

Biotechnology Explorer™

Kromosom 16 PV92 PCR Kit

Katalog nr.166-2500EDU

explorer.bio-rad.com

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

Kopiering kun tilladt ved brug i undervisningen

The logo for Bio-Rad, featuring the word "BIO-RAD" in a bold, sans-serif font. The letters "BIO" are white and set against a black rounded rectangular background, while "RAD" is black and set against a white rounded rectangular background.

For teknisk service bedes du ringe til dit lokale Bio-Rad kontor Office
or in the U.S. Call **1-800-4BIORAD** (1-800-424-6723)

4110052

Tjekliste

I nedenstående liste findes en oversigt over de dele, der følger med kittet. Desuden findes en oversigt over det udstyr, der er nødvendigt for at gennemføre forsøget.

Tjek venligst udstyrslisten før forsøget udføres.

Kittets indhold:

Dele, der skal opbevares ved -20 °C (temperaturfølsomme komponenter)

PV92 homozygot (+/+) kontrol 100 µL	1 glas
PV92 homozygot (-/-) kontrol 100 µL	1 glas
PV92 heterozygot (+/-) kontrol, 100 µL	1 glas
PCR mastermix 2x, 1,2mL	1 glas
Forward og revers primermix, 50x, 25 µL	1 glas
EZ Load™ molekyle masse lineal (DNA standard) 100 µL	1 glas

Dele, der skal opbevares i køleskab (4 °C)

50x TAE buffer, 100 mL	1
Agarosepulver, 5g	1
Fast Blast™ DNA farve, 500x, 100mL	1 flaske
InstaGene™ matrix, 20mL	1 flaske
PV92 XC markørfarve (loading dye), 5x, 1mL	1 glas

Dele, der skal opbevares ved stuetemperatur

PCR-rør	50
Skruelågseppendorfrør, 1,5mL	50
Eppendorfrør – uden låg, 1,5mL	50
PCR-rør med låg, 0,5 mL	60
Skum-holdere til eppendorfrørene	16
Bakker til gelfarvning	4
Manual på engelsk	1

Nødvendigt tilbehør/udstyr, som ikke er indeholdt i selve kittet

Til eleverne:

Mikropipetter 2-20 µL
 Spidser til mikropipetter
 Elektroforeseapparat – vandret
 Strømforsyning
 Bakker med knust is
 Tuscher til at mærke med
 Affaldsbeholdere
 Bægre med 10 mL 0,9 % NaCl-opløsning
 Pincetter
 Sakse

Fællesudstyr i laboratoriet

Mikropipetter 0-20 µL, 20-200 µL og 100-1000 µL
 Pipettespidse til ovennævnte

Termocykler eller 3 vandbade til manuel styring	
Mikrobølgeovn	
Vandbad 56°	
Vandbad 100°	
Protease (til forsøget med hårfolliklen),	1,3 mL
0,9% saltvand	500mL
Destilleret eller demineraliseret vand	500 mL
1000 mL erlenmeyerkolbe eller BlueCap flaske til agarosefremstilling	1
Lab tape	
Mikrocentrifuge	

Udstyr det vil være rart at have

Rystebord
Vortexer (reagensglasmikser)

Bemærk: Det er vigtigt, at de forskellige dele opbevares ved den angivne temperatur (se de enkelte kemikalier!).

I den medfølgende manual såvel som i adskillige lærebøger kan man læse om PCR-teknikken. Her vil kun dele af teorien blive taget med, hvorfor der henvises til manualen og andre kilder.

Lidt om PCR

PCR teknikken blev udviklet i 1983 af Kary Mullis ved Cetus Corporation. PCR, der betyder **polymerase chain reaction**, har virkelig sat skub i molekylærbiologien som et videnskabeligt redskab. Inden man opfandt PCR-teknikken var det ofte svært at få materiale nok, når man arbejdede med DNA. PCR-teknikken har især haft betydning inden for de fire områder, genkortlægning, kloning, DNA-sekventering og DNAanalyser.

I dag bruges PCR som et medicinsk diagnostisk redskab, bl.a. ved undersøgelser af specifikke mutationer, som kan være årsag til genetiske sygdomme, ved kriminelle retsgenetiske sager og ved analyser af det humane genom.

PCR og bioteknologi – hvad er det? Og hvorfor har metoden revolutioneret et helt videnskabeligt område?

Ved PCR-teknikken kan man producere en særlig stor mængde af et specifikt DNA, blot man har en lille smule udgangsmateriale, en ”skabelon”. Udgangsmaterialet kan være alle former for dobbeltstretet DNA. Selv små mængder fx en dråbe blod, en enkelt hårfollikel eller en kindcelle er nok til at blive mangedoblet ved hjælp af PCR. Netop det, at man kun behøver så ufattelig små mængder af udgangsmaterialet, har betydet et stort skridt fremad ikke mindst inden for retsgenetikken.

I dette kit bruges elevernes/kursisternes egne celler som udgangsmateriale. I sig selv er PCR-teknikken simpel og relativt billigt. Alt, hvad der er brug for, er en reaktionsbuffer, de fire baser, DNA-polymerase, to primere og små mængder af det udgangsmateriale, som man ønsker at undersøge. Ud fra dette mangedobles et specifikt segment af Dna’et.

