

John Schollar and Dean Madden

DNA-halsband

Enkel extraktion av DNA från mänskliga kindceller från munhålan

National Centre for Biotechnology Education, University of Reading

MÅL

Här beskrivs en enkel extraktion av DNA från celler tagna från munhålan. DNA från dessa celler kan sedan förvaras i en glasbehållare och bäras som ett halsband. Det DNA man får fram med denna teknik är inte tillräckligt rent för att kunna användas i andra syften, som t.ex. medicinsk diagnos eller släktskapsutredning: det är bara ett trevligt experiment.

UTRUSTNING OCH MATERIAL

För varje student eller arbetsgrupp:

Utrustning

1 ml pipett, helst plast

10 ml mätcylinder, injektionsspruta eller liknande, för att mäta 1 ml volymer

Delar till halsbandet: glasbehållare med metallkapsyl; neoprengummipropp, och ett stycke halsbandssnöre.

1 steril bomullstopp ("tops")

Superlim

Material

1 ml DNA extraktionsbuffert

2 ml denaturerad etanol (t.ex. T-röd eller liknande)

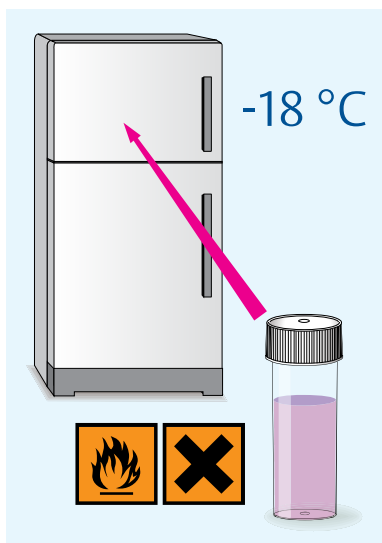
För att blanda 1 liter blå extraktionsbuffert:

- placera 7,88 g Tris.HCl i en 1 liters kolv
- sätt till 500 ml vatten
- sätt till 100 ml 10% SDS-lösning
- sätt till 70 ml 3M NaCl-lösning
- sätt till 1 ml of blå livsmedelsfärg
- snurra försiktigt på kolven för att blanda om
- fyll på upp till 1 liter destillerat eller avjoniserat vatten

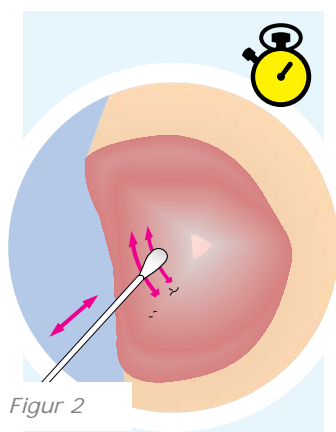
KORRESPONDENS TILL

Dr. J.W Schollar

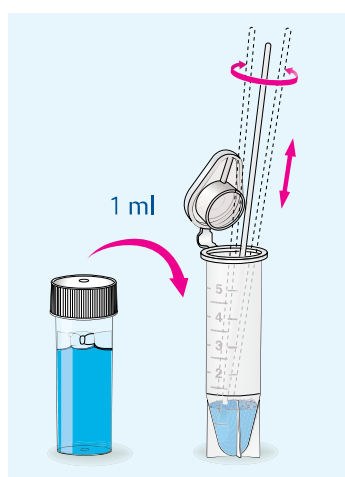
*National Centre for Biotechnology
Education, University of Reading
Science and Technology Centre,
Earley Gate, Reading RG6 6BZ UK
Epost: J.W.Schollar@reading.ac.uk*



Figur 1



Figur 2



Figur 3

INTRODUKTION

Den metod som presenteras här är en ytterst förenklad version av den procedur som används av medicinska, rättsmedicinska eller andra skäl. Som den beskrivs, är proceduren av begränsat utbildningsvärde, men den kan modifieras för att inkludera flera steg som kan öka värdet. Det främsta skälet för laborationen är att ge ett underhållande försök vars slutprodukt är unik för den elev som utför arbetet.

