

Andy Harrison, John Schollar
and Dean Madden

NCBE, The University of Reading, Earley Gate, Reading,
RG6 6BZ, UK

Undersökning av växternas evolution

Mångfaldigande av kloroplast-DNA med hjälp av PCR (Polymeras Chain Reaction)

Syfte

Eleverna skall mångfaldiga ungefär 400 baspar av DNA från kloroplastgenomet från några olika växter. Med hjälp av elektrofores av PCR-produkterna undersöks eventuella evolutionära släktskap.

Inledning och bakgrundsinformation

DNA från kloroplaster

Genregioner ger en molekylär vägledning av evolutionen

En revolution i trädgården

1998 publicerade en internationell grupp med nästan hundra växtforskare ett revolutionerande förslag till klassificering av växter. Efter mer än två århundraden med klassificering av växter på grundval av deras utseende, började botanister gruppera blomväxterna efter likheter i deras genom, DNA.

Det nya systemet blev kontroversiellt, eftersom det gav upphov till en del överraskningar. Till exempel brukade botanisterna betrakta den tropiska papayan som nära besläktad med passionsblomman. Enligt DNA-resultaten visade sig emellertid papayan vara en "kusin" till kål, och vidare är rosor närmare besläktade med nässlor än man tidigare hade trott. Ett resultat av denna forskning har blivit en omklassificering av växterna i botaniska trädgårdar världen över – ett botaniskt "År Noll".

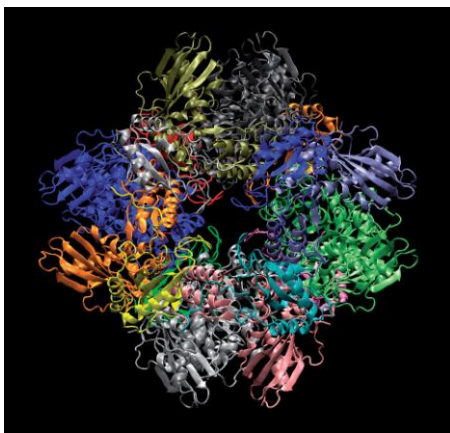
Projektet att omklassificera växterna leddes av Mark Chase vid de kungliga botaniska trädgårdarna i London (Royal Botanical Gardens, Kew) tillsammans med två kollegor: Kåre Bremer vid Uppsala universitet i Sverige och Peter Stevens, som då var vid Havarduniversitetet i USA. Arbetet har



KORRESPONDENS TILL
Dean Madden
National Centre for
Biotechnology Education,
The University of Reading,
Earley Gate, Reading,
RG6 6BZ
The United Kingdom
D.R.Madden@reading.ac.uk



DNA-analyser ger stöd för att den tropiska papayan (*Carica papaya*) är nära släkt med den oansenliga kålplantan



Angiospermfylogenigruppen jämförde gener som kodar för en stor subenhet av enzymet ribulos-bifosfat-karboxylas/oxygenas (*Rubisco*). Modellen visar de åtta stora och åtta små subenheterna som *Rubisco* är uppbyggd av. Enzymet behövs för att fånga in kol i fotosyntesen och genen för den stora subenheten, kodnamn *rbcl*, hittar man i kloroplast DNA. Variationer i denna gens DNA-sekvens gjorde att forskarna i APG-gruppen föreslog ett nytt "familjetråd" för angiospermerna.

tagit flera år att slutföra. De tre forskarna kom att kallas "The Angiosperm Phylogeny Group" (APG-gruppen). De indelade världens blomväxter i 462 familjer. Fem år senare minskades detta antal till 457 på grundval av förbättrade molekylära data och datoranalyser.

Molekylära metoder

I slutet av 1700-talet gjorde den svenske naturvetaren Carl von Linné ett försök att klassificera växterna systematiskt. Sedan dess har botanister grupperat växterna i olika familjer grundat på likheter i deras utseende och i vissa strukturer – antal kronblad, form och placering av bladen, kärlsystemen, frön och så vidare.

Traditionell klassificering gav en ungefärlig bild av evolutionära släktskap, men eftersom det naturliga urvalet ofta resulterar i lösningar som liknar varandra på grund av livsmiljöernas inverkan, blev förståelsen av den verkliga släktskapen ofta inte mer än gissningar. Nu, när vi har tillgång till molekylärbiologiska metoder, kan en riktigare bild ges.

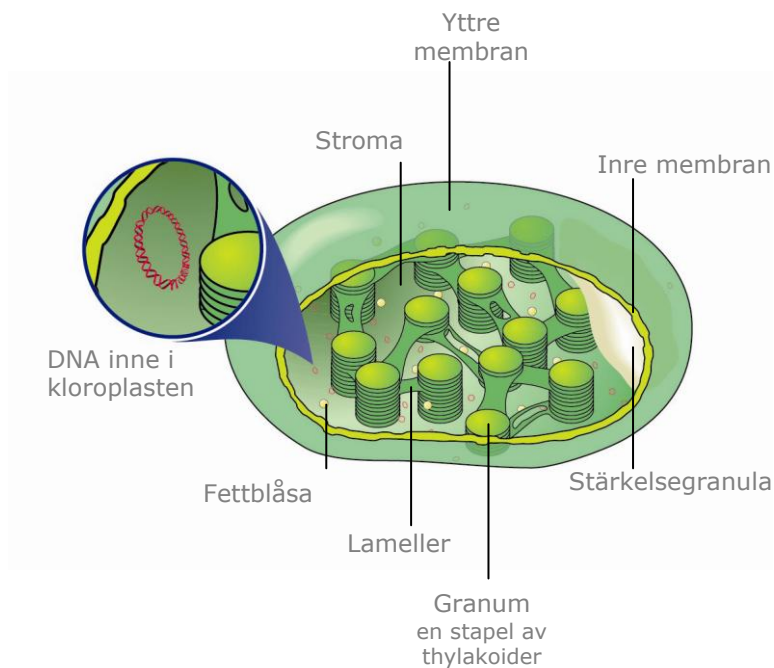


En viktig uppgift är att identifiera DNA-sekvenser, som varierar mellan olika arter. Men genregioner som är alltför variabla avslöjar inte de genetiska likheter som behövs för att skapa ett familjetråd. Många genregioner har en relativt långsam förändringshastighet och är därför lämpliga för studier om växtevolution, men dessa regioner är ofta sällsynta och svåra att arbeta med. Lyckligtvis innehåller kloroplasterna sitt eget stora förråd av DNA, vilket är idealiskt för evolutionära studier.