I PCR benyttes to principper fra molekylærgenetikken:

1. Hybridisering af komplementære Dna-streng
2. Syntetisering af Dna-streng ved hjælp af DNA-polymerase

Man udnytter altså det, at to komplementære strenge vil gå sammen, Det DNA, der skal kopieres, udvælges vha. primers. Primers (eller proberne) består af syntetisk fremstillet oligonucleotider (korte Dna-stykker). Proberne sætter sig på de to DNA strenge og afgrænser det Dna-stykke eller segment, der skal mangfoldiggøres. Man siger, at de to DNA strenge fungerer som skabelon for syntesen af en komplementær DNA streng.

PCR trin for trin

PCR involverer en række gentagne cykler, der hver består af følgende tre trin: Denaturering, primer påsættelse og forlængelse af den påhæftede primer ved hjælp af *Taq* DNA polymerase.

Før selve DNA amplifikation påbegyndes tages der prøve af genetisk materiale fra de enkelte elever. Det kan være et hår eller skrab fra indersiden af kinden.

Efter at eleverne prøver er gjort klar blandes skabelon DNA, primers (oligonucleotider), termostabil DNA-polymerase (*Taq*), de fire baser (T, A, G og C) og reaktionsbuffer i et eppendorfrør.

Eppendorfrøret placeres i termocycleren eller de nødvendige vandbade klargøres.

Termocycleren indeholder en aluminiumsblok, hvori prøverne placeres. Denne aluminiumsblok kan lynhurtigt afkøles og opvarmes til meget forskellige temperaturer – dette kaldes termal cykling.

I en cyklus opvarmes først til 94 °C, hvorved Dna-strengene vil denaturere eller adskilles. Dette kaldes denatureringstrinnet.

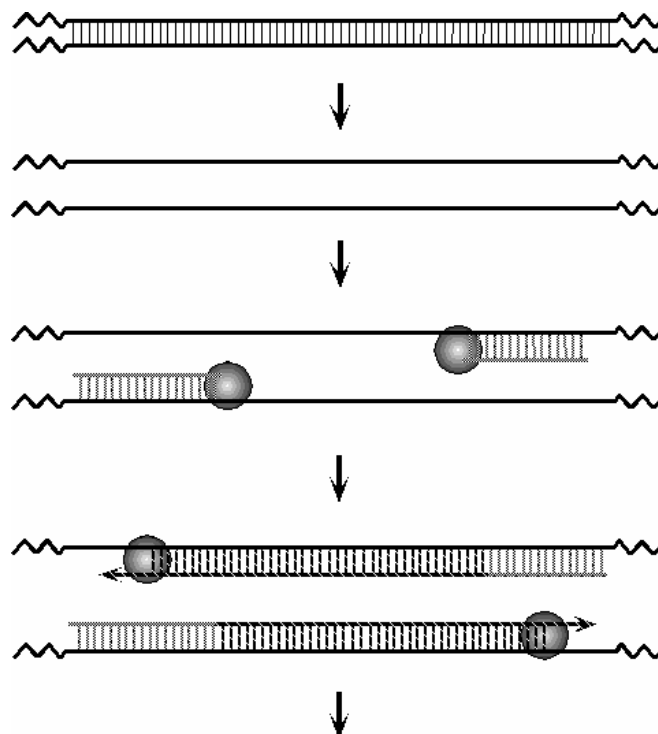
Derefter afkøles lynhurtigt til 60 °C, hvorved primeren bindes til de enkelte skabelon-DNA-streng. Dette kaldes vedhæftningstrinnet. De to oprindelige Dna-streng vil eventuelt samle sig igen eller konkurrere med primerens komplementære bindingssteder. Men der tilsættes i dette forsøg så megen primer, at den originale Dna-streng ”udkonkurreres”.

Til sidst opvarmes til 72 °C hvorved *Taq* DNA polymerase forlænger de komplementære DNA strenge med start fra primeren og den endelige færdige kopi af Dna-dobbelstrengen kan dannes. Dette trin kaldes forlængelsestrinnet.

Taq polymerasen arbejder mest effektivt ved 72°C, hvorfor det er vigtigt at ramme præcis denne temperatur.

