikrocentrifugerør til hvert af de exonucleasebehandlede første-runde-PCR-rør.
exo *Arabidopsis* gDNA
exo plante 1 gDNA
exo plante 2 gDNA



7. PCR'en fra første runde skal nu fortyndes. Tilsæt 98µL sterilt vand til hvert af mikrocentrifugerørerne

sterilt vand

8. Skift pipettespids og tilsæt 2µL af de respektive exonucleasebehandlede PCR-prøver til de tilsvarende mærkede mikrocentrifugerør. Luk låget

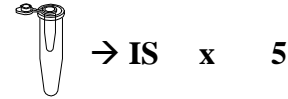


exonucleasebehandlede PCR-prøver

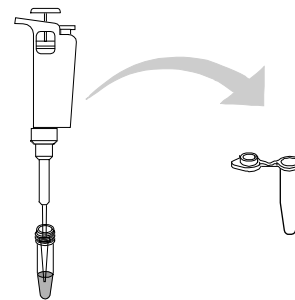
9. Knips på røret eller brug en vortexer.
Centrifuger efterfølgende kort for at få
alt ned i bunden af røret.



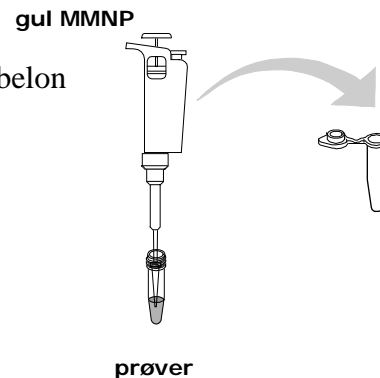
10. Mærk 5 nye PCR-rør ift. jeres skema og
stil disse i PCR-adaptorer og derefter på is.



11. Tilsæt 20µL gul MMNP til hvert PCR-rør



12. Idet I følger jeres skema, tilsætter I 20µL skabelon
til hvert af de respektive prøver (fortyndet
første-runde-PCR, *Arabidopsis* gDNA,
pGAPplasmid DNA og sterilt
vand) til de tilsvarende PCR-rør



13. Stil PCR-rørene i PCR-maskinen. Kør programmet

Anden PCRrunde – nested GAPDHPCR:

Start denaturering 95 °C i 5 minutter

Derefter 40 cykler:

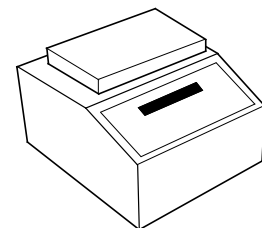
Denaturering 95 °C i 1 minut

Annealing 46 °C i 1 minut

Ekstension 72 °C i 2 minutter

Afslutnings ekstension 72 °C i 6 minutter

Slut 15 °C uendeligt



14. Tag prøverne ud af termalcyklere/PCR-maskinen

15. Tilsæt 5µL 5x loading dye til 5 nye PCR-rør og afpipetter 20µL fra hvert af de
respektive rør til de nye rør. Sug op og ned med pipetten for at blande.

**Vigtigt! De resterende 20µL i PCR-rørene skal bruges til ligering og
transformation og fryses derfor.**

GAPDH PCR modul

16. Sæt 10 μ L 500bp molekyl-vægt-lineal i første brønd og derefter 20 μ L af hver prøve i de næste brønde. Noter rækkefølgen. Kør elektroforesen.

Bemærk: Båndene i molekyl-vægt-linealen er: 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500 og 5000bp

17. Tolk resultatet.

De fragmenter af GAPC der er blevet amplificeret varierer i størrelse fra art til art. Den forventede størrelse er 0,5 -2,5 kb. Der ses af og til dubletter – dvs to DNA fragmenter på samme størrelse hos nogle plantearter. Dette skyldes sandsynligvis, at to homologe GAPC-gener er blevet amplificeret.