Kloroplaster har DNA

Strax efter återupptäckten av Mendels lagar omkring 1900, började man se oväntade mönster i växternas nedärvning. Dessa observationer antydde att växterna kanske hade andra gener än de som fanns i kromosomerna. Det var emellertid inte förrän 1962 som man fick fram klara bevis på att kloroplasterna innehöll ett eget DNA.

Det finns mellan 10 och 100 kloroplaster i varje cell hos gröna växter, och varje kloroplast innehåller 50 till 100 kopior av kloroplast-DNA (cpDNA). Totalt innehåller kloroplasterna 10-20% av växternas DNA. Liksom i plasmider och mitokondrier är kloroplasternas DNA cirkulärt: vanligen bildar det en ring med en längd på omkring 120 000-150 000 baspar (120-150 kilobaser, eller kb), som utgör koder för omkring 80 proteiner. Sekvensen i cpDNA hos många växtarter har nu tagits fram.



Inre strukturen hos en kloroplast, som visar ett ringformat DNA.

Hos de flesta arter ärvs cpDNA via äggcellen och genomgår ingen omkombination, vilket begränsar antalet variationer. Emellertid förekommer i cpDNA insertioner (införda nukleotider), deletioner (uteslutna nukleotider) och substitutioner (utbytta nukleotider).

Högupplösande teknik behövs för att upptäcka små variationer inom en växtart, men det är fullt möjligt att finna stora variationer i cpDNA mellan de större växtgrupperna även med enkel utrustning.

Kodande och icke kodande DNA

Många olika gener i cpDNA har utnyttjats av botaniker för att spåra genetiska släktskap mellan växter. APG-gruppen använde sig ursprungligen av Rubisco-gener, *rbcL*. cpDNA innehåller även gener som kodar för en uppsättning av olika transfer-RNA (tRNA). Gener för tRNA förändras inte ofta – de har faktiskt inte ändrats mycket under evolutionen. Man kan därför finna identiska sekvenser av nukleotider i cpDNA hos de flesta högre växter. Medan det finns identiska regioner i kloroplasternas gener, kan områden mellan dessa variera mycket. Sådana regioner har en högre frekvens av mutationer och uppvisar rätt hög grad av evolutionär förändring. Man kan avslöja skillnader mellan växtpopulationer som blivit genetiskt isolerade under någon tid. Det är dessa genetiska områden som skall undersökas i denna laboration.

Jämförelse mellan olika cpDNA

I denna laboration används en metod kallad "Polymerase Chain Reaction" (PCR) för att mångfaldiga det variabla DNA som finns mellan de konservativa tRNA-generna i kloroplasterna.

Med PCR-tekniken bildas miljoner DNA-kopior, vilka kan göras synliga som band i en elektroforesgel. Tack vare elektroforesen kan man jämföra längden på variabelt cpDNA från olika växtarter. Den distans DNA rör sig i gelen beror på DNA-fragmentens längd: kortare

fragment vandrar längre än långa DNA-fragment i samma gel.

Om DNA från två olika arter rör sig lika långt i gelen är storleken på fragmenten lika stora i båda arterna. Detta kan innebära att arterna är genetiskt relativt lika och därför närbesläktade. Arter som visar på olika stora fragment kan vara mindre närstående. Tack vare dessa resultat är det möjligt att få fram troliga evolutionära släktskap.

Resultaten som man får i denna laboration är relativt osäkra, eftersom endast en variabel region i DNA undersöks. Många sådana regioner måste undersökas, och även andra tekniker som till exempel sekvensbestämning av DNA måste utnyttjas, för att man skall få en bättre bild av evolutionära släktskap.

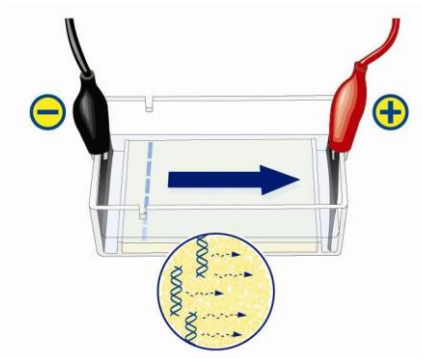
Sammanfattning av protokollet



A Samla DNA från fräscha, nyplockade gröna växter
B Rena upp provet



C Mångfaldiga den variabla regionen av kloroplast-DNA med hjälp av PCR - använd en PCR-apparat med tre olika temperaturer inställda eller tre vattenbad



D Separera de mångfaldigade DNA-fragmenten med hjälp av gelelektrofores



Besläktade växter har DNA-fragment av liknande storlek

Utrustning och material

I följande protokoll syftas på NCBE´s utrustning. Men annan liknande utrustning kan lika gärna användas.