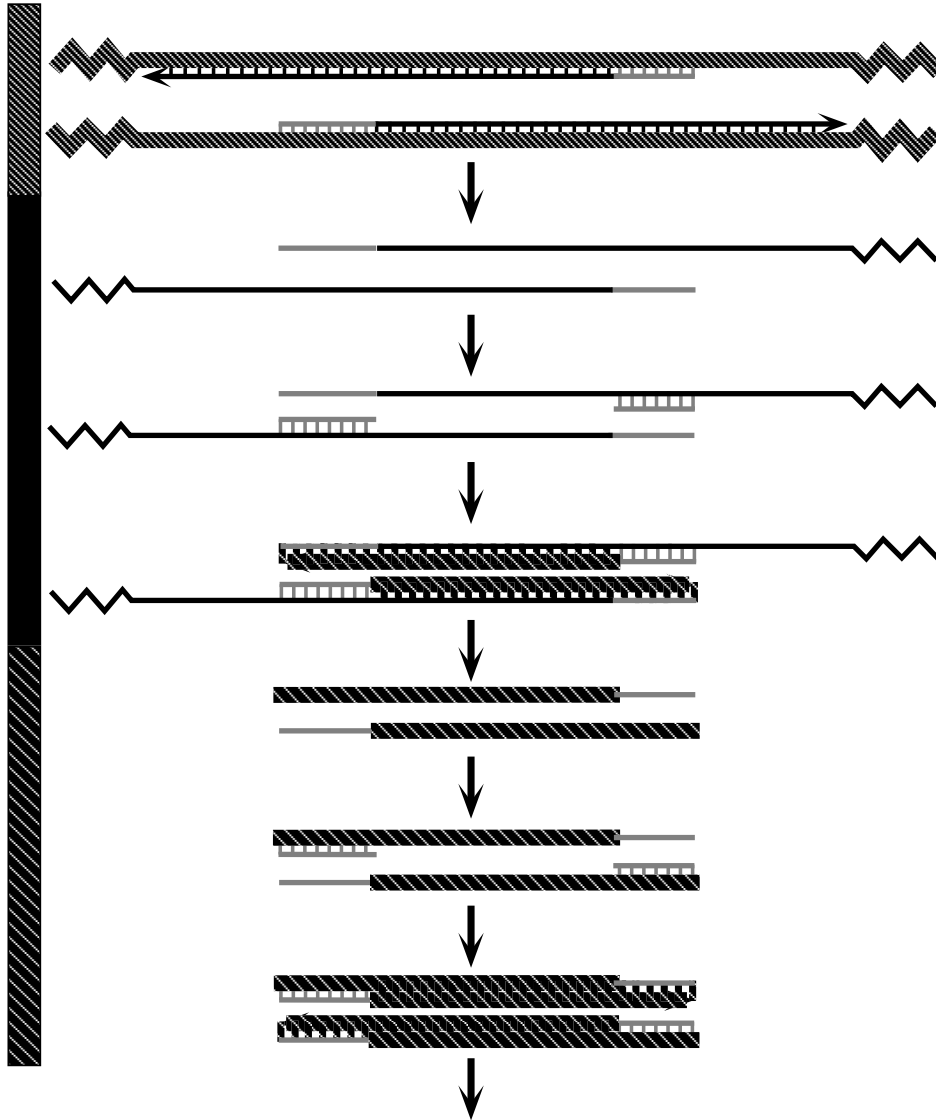
En cyklus = denaturering + vedhæftning + forlængelse

De to nye sæt dobbeltstreng Dna, der er dannet nu, danner dernæst udgangspunkt for næste cyklus og på denne måde mangedobles Dna-strengantalet efterhånden. Ved 40 cykler dannes over en milliard kopier af stykke. det originale DNA



Normalt køres der 40 cykler. Ved hver cyklus fordobles antallet af Dna-streng. Efter 40 cykler vil der således være $1,1 \times 10^{12}$ ekstra kopier af den oprindelige stump DNA.

PCR laver DNA med eksakte længder og sekvenser. I den første cyklus vedhæftes de to primere til Dna-udgangsmaterialet i hver sin ende på de to komplementære streng. Efter den første fuldendte cyklus er der dannet to nye streng, der er kortere end det oprindelige DNA, men længere end det specifikke Dna-stykke, som man ønsker at mangedoble. Først efter 3. cyklus er man oppe på fuld længde – se figur 5.



Når man således har fået den præcise længde på DNA påbegyndes ved de næste cykler den eksponentielle fordobling (X_n , hvor X er antallet af udgangsmaterialet og n er antallet af cykler). Der vil altid være et sæt originalt udgangs-DNA-materiale, som ikke er fuldt kopieret. Dette betyder dog ikke noget, når der køres et tilstrækkeligt antal cykler.

Forslag til undervisningsforløb i forbindelse med PCR:

Lektion 1a	Isolering af kindceller Forberede udgangsgenom fra kindceller (stop-punkt)
Lektion 1b	Isolering af hår follikler DNA fra hårfolliklerne (forberedelse af udgangsmateriale)
Lektion 2	PCR-amplifikation Starte og køre PCR-cykler Støbe agarosegeler
Lektion 3	Gelektroforese og farvning af geler Elektroforese af geler Farvning
Lektion 4	Analyse af gelerne og fortolkning af resultaterne Diskussion Hardy-Weinberg beregning
Lektion 5	Fortolkning af resultaterne – Bioinformatik Analyse af resultaterne vha. PV92 Allel-Serveren

Lærerens forberedelse:

I de næste afsnit beskrives punkt for punkt hvad lærere skal forberede før de enkelte lektioner. De angivne tider er omtrentlige angivelser.

Hvornår	Aktivitet	Tidsforbrug
Straks	Læs denne vejledning	2 timer
Før til lektion 1	Forberedelse af kindskrabceller Gøre eleverarbejdspladserne klar	30 minutter
Før til lektion 2	Resuspendering og fordeling af Matrix mix Forberede master-mix Blanding og fordeling Opstilling til kontrol-PCR Klargøring af TAE-bufferen Smelte agarosen Gøre termocyklere eller de nødvendige vandbade klar Klargøre eleverarbejdspladserne	1 time
Før til lektion 3	Gøre klar til Dna-farvning Klargøre eleverarbejdspladserne	20 minutter
Før til lektion 4	Klargøre eleverarbejdspladserne	10 minutter

Før lektion 1:

Trin for trin:

Nødvendige materialer:
 Skruelågseppendorfrør
 InstaGene™ matrix
 2-20µL mikropipette
 2-200µL mikropipette
 Spidser
 Vortexer
 Eppendorfrør
 Pincetter (til 1b)
 Sakse (til 1b)
 Plastikkopper (til 1a)
 Protease (til 1b)

Kindskrab – øvelse 1a

1. Fordeling af InstaGene™ matrix (øvelse 1a (kindskrab))
 - A. Bland InstaGene™ matrix grundigt ved at ryste eller bruge vortexeren adskillige gange for at resuspendere matrixen. Det er vigtigt at matrixen er godt blandet når fordelingen finder sted. Perlerne bundfælder hurtigt ud af opløsningen, hvorfor det er nødvendigt at ryste adskillige gange under fordelingen.
 - B. Med en pipette overføres 200µL InstaGene matrix til hvert skruelågseppendorfrør. Der skal være et rør til hver elev/kursist.
2. Blanding og fordeling af saltopløsning
 - A. Lav en 0,9 % saltopløsning. Tag 500 mL postevand og tilsæt 4,5g ikkeiodholdigt salt (bordsalt). Bland til alt saltet er opløst
 - B. Hver elev skal have en kop med 10mL saltopløsning

Hårfollikel – øvelse 1b:

3. Forbered og fordeling af InstaGene matrix med protease (øvelse 1b – hårfollikel)

Lav en opløsning af InstaGene matrix med 66µg/mL protease. Proteasen har koncentrationen på 20mg/mL. For at få en fortynding på 66µg/mL fortyndes proteasen 1:300 med InstaGenematrix. Hvis man vil lave 5 mL af blandingen (hvilket rækker til 20 elever/kursister):

 - overfør 5mL InstaGenematrix (husk at ryste det!) til et nyt rør
 - tilsæt 17µL koncentreret protease til de 5mL
- B. Med en pipette overføres 200µL InstaGenematrix til hvert skruelågseppendorfrør. Der skal være et rør til hver elev/kursist.

Før lektion 2 – PCR-amplifikation

Materialer:

Eppendorfrør (med hængslet låg)
 Skruelågseppendorfrør
 Mastermix
 Primermix
 PV92 homozygot kontrol (+/+)
 PV92 homozygot kontrol (-/-)
 PV92 heterozygot kontrol (+/-)
 12 PCR-rør
 Elektroforesekar, støbekar og kam

Elektroforesebuffer (50x TAE)
 Agarose
 Mikropipetter (20 μ L og 200 μ L)
 Mikropipettespidser
 Isbad

For at opnå de bedste resultater, skal eleverne helst ikke have deres prøver klar ca. 30 minutter før selve PCR-amplifikationen skal finde sted.

Fremgangsmåde:

Bemærk: Før rørene med reagenser åbnes centrifugeres de kortvarigt for at sikre at indholdet er i bundet af røret. Det er almindeligt at indholdet under forsendelsen sætter sig op under låget.

1. Klargør mastermix ved at tilsætte primerne. Bemærk: for at opnå det bedste resultat udføres dette punkt først 15-30 minutter før PCR-reaktionen.
 - A. Med en pipette overføres 1100 μ L mastermix til et mærket eppendorfrør. Er holdet kun på 16 elever eller derunder deles mastermixen i 2 gange 550 μ L i hver sit eppendorfrør. Det ene eppendorfrør bruges straks – det andet kan genfryses til senere brug.
 - B. Marker et eppendorfrør pr. gruppe og placer rørene på is.
 - C. Tilsæt 22 μ L primermix til de 1100 μ L mastermix (eller 11 μ L til de 550 μ L, der skal bruges ved halvering af mængden). Det er meget vigtigt at mastermix og primermix blandes grundigt. Opløsningen bliver gul.

Primeren leveres som en koncentreret gul opløsning i Tris buffer. Eftersom primere er meget mere stabile i koncentreret form end i fortynding, er det meget vigtigt, at denne tilsætning først finder sted lige før PCR-amplifikationen.

- D. Fordel 95 μ L af den færdigblandede mastermix med primer i ét eppendorfrør pr. gruppe. Gem den resterende del af mastermix blandingen til kontrolforsøgene, idet de opbevares på is.
2. Gør klar til PCR-reaktionen.
 - A. Mærk kontrolrørene: +/+, -/- og +/- . Hvis hele kittet skal bruges laves der 4 af hver kontrolprøve og tilsvarende laves der 2 kontrolrør af hver, hvis kun halvdelen af kittet skal benyttes. Ubenyttede opløsninger opbevares i fryseren.
 - B. Tilsæt 20 μ L af den færdigblandede mastermix med primer til hvert kontrolrør. Husk at skifte pipettespids.
 - C. Rørene placeres på is indtil de skal bruges Kontrolprøverne skal amplificeres samtidig med elev-prøverne
3. Gelstøbning: Gelerne støbes enten af eleverne eller af læreren. Gelerne kan støbes 1-2 dage i forvejen.
 - A. Fremstilling af elektroforesebuffer:
 Bufferen leves som en 50x koncentreret buffer. Til støbning af gelen skal bruges en 1x TAE buffer, ligesom det er en 1x TAE buffer der skal bruges under selve elektroforesen.
 Fremstil 3L 1x TAE buffer: Tag 60 mL 50x koncentrat og tilsæt 2,94L demineraliseret vand.
 - B. Fremstilling af 1% agaroseopløsning:
 Til 1g agarose tilsættes 100mL 1x TAE buffer. Til 8 geler bruges der ca. 350 mL agaroseblanding.

Gelen kan enten fremstilles i en 1L's erlenmeyerkolbe på en varmeplade eller gelen kan fremstilles i mikrobølgeovnen. Sørg for at al agarosen er opløst – blandingen skal være helt klar!

Bemærk: Varm agaroseopløsning kan let skolde. Brug handsker e.l. til beskyttelse.

Ønsker man ikke selv at støbe gelerne kan der købes færdigstøbte geler hos BioRad (katalognr. 161-3057EDU).

Støbning af geler:

- Forsegl enderne af gel-holderen med tape. Vær sikker på at tapen er tæt og glat. Malertape kan fint benyttes
- Sørg for at gel-holderen står vandret.
- Sæt kammen i ca. 2cm fra den ene ende
- Tag 1% agaroseopløsningen
- Lad den afkøle til ca. 60°C
- Hæld den varme gel op og lad den størkne i ca. 20 minutter
- Fjern forsigtigt kammen fra gelen ved at vippe den frem og tilbage, mens den løftes lodret op
- Fjern tapen
- Sæt gel-holderen med gelen i elektroforesekarret

Hvis man ikke har en termocycler, gøres der 3 vandbade klar med hhv. 60°C, 72°C og 94°C

Der køres følgende cykler:

Trin 0	Pre-denaturering	94°C	2 minutter
Trin 1	Denaturering	94°C	1 minut
Trin 2	Vedhæftning af primer	60°C	1 minut
Trin 3	Forlængelse	72°C	2 minutter

Trin 1-3 gentages 40 gange!

Afslutningstrin	Endelig forlængelse	72°C	10 minutter
-----------------	---------------------	------	-------------

Før lektion 3

Elektroforese og farvning af gelerne

1. Forbered de positive kontrolprøver
2. Afpipetter PV92 XC markørfarve
3. Afpipetter DNA standarderne (EZ Load Molecular mass ruler)
4. Klargør Dna-farven
5. Gør elevarbejdspladserne samt fællesmaterialerne klar

Tidsforbrug: ca.40 minutter

Materialer:

8 eppendorfrør

Mikropipetter 0-20 μ L og 2-200 μ L

Spidser til mikropipetterne

8 skruelågs-eppendorfrør

Demineraliseret eller destilleret vand til at fortynde Dna-farven med

500 mL flaske

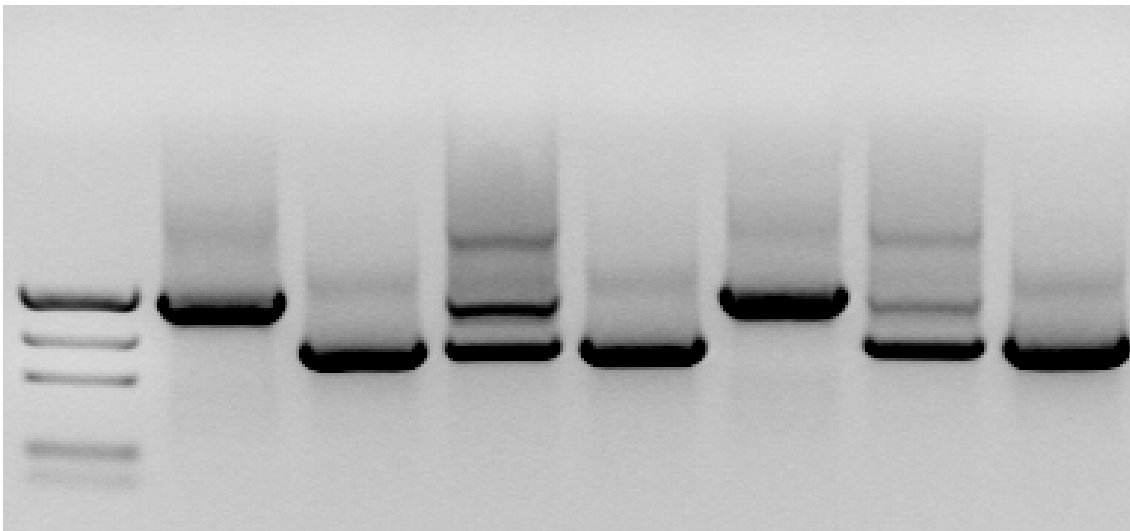
Evt. gel supportfilm (hvis hurtigfarvningsmetoden benyttes)

Forberedelse af kontrolprøverne:

Tilsæt 10 μ L PV92 XC markørfarve (loading dye) til hver af de amplificerede kontrolprøver (+/+,-/-, +/-).

Ved elektroforesen sørger man for, at de tre kontrolprøver også kører på hver gel, således at der dermed er referencer, når båndene skal sammenlignes.

Afpipettering af DNA-størrelsesstandarder. Afpipetter 11 μ L Dna-standard (EZ Load molecular mass ruler) til 8 eppendorfrør og mærk disse "MMR". Båndstørrelserne på Dna-båndene er 1000bp (basepar), 700bp, 500 bp, 200 bp og 100 bp. Se nedenstående billede:



Afpipettering af PV92 XC markørfarve: Mærk 8 skruelågeppendorfrør "MF" for "markørfarve" og afpipetter 50 μ L til hvert rør. Hver gruppe har et fælles rør med markørfarve.

Forberedelse af Dna-farve: Farven leveres som en 500x koncentreret opløsning som det er nødvendigt at fortynde før brug.

Farven kan, såfremt den kun er fortyndet til 100x opløsning (100 mL 500xopløsning fortyndes med 400 mL demineraliseret vand) bruges til hurtig farvning af gellerne. Her kan resultatet ses allerede efter ca. 15 minutter.

Eller man kan fortynde farven til 1x-opløsning (1mL 500xopløsning fortyndes med 499 mL demineraliseret vand) og lade farveprocessen vare natten over.

Når gelen dækkes med farveopløsningen, vil de positivt ladede farvemolekyler binde sig til de negativt ladede fosfatgrupper i de Dna-molekyler, der er bundet i gelen. Dermed bliver Dna-båndene synlige og elevernes båndmønstre kan identificeres og sammenlignes med Dna-standarderne.

Den farve, der benyttes er let at arbejde med, ikke giftig og et mere sikkert alternativ end ethidiumbromid, som man traditionelt har arbejdet med. Dna farves dybt blå og efterfølgende kan gelen rimelig nemt gemmes.

ADVARSEL

Selv om den benyttede farve ikke er giftig eller carcinogen anbefales det, at der bæres handsker for at undgå at blive farvet blå. Tilsvarende er det en fordel at bære kittel, så der ikke kommer blå farve på ens tøj.

Skulle der komme farve på tøj eller bordplader e.l., tørres dette let af med sprit.

Bemærkninger:

Til en gel på 7x10 cm bruges ca. 120mL farveopløsning. Det vigtigste er, at gelen er helt dækket med farveopløsning.

Inden farvningen tages gelen ud af elektroforeseapparatet og lægges forsigtigt over i et lille kar. Gelen er meget glat, hvorfor dette punkt skal udføres med forsigtighed, så gelen ikke går i stykker.

Ved langsom farvning, hvor gelen står natten over, kan det anbefales at benytte et rystebord, da de mindste bånd har en tendens til at diffundere væk, hvis der ikke rystes.

Affarvningen sker med varmt vandhanevand, men kan forbedres med affarvning ca. 5 sekunder med 70 % sprit.

Såfremt, man benytter den langsomme farvning, er affarvning ikke nødvendig.

Før lektion 4

Analyse og fortolkning af resultaterne

Hvis man vil gemme gelerne og dermed skal tørre disse, kan man benyttes Gel supportfilm.

Tag et billede af gelen, lav en tegning eller fotokopier gelen. Undgå at udsætte gelen for direkte lys, da det vil afblege båndene

Før lektion 5

Inden dette modul/denne lektion, hvor der skal arbejdes datainformation fra en allel-server database vector.cshl.org, anbefales det, at læreren har sat sig grundigt ind i dette. Databasen er gratis at bruge. Se nærmere i den medfølgende manual.

Elevvejledning

PCR – PV92 fra Bio-rad

Klargøring af kindcelle-skabelon (1 lektion)

1. Mærk et 1,5 mL eppendorfrør med dine initialer. Mærk derefter et skruelågs-eppendorfrør med InstaGene matrix med dine initialer.

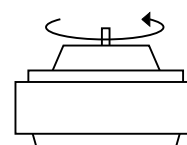


2. Tag en kop med saltvand i. Tag saltvandet i munden og rens munden grundigt i 30 sek. Spyt saltvandet ned i koppen

3. Overflyt 1 mL af dit saltvand til det første eppendorfrør (med hængslet låg).



4. Centrifuger i 1 minut ved 12000rpm. Tag eppendorfrøret ud af centrifugen. Du skulle nu gerne være i stand til at se et hvidt bundfald på størrelse med et tændstikshoved. Hvis du ikke kan se det hvide bundfald gentages punkt 3. og 4.



5. Fjern supernatanten (det øverste lag) ved at vende bunden i vejret på eppendorfrøret og lade saltvandet blive suget ud på et stykke køkkenrulle. Sørg for at pellet (bundfaldet) ikke kommer med ud. Der må godt være en lille smule ($< 50\mu\text{L}$) saltvand tilbage i røret.



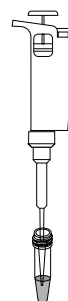
supernatant

6. Resuspender pellet ved at bruge vortexeren eller ved at knipse med fingeren. Der må ikke være klumper i pellet.



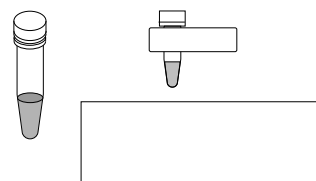
7. Overfør 20 μ L af de resuspenderede celler til skruelågseppendorfrøret med InstaGene mix.

8. Luk røret tæt. Ryst eller knips på røret for at få indholdet blandet godt.



9. Når alle i gruppen er klar, sættes jeres eppendorfrør i en skumholder i vandbadet. Inkuber ved 56°C i 10 minutter. Efter 5 minutter tages skumholderen op og der knipses på rørene.

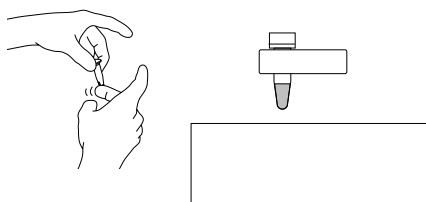
Ved denne opvarmning skilles cellerne ad, hvorved lyseringen i næste punkt lettes. Ved 56°C inaktiveres den DNase, der naturligt er til stede i en celledensuspension og som ville kunne ødelægge DNA og hæmme PCR-reaktionen.



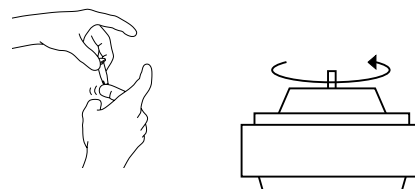
10. Fjern skumholderen fra det første vandbad.

Ryst/knips alle rørene. Overflyt til det 100°C varme vandbad og inkuber i 5 minutter.

Ved 100°C ødelægges cellemembranerne og Cellens indhold frigøres inklusiv den DNA, der skal virke som skabelon for PCR-reaktionen



11. Tag rørene op af vandbadet. Ryst/knips og centrifuger derefter i 5 minutter ved 6000rpm for at få pellet til at samle sig i bunden af røret



12. Opbevares i køleskab indtil næste punkt.
Kan opbevares i op til flere dage i køleskab.

Klargøring af hårfollikel DNA (1 lektion)

1. Mærk et skruelågseppendorfrør indeholdende 200 μ L InstaGene matrix plus protease med dine initialer.

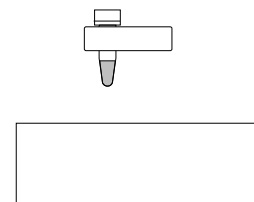


2. Tag 2 hår fra dig selv. Sørg for at der er hårrod på. Klip håret til så der er ca. 2 cm tilbage af den nederste del af håret. Læg hårene i det mærkede skruelågseppendorfrør.



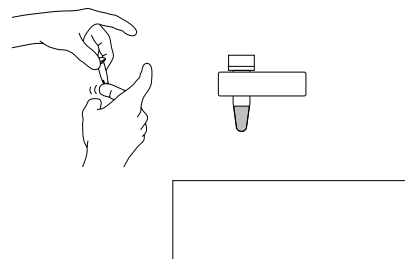
3. Sæt dit skruelågseppendorfrør i skumholderen og inkuber i vandbadet ved 56°C i 10 minutter. Efter 5 minutter knipse der let til røret, så indholdet blandes.

Ved denne opvarmning skilles cellerne ad, hvorved lyseringen i næste punkt lettes. Ved 56°C inaktiveres den DNase, der naturligt er til stede i en celleduspension og som ville kunne ødelægge DNA og hæmme PCR-reaktionen..

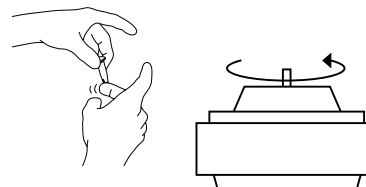


4. Tag skumholderen op. Ryst røret forsigtigt og sæt derefter skumholderen over i det 100°C varme vandbad. Inkuber ved 100°C i 5 minutter.

Ved 100°C ødelægges cellemembranerne og cellens indhold frigøres inklusiv den DNA, der skal virke som skabelon for PCR-reaktionen



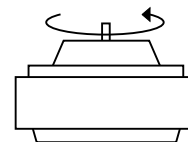
5. Fjern holderen med rørene fra vandbadet. Ryst og bland indholdet grundigt. Centrifuger i 5 minutter ved 6000rpm, således at pellet samles i bunden.



6. Opbevares i køleskab indtil næste punkt.
Kan opbevares i op til flere i dage i køleskab.

PCR-amplifikation

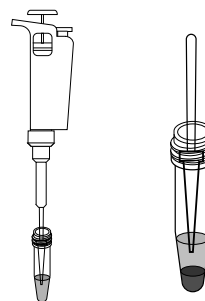
1. Tag dit Dna-rør fra køleskabet. Centrifuger i 2 minutter ved 6000 rpm.



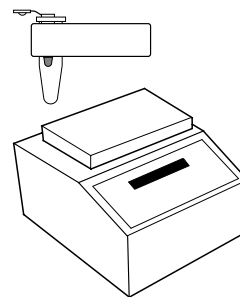
2. Mærk et PCR-rør samt et eppendorfrør uden låg med dine initialer og sæt rørene i skumholderen.