UTFÖRANDE

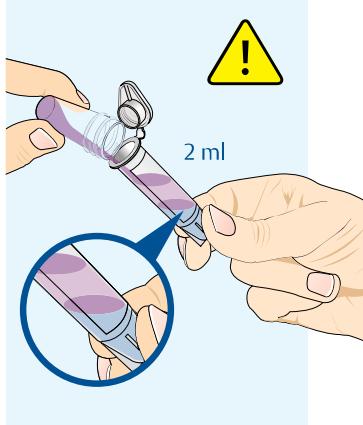
Innan du börjar

Om du nyligen har ätit, druckit något eller borstat tänderna måste du vänta 3-4 timmar innan du börjar. Det beror på att mat, dryck och tandborstning kan skölja bort många av cellerna i munhålan, och då kan du bara få tag i en väldigt liten mängd DNA.

Ställ etanolen i en noggrant sluten behållare i ett fryskåp minst två timmar före extraktionen. Vi rekommenderar att lämna etanolen i frysen över natten.

WARNING: Etanol är mycket eldfarligt. De flesta frysar är inte säkrade för elektriska gnistor, och det finns en risk för explosion om etanolångor kommer ut i frysen. Därför är det mycket viktigt att behållaren med etanol är tätt försluten innan den placeras i frysen. Det är också klokt att bara kyla ner små volymer i taget (Fig 1).

1. Mät upp 1 milliliter (1 ml) av extraktionslösningen i ett litet provrör eller liknande (t.ex. ett 5 ml graderat Eppendorf-rör). Extraktionslösningen innehåller en liten mängd detergent ("diskmedel") så du kanske ser små bubblor.
2. Ta ut den sterila bomullstoppen ur sin behållare. Svälj ner överskott av saliv så att munnen inte är för blöt. Gnugga bomullstoppen runt i munnen i åtminstone två minuter. Gnugga insidan av kinderna och tandköttet i både över- och underkäken, och också försiktigt under tungan. Målet är att få med så många celler som möjligt på bomullstoppen, så ju mer du gnuggar (och ju mindre saliv som kan skölja bort cellerna), desto bättre blir resultatet (Fig 2).
3. Placera bomullstoppen i extraktionslösningen. Rör om ordentligt i två minuter för att få loss cellerna. Pressa bomullstoppen mot sidorna i röret så du får loss cellerna till extraktionslösningen. Detergenten i lösningen bryter sönder cellerna, och frigör ditt DNA (Fig 3).
4. För nästa steg behövs noggrannhet och en stadig hand. Ta ut den iskalla etanolen från frysen. Håll båda rören i vinkel, och håll försiktigt ungefär två milliliter (2 ml) av etanolen längs sidan på provröret, så att etanolen kommer att flyta ovanpå extraktionslösningen i ett separat lager (det här påminner

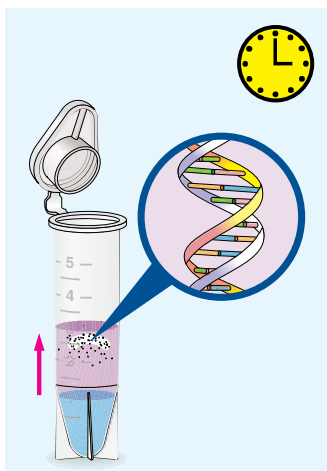


Figur 4

om att göra en exotisk cocktail med flera lager). Räta upp provröret och ställ det där det kan stå i fred utan att välta (Fig. 4).

5. Håll ögonen på röret och vänta i ungefär 10 minuter (om det blir kondens utanpå röret kan du torka av det med ett finger). DNA från cellerna kommer att långsamt diffundera upp i etanollagret. Saltet i extraktionslösningen får DNA-trådarna att trassla ihop sig till vitaktiga klumpar. Dessa flyter långsamt upp till ytan av etanolen, burna av små luftbubblor som ofta syns runt DNA-klumparna (Fig. 5).