Detta behövs till varje elev eller arbetsgrupp

Utrustning

- Mortelstöt
- Hålpipa för att skära ut 2 mm skivor
- Mikropipetter för volymer mellan 0-100 µl
- Pincett
- Elektroforesutrustning för DNA och lämplig strömkälla
- Skyddshandskar (för att skydda händerna från DNA färg)
- Flytande hållare för mikrocentrifugrör, t.ex. liten rektangel av skumplast med små hål gjorda med t. ex. en korkborr passande till eppendorfrören– Dessa är bra för att hålla rören på bänken eller när de flyter i ett vattenbad
- Penna
- Penna för permanent märkning på eppendorfrör och på geltanken
- PCR-maskin eller tre vattenbad med temperaturer 55, 72 och 94 °C

Material

- Eppendorfrör (1,5 ml)
- Mikropipettspetsar
- Whatman® FTA® växtkort
- FTA® reningsreagens (~350 ml per växtprov)
- TE-1 buffert (~350 ml per växtprov)
- PCR pellet, t.ex. GE Healthcare "PuReTaq PCR Ready-To-Go Beads" (1 per växtprov)
- PCR primers och sterilt destillerat vatten, för varje prov enligt följande:
 - 10 µl Primer 1: 5'-CGAAATCGGTAGACGCTACG-3' (innehållande 5 pmol DNA per µl)
 - 10 µl Primer 2: 5'-GGGGATAGAGGGACTTGAAC-3' (innehållande 5 pmol DNA per µl)
 - ~6 ml destillerat vatten
- 1 kb DNA-stege (endast 1 per gel)
- Bromfenolblått (~ 2 µl per prov)
- Elektrofores (TBE) buffert

- Agarosgel (1,5%) som görs genom att lösa agarospulver i utspädd elektroforesbuffert
- Lämplig färg för DNA (t. ex. Azur A i 20% etanol)

Att välja växt

Välj noga ut de växtarter till undersökning som kan förväntas ge intressanta resultat

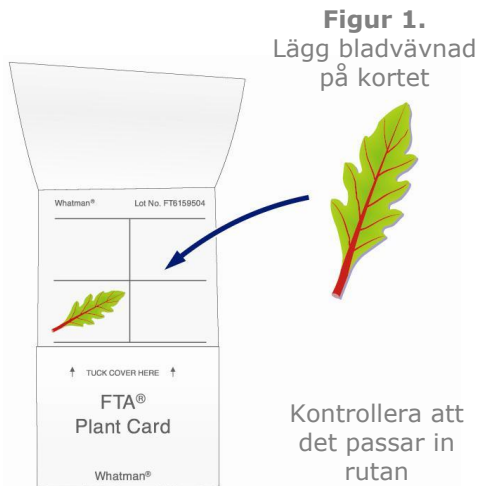


Genom att använda de tekniker som beskrivs här, har vi lyckats mångfaldiga DNA ur kloroplaster från ett stort antal växtarter. Bland dessa finns många arter som används som föda och därför kan hittas på hyllorna hos stormarknader eller grönsaksaffärer. Även om använda primers för PCR fungerar för alger, levermossor, ormbunkar och icke-blommande och blommande växter, så är metoden för extraktion enligt FTA[®] korten, som beskrivs här, inte särskilt lämpad för växter som tall eller kål, som har starka och fiberrika blad som är svåra att krossa.

Växter som inte är särskilt närbesläktade ger vanligen DNA-fragment som skiljer sig mest i storlek. Det skulle till exempel vara intressant att jämföra orkidéer (som nyligen utvecklats) med *Ginkgo* (som liknar växter som hittats i 225 miljoner år gamla fossil). En hjälp att välja växtarter finns på nätet i projektet *Tree of Life*: <http://www.tolweb.org/> och genom arbetet som gjorts av *Angiosperm Phylogeny Group* <http://www.mobot.org/MOBOT/Research/APweb>.

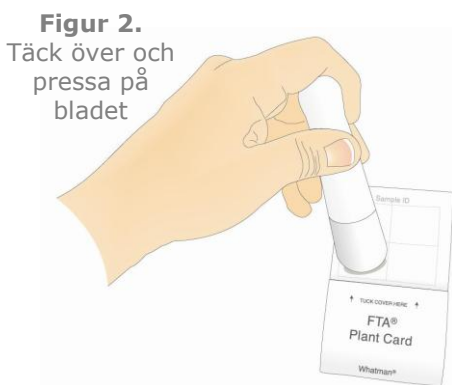
I våra (begränsade) undersökningar erhöles inga säkra DNA-fragment från kloroplaster med FTA[®] kort från följande växter:

- raps eller smörgåskrasse (skott från *Brassica napus* eller *Lepidium sativum*)
- kål och broccoli (båda tillhör samma art *Brassica oleracea*)
- timjan (*Thymus vulgaris*) och basilika (*Ocimum basilicum*)
- gurka (*Cucumis sativus*) och pumpa (*Cucurbita pepo*) – men vi provade inte bladen.



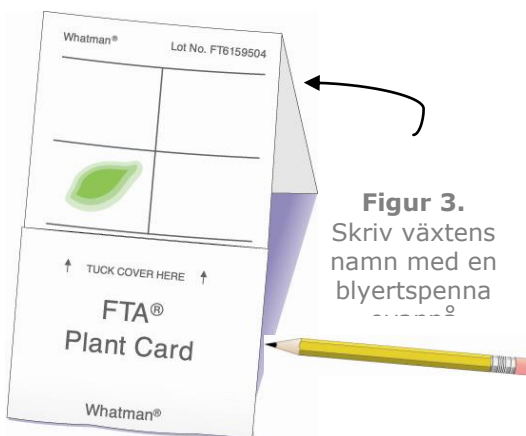
Figur 1.
Lägg bladvävnad på kortet

Kontrollera att det passar in rutan



Figur 2.

Täck över och pressa på bladet



Figur 3.

Skriv växtens namn med en blyertspenna

Låt kortet torka i 1 timma

Utförandet av laborationen

A Insamling av DNA från växter

1. Vik bort omslaget på FTA® växtkortet. Ta ett friskt blad eller en bit av en växt och placera det på kortet (Figur 1). *Se till att växtmaterialet inte sticker ut utanför en av de fyra rutorna, som finns tryckta på kortet.*
2. Vik tillbaks omslaget över växtmaterialet och använd en mortelstöt för att trycka sönder bladet på kortet så att fuktigheten till slut tränger genom till kortets baksida (Figur 2). *Försök undvika att provet sprids utanför sin ruta, vilket kan förorena prov i intilliggande rutor.*
3. Släng bort växtmaterialet.
4. Skriv växtens namn på FTA®-kortets omslag ovanför rutan du använt (på "sample ID"-rutan) (Figur 3). Namnet skrivs på omslaget **efter** växtmaterialet har tryckts sönder på kortet, eftersom mortelstöten kan skrapa bort vad som skrivits på omslaget.
5. Med omslaget bortvikt får nu provet torka i rumstemperatur *i minst en timma* (Figur 3). Upphetta inte kortet eftersom detta kan innebära att PCR-hämmare fastnar på kortet.
6. När kortet torkat, kan det förvaras under lång tid vid rumstemperatur i en förslutbar plastpåse med torkmedel.

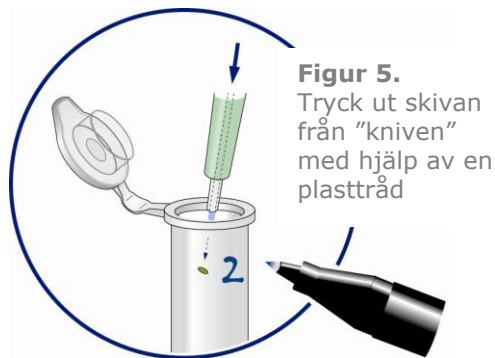
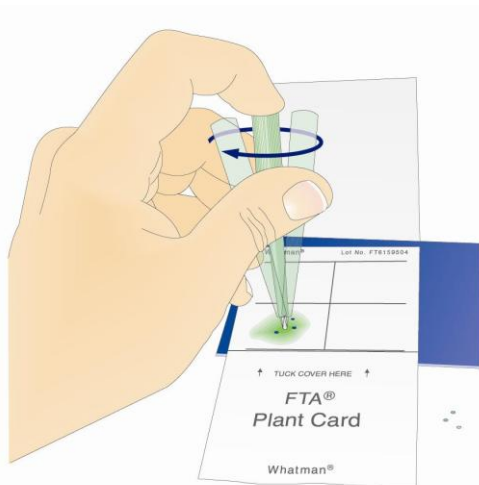
MÖJLIGT STOPP I LABORATIONEN

Kommentarer

FTA®-kortet är ett filterpapper impregnerat med SDS, Tris/EDTA (TE)-buffert och urinsyra. SDS är ett tvättmedel som bryter sönder växtcellerna. EDTA binds till metalljoner som behövs som en co-faktor till de enzymer som bryter ner DNA. Detta hindrar alltså DNA-nedbrytande enzymer att verka. Tris (en svag bas) behövs så att EDTA kan binda metalljonerna. Urinsyran skyddar DNA från att brytas ner av fria radikaler.

Figur 4.

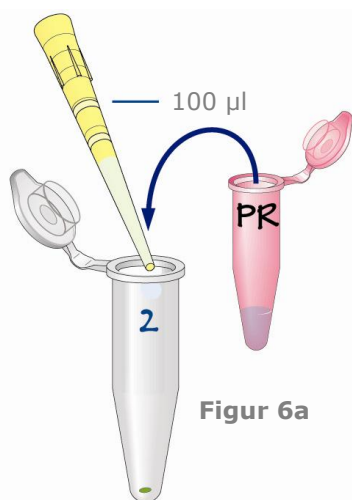
Skär ut små skivor med hjälp av en speciell "kniv"



Figur 5. Tryck ut skivan från "kniven" med hjälp av en plasttråd

B Upprening av DNA-provet

1. Placera en skärbräda under det torra FTA[®]-kortet och stansa med hålpipan ut ett prov som skall undersökas, d v s inom ett grönt klorofyllfärgat område. Roter gärna hålpipan för att få loss den lilla pappersskivan (Figur 4). *För att undvika kontaminering (förorening) skall du inte ta provet nära kanten på din provruta utan gärna någonstans i mitten av rutan.*
2. För över den lilla provskivan i hålpipan till ett klart, färglöst eppendorfrör och tryck loss provet med hjälp av plasttråden i kitet. Skriv provväxtens namn på röret (Figur 5). **Observera: om hålpipan skall användas för ett andra prov, måste du först göra den ren genom att ta ett prov på en bit av kortet som saknar växtmaterial. Släng sedan detta extra prov. Proceduren är avsedd att hindra kontaminering av kommande prov.**
3. Tillsätt 100 µl tvättreagens till röret med provskivan (Figur 6a). **Sug inte in vätska i själva pipetten.**
4. Stäng röret. Knäpp på röret några gånger var 30:e sekund i 2 minuter för att tvätta skivan (Figur 6b). *Tvättreagensen innehåller tvättmedel som hjälper till att skölja bort cellrester, inklusive PCR-hämmande ämnen från provskivan.* **Observera: om provskivan inte tvättas ordentligt kan PCR misslyckas.**
5. Använd samma pipettspets som i steg 3 för att suga bort tvättreagensen ur eppendorfröret. Försök få bort så mycket av skummet som möjligt. *Sug inte in vätska i själva pipetten.*
6. Tvätta skivan igen genom att upprepa steg 3-5, och använd hela tiden samma pipettspets.



Figur 6a



Figur 6b

Tvätta skivan två gånger i "Purification reagent"

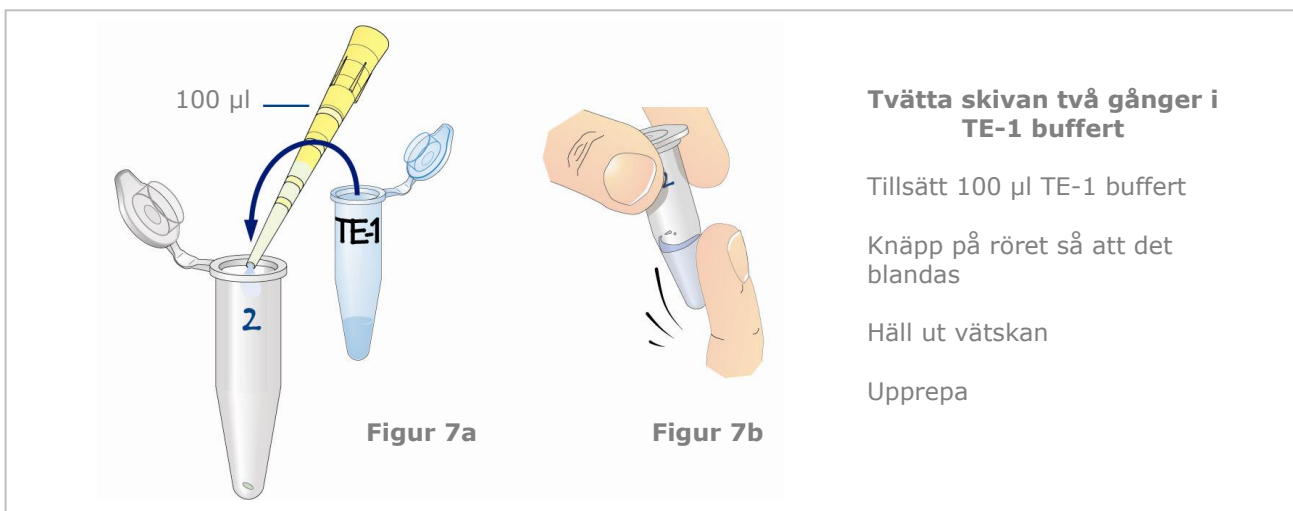
Tillsätt 100 µl "Purification reagent"

Knäpp på röret så att det blandas

Häll ut vätskan

Upprepa

7. Använd nu en ny spets på pipetten. Tillsätt 100 µl TE-1 buffer i röret (Figur 7a). TE-1 är en mycket utspädd Tris-EDTA-buffert.
8. Stäng till röret och knäpp på det som i steg 4. Upprepa var 30:e sekund i 2 minuter (Figur 7b). Detta tar bort tvättmedlet som fanns i tvättreagensen från FTA®-skivan.
9. Använd samma pipettspets för att suga bort TE-1 buffert från röret.
10. Tvätta provet igen genom att upprepa steg 7-9 med samma spets.



11. Fortsätt med PCR, eller ...
12. ...alternativt kan provskivan torkas i röret genom uppvärmning till ~50 °C.
Du kan använda en hårtork, ett element eller ett värmesåp för att skynda på processen, men "koka" inte DNA i onödan.
När väl provskivan är torr, placera det stängda röret i en förslutbar plastpåse med torkmedel. Provet kan förvaras i rumstemperatur tills det behövs för vidare behandling

MÖJLIGT STOPP I LABORATIONEN

Undersökning av eventuell förorening



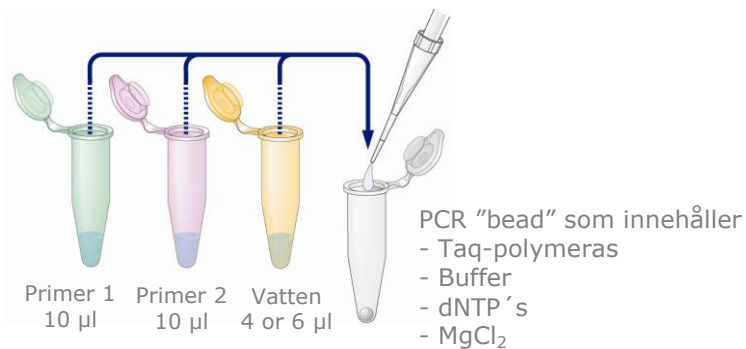
Eftersom PCR är så känslig, är det viktigt att undersöka om det kan ha skett en förorening med annat växt-DNA. Vid sidan av det egentliga provet kan man ta ett nytt prov från en del av kortet där man inte har placerat något växtmaterial. Denna provskiva skall behandlas på precis samma sätt som provet. Detta test kommer att visa om oönskat DNA har kontaminerat hålslaget och de prover som tagits med det. I bästa fall skall varje person som gör en PCR-laboration göra detta prov, men eftersom reagenserna är dyra görs vanligen detta bara en gång per klass eller grupp.

Tilläggs kan att vid verkliga tester, som är viktiga, bör man också undersöka om PCR-reagenserna kan ha blivit förorenade med DNA. Detta kan göras genom att sätta upp en reaktion med de två primers och vatten men utan någon pappersskiva. Man kan dock anta att alla reagenserna som här används är fria från föroreningar, vilket gör att denna test vanligtvis är onödig.

C Mångfaldigande av kloroplast-DNA

- Använd mikropipett försedd med en oanvänd engångsspets för varje reagens och tillsätt följande i ett 0,5 ml eppendorfrör med en PCR-pellet (Figur 8):
 - 10 µl Primer 1 (innehållande 5 pmol DNA per µl) 5'-CGAAATCGGTAGACGCTACG - 3'
 - 10 µl Primer 2 (innehållande 5 pmol DNA per µl) 5'- GGGGATAGAGGGACTTGAAC - 3'
 - 4 µl destillerat vatten (tillsätt 6 µl om en torr FTA[®]-skiva används)

Figur 8



Primer 1: 5'-CGAAATCGGTAGACGCTACG-3'
Primer 2: 5'-GGGGATAGAGGGACTTGAAC-3'

Figur 9.
Använd en pincett för att föra ner skivan med växt DNA



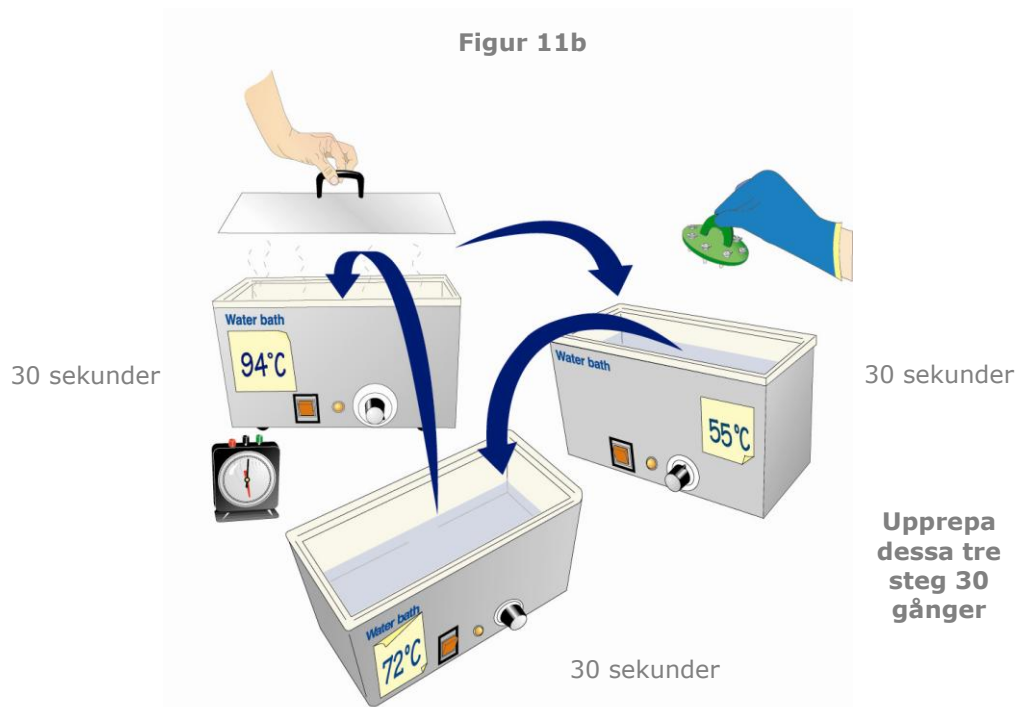
Figur 10.
Märk röret



Figur 11a.
PCR-apparat

Se till att spetsen inte vidrör PCR-pellets. Om den rör vid en pellet kan denna fastna på spetsen. Håll i stället spetsen mot rörets insida ovanför denna pellet. Då kommer en vätskedroppe att lämnas kvar på rörets sida. Vätskan rinner sedan ner mot rörets botten och löser upp din PCR-pellet.

2. Stäng röret. Skaka röret försiktigt så att PCR-pelleten löses upp i vätskan.
3. För att all vätska skall samlas på rörets botten kan du antingen knacka röret mot bänken eller köra röret en kort stund i en mikrocentrifug.
4. Med hjälp av en pincett placeras FTA[®]-skivan med växt-DNA i röret med PCR-reagensen (Figur 9). **Viktigt: se till att skivan ligger helt nere i vätskan.**
5. Stäng röret och skriv växtens namn och dina initialer på locket (Figur 10).
6. Placera röret i PCR-apparaten där andra i din klass eller grupp också placerat sina rör.
7. För att genomföra den cykliska temperaturväxlingen använder du PCR-apparaten (Figur 11a) med tre olika temperaturer inställda...



Om du använder vattenbad

Var försiktig så du inte bränner dig på det heta vattnet. För att hålla badet vid 94 °C kan det vara nödvändigt att täcka över det med ett lock.

... eller tre vattenbad kan också användas (Figur 11b):

- a. 94 °C i 2 minuter (vilket gör att provets DNA blir enkelsträngat)
- b. 94 °C i 30 sekunder
- c. 55 °C i 30 sekunder
- d. 72 °C i 30 sekunder

Upprepa b-d 30 gånger

e. 72 °C i 2 minuter (vilket gör att DNA-fragmenten är helt utsträckta)

- 8. Fortsätt med gelelektroforesen eller ...
- 9. ...alternativt, placera röret med sitt mångfaldigade DNA i -20 °C i ett frysskåp. Här kan det förvaras tills du kan börja med gelelektroforesen vid ett senare tillfälle.