3. Overfør 20µL af dit DNA fra skruelågseppendorfrøret til PCR-rørets bund. **VÆR FORSIGTIG – undgå** at få matrixperlerne fra bunden med. (Se tegningen)



4. Stil røret med den gule mastermix på is og overfør 20 μ L mastermix til PCR-røret. Luk PCR-røret grundigt. Blandingen vil være gul.

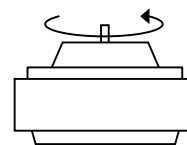


5. Der køres 40 PCR-cykler – enten i en termalcykler eller ved hjælp af vandbade. Din lærer vil instruere nærmere om dette.

HUSK: Til sidst afsluttes med 10 minutter i 72 graders badet.

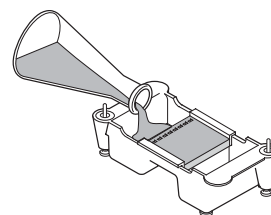
Elektroforese

1. Tag dit PCR-rør og stil det i et eppendorfrør uden låg. Centrifuger i 3 sekunder ved 3000 rpm.



2. Tilsæt 10 μ L PV92 XC markørfarve til dit PCR-rør og bland forsigtigt.

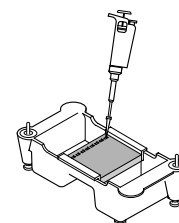
3. Den støbte agarosegel lægges i elektroforeseapparatet. Tjek at brøndene er nær den negative pol (den ”sorte” ende).



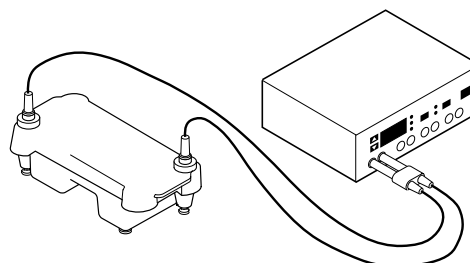
4. Fyld elektroforesebuffer i karret således at gelen er dækket.

5. Fyld 8 μ L prøve i hver brønd efter følgende skema:

Brønd nr.	Prøve	Mængde
1	Dna-standard	10 μ L
2	Homozygot ++ kontrol	10 μ L
3	Homozygot -/- kontrol	10 μ L
4	Heterozygot +/- kontrol	10 μ L
5	Elev 1	20 μ L
6	Elev 2	20 μ L
7	Elev 3	20 μ L
8	elev 4	20 μ L



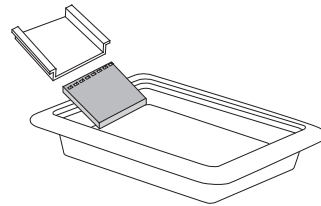
6. Sæt låget på elektroforesekarret og forbind ledningerne med strømforsyningen



7. Tænd for strømmen og lad elektroforesen køre i 30 minutter ved 100V

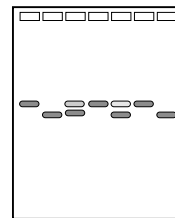
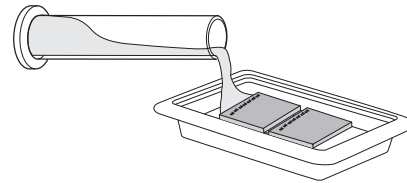
Farvning af gelerne

1. Når elektroforesen er slut slukkes strømmen, ledningerne fjernes fra strømforsyningen og karret med gelen flyttes forsigtigt fra elektroforesekarret. **Pas på!** Gelen glider nemt af. Lad forsigtigt gelen glide ned i det kar, der skal bruges til farvningen.
2. Farv enten med den a) hurtige metode – ca. 15 minutter eller b) Lad gelen farve natten over.



Metode a: Hurtig farvning

- a. Tilsæt 120 mL 100x farveopløsning til gelen. Sørg for at den er helt dækket.
- b. Farv gelen i 2 minutter. Vip forsigtigt med karret. Hæld farven tilbage på flasken. Farven kan genbruges 7 gange.
- c. Skyl forsigtigt gelen i 10 sekunder med varmt (40-55°C) vand fra vandhanen.
- d. Fyld derefter karret med varmt vand fra vandhanen i 5 minutter. Vip karret frem og tilbage.
- e. Gentag punkt d med nyt vand.
- f. Læg gelen på en lys baggrund og tegn med en tusch gelens brønde og bånd på en OH-transparent e.l. Tag eventuelt en fotokopi af gelen.
- g. Find ud, hvilken genotype du har
- h. Lad gelen lufttørre og gem gelen. Undgå at udsætte gelen for direkte lys, idet det vil afblege båndene.



Metode b: Langsom farvning (gelen farver natten over)

- a. Tilsæt 120 mL 1x farveopløsning til gelen.
Gelen skal være dækket af farveopløsningen.
- b. Lad gelen stå natten over. Det bedste resultat opnås, hvis gelen rystes roligt undervejs fx på et rystebord.
- c. Næste dag hældes farveopløsningen fra.
Farven kan ikke genbruges.
- d. Læg gelen på en lys baggrund og tegn med en tusch gelens brønde og bånd på en OH-transparent e.l. Tag eventuelt en fotokopi af gelen.
- e. Find ud, hvilken genotype du har
- f. Lad gelen lufttørre og gem gelen. Undgå at udsætte gelen for direkte lys, idet det vil afblege båndene.