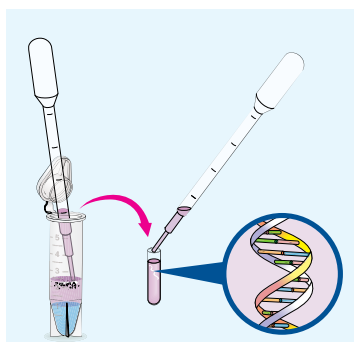
VIKTIGT: Om ditt cellprov innehöll en massa saliv kan det vara nödvändigt att vänta längre än 10 minuter. Om du inte ser något DNA efter 10 minuter, så låt röret stå ifred några timmar, eller kanske över natten. Till slut bör du se de vita DNA-trådarna.



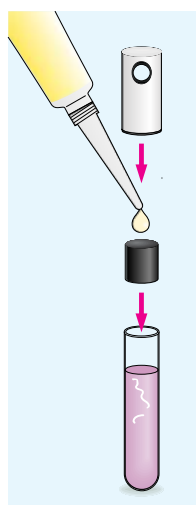
Figur 5

6. Använd plastpipetten för att försiktigt suga upp DNA och lite av etanolen, och flytta över till den lilla glasbehållaren. Fyll inte för mycket, där måste finnas plats till gummiproppen (Fig. 6).
7. Tryck i gummiproppen så att den sitter säkert och sluter igen glasbehållaren. Kom ihåg att behållaren är av glas – tryck försiktigt så du inte bryter sönder den (Fig. 7).
8. Se till att den lilla behållaren och gummiproppen är torra. Sätt en droppe superlim på proppen och kanten av behållaren. Tryck fast metallkapsylen över behållaren och gummiproppen. När limmet stelnat kan du hantera behållaren. Klipp snöret i två bitar, och trä den ena genom metallöglan och knyt ihop de två ändarna (Fig. 8).

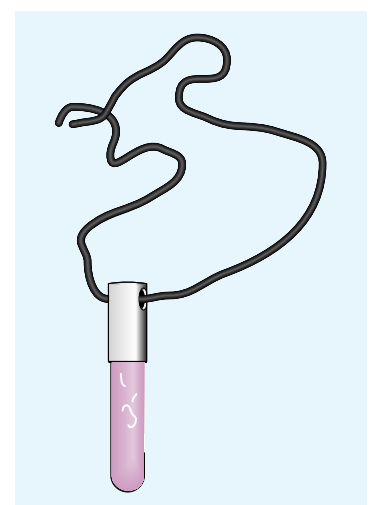
Nu är ditt DNA-halsband färdigt att bära!



Figur 6



Figur 7



Figur 8

SÄKERHETSFÖRESKRIFTER

Metanol

Metanol är mycket eldfarligt. De flesta frysar är inte säkrade för elektriska gnistor, och det finns en risk för explosion om etanolånga kommer ut i frysen. Därför är det mycket viktigt att behållaren med etanol är tätt försluten innan den placeras i frysen.

FÖRBEREDELSE OCH TIDSÅTGÅNG

Experimentet tar ungefär 30 minuter. Etanolen måste kylas i förväg.

FELSÖKNING

En del cellprov från munnen innehåller mycket saliv, och det kan vara nödvändigt att vänta i mer än 10 minuter. Om du inte ser något DNA efter 10 minuter, så låt röret stå ifred några timmar, eller kanske över natten. Till slut bör du se de vita DNA-trådarna.

LEVERANTÖRER

NCBE i Reading kan tillhandahålla material till halsband.

FÖRVARING AV MATERIAL

Allt material kan förvaras i rumstemperatur.

HEMSIDA

En animering som visar extraktion av DNA (*Genetic Science Learning Center, Utah*). Denna visar en mer avancerad teknik

<http://learn.genetics.utah.edu/units/biotech/extraction/>



Tack

Volvox-projektet finanseras av EU:s Sjätte Ramprogram.