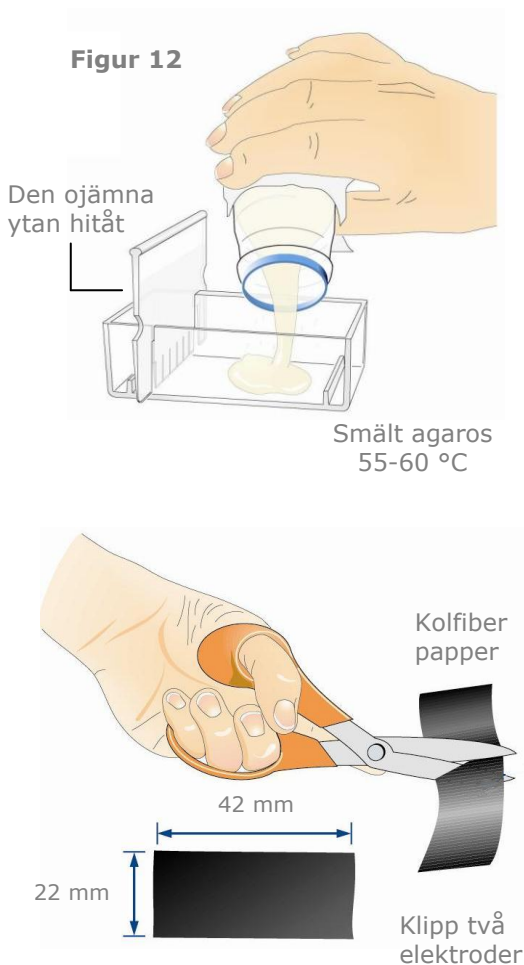
MÖJLIGT STOPP I LABORATIONEN



D Gelelektrofores av DNA

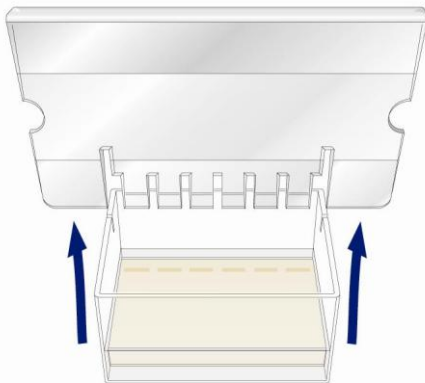
I Tillverkning av agarosgel

1. Använd en mikrovågsugn eller ett vattenbad med kokande vatten för att smälta en del agarosgel (1,5% i TBE-buffert). Var noga med att inga klumpar eller trådar finns kvar i den smälta agarosen – man kan se detta genom att hålla upp kärlet mot ljuset. När detta är klart skall kärlet förslutas och placeras i vattenbad med en temperatur på 55-60 °C tills gelen skall användas.
2. Placera elektroforestanken på en horisontell yta, där du kan lämna den ostörd under de närmaste 20-30 minuterna. Det är viktigt med en helt horisontell yta. Om den lutar blir gelen ojämnt tjock och DNA-fragmenten kommer inte att röra sig jämnt genom gelen.
3. Placera en 6-tandad "kam" i ena ändan av tanken (Figur 12). Var noga med att den frostade ytan vetter mot tankens borte ända (se Figur 12).
4. Häll ~12 ml av den smälta agarosen i tankens centrala del så att denna fylls och gelen rinner under och mellan "kammens" tänder. Tillsätt just så mycket gel att den är i nivå med tankens två upphöjda ryggar och så att gelytan inte buktar uppåt (Figur12). Om du råkar spilla agaros utanför de två ryggarna, kan detta tas bort när gelen stelnat.
5. Rubba inte tanken förrän gelen har stelnat. Agaros blir något mjölkaktig när den stelnar.
6. Medan gelen stelnar kan du skära till två bitar kolfiberpapper, omkring 42 mm × 22 mm (Figur 13). Dessa skall bli elektroderna i elektroforestankens båda ändar. Lägg dem åt sidan för tillfället.



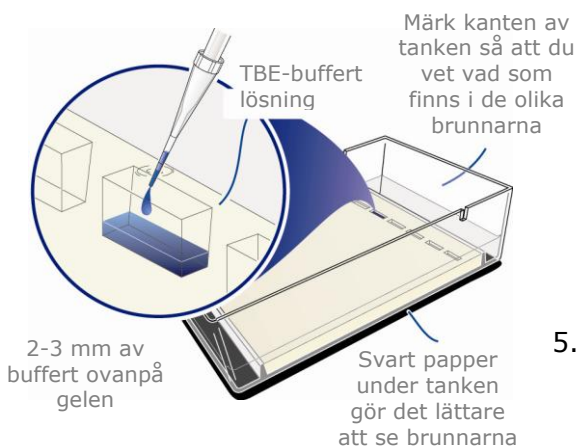
Figur 13

Figur 14



När gelen har stelnat häller du på TBE-buffert, därefter lyfter du försiktigt upp kammern

Figur 15

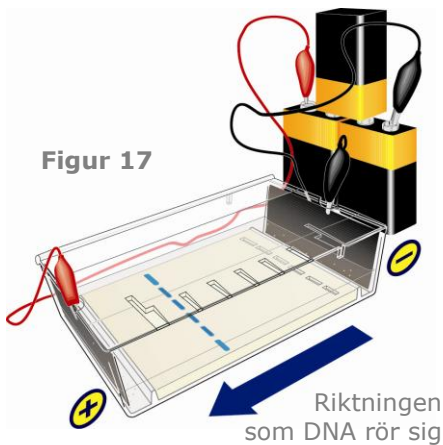
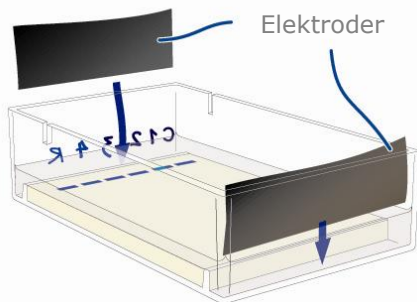


II Ladda gelen

1. Häll något mer än 10 ml TBE buffertlösning i elektroforestanken. Vätskan skall täcka gelen med 2-3 mm och även komma in i de områden där elektroderna skall placeras.
2. "Kammen" tas nu bort mycket försiktigt från gelen. När du gör detta kommer buffertlösningen att fylla de brunnar där "kammen" suttit (Figur 14). Var försiktig så att inte brunnarna skadas, när du tar bort "kammen".
3. Ställ tanken där du skall köra elektroforesen och där den kan stå ostörd.
4. Det är lättare att se vad du nu skall göra, om tanken är placerad på en svart eller mörk yta, till exempel en bit av en svart pappskiva. Ett annat sätt är att sätta svart tejp på tankens undersida under brunnarna. Sätt en ny spets på pipetten och tillsätt 2 μ l bromfenolblått till röret med det DNA, som du skall undersöka. Blanda DNA-provet noga med färgen genom att med pipetten suga upp och spruta ut vätskan upprepade gånger. Pipettera ner ca 10 μ l av blandningen i en av brunnarna genom att hålla ned spetsen ovanför denna, men under buffertlösningen (se Figur 15). Var mycket försiktig så att pipettspetsen inte sticker genom botten på brunnen.
5. Anteckna vilket DNA-prov du placerat i brunnen (till exempel genom att skriva med en märkpenna på utsidan av tanken).
6. Upprepa steg 4 och 5 för varje DNA-prov. Kom ihåg att använda en ny pipettspets för varje prov för att undvika kontaminering mellan proverna.
7. Ladda 10 μ l DNA-stege i en av brunnarna.
8. En brunn skall laddas med 10 μ l av ett testprov, som inte skall innehålla något växt-DNA.





Figur 16



III Kör elektroforesen

1. Placera en elektrod i varje ända av tanken, så som visas på Figur 16. Koppla elektroderna till batterier med hjälp av sladdar och "krokodilklämmor". Batterier seriekopplas så att de ger 36 Volt. *Observera att den positiva ändan skall kopplas till elektroden längst från brunnarna med prover.*
2. Kontrollera att det är ordentlig kontakt mellan buffertlösningen och elektroderna (om det behövs, kan mer buffertlösning försiktigt tillsättas). Placera kammen över tanken för att minska avdunstning under elektroforesen. Låt processen pågå ostörd under flera timmar (Figur 17). Den tid som behövs varierar beroende på den elektriska spänningen.

	Volt	Tid som behövs att köra gelen
	27	3½ hours
	30	2 hours



LÄGG INTE PÅ MER ÄN 36 VOLT!

En allvarlig och till och med dödlig elektrisk stöt kan inträffa om du ansluter utrustningen direkt till huvudströmmen

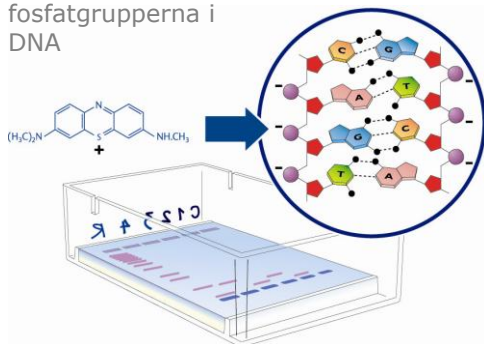
3. Koppla ifrån batterierna när den blå färgen nått ca 10 mm från kanten på gelen. Viktigt: om du låter elektroforesen pågå längre, kan DNA vandra över slutet på gelen och provet försvinner.
4. Skölj av "krokodilklämmorna" i kranvatten och torka dem noga för att undvika korrosion.

Kommentarer

Jonerna i TBE-bufferten i elektroforestanken leder elektriciteten. Bufferten är alkalisk och i sådant pH blir fosfatgrupperna på DNA negativt laddade och därför kommer DNA att röra sig mot den positiva elektroden (anoden) när ström ansluts. EDTA i bufferten binder divalenta katjoner (negativa joner). Detta hindrar att DNA bryts ner, eftersom sådana joner behövs som co-faktorer till DNA-nedbrytande enzymer.

Laddningsfärgen påverkar inte DNA, men vandrar genom gelen något före alla DNA-fragmenten - utom de allra minsta.

Positivt laddat Azur A binder till de negativt laddade fosfatgrupperna i DNA



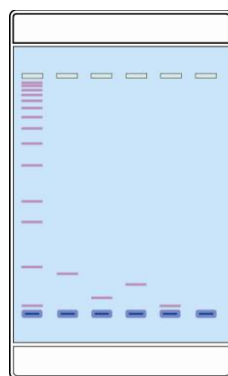
Figur 18

Färga endast 4 minuter

IV Färgning av DNA

1. Ta bort och släng elektroderna. Häll av buffertlösningen. Bufferten kan återanvändas några gånger.
2. Sätt på dig plasthandskar, så att inte din hud färgas av färglösningen.
3. Häll omkring 10 ml av färglösningen (0,04% Azur A i 20%ig etanol) över gelytan (Figur 18).
4. Lämna det så i *exakt* 4 minuter. Häll sedan tillbaka färgen i en flaska för återanvändning. (Precis som bufferten kan DNA-färgen användas många gånger innan den behöver ersättas med ny lösning. Det kan hända att du finner att gammal färg måste vara kvar på gelen något längre än 4 minuter.)

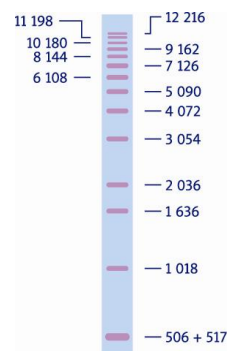
Figur 19



Brunner

Område med DNA band

Loading dye



1 kb-stege

Mindre fragment kan försvinna ur gelen

5. Skölj gelytan med vatten 3 eller 4 gånger, *men lämna inget vatten kvar på gelen, eftersom detta kommer att ta bort infärgning i gelens övre skikt.* Kvarvarande färg kommer sakta att vandra ner genom gelen och då färga DNA. Svagt färgade band bör kunna synas efter 10 minuter (Figur 19). Det bästa resultatet erhålls om gelen lämnas över natten. (Placera tanken i en plastpåse om du gör detta. Det hindrar gelen från att torka ut.) Färgade geler kan lämnas under mycket lång tid i förslutna plastpåsar som förvaras mörkt och kallt, till exempel i ett kylskåp.

Notera

Det är inte nödvändigt att avfärga gelen, om du följer dessa anvisningar.

Färgade geler kan förvaras oändligt i en förseglad plastpåse, som läggs på en mörk, sval plats, t ex i ett kylskåp.

Säkerhet

FTA[®] -kort och PCR-reagenser

FTA[®]-papper är inte giftigt för människor. Inte heller PCR-reagenserna är giftiga. Renlighet är nödvändigt för att undvika korskontaminering mellan prover och för att garantera bra resultat. Använda rör och pipettspetsar får därför inte användas. De kan utan problem slängas som normalt avfall, eftersom de är tillverkade av polypropylen.

Heta vattenbad

Om du använder vattenbad i PCR-processen (i stället för den automatiska temperaturcykeln i PCR-maskinen) måste du vara försiktig så du inte bränner dig, när du flyttar provrör mellan dem. Använd pincetter eller klädnypor för att hålla skumplastflötena och/eller använd värmeskyddande handskar för att inte skada dina händer på det heta vattnet eller vattenången.

Agarogelen

Om du använder mikrovågsugn för att smälta agarogel, skall du se till att gelen är placerad i ett icke förslutet kärl. Ett kokande vattenbad eller en värmeplatta kan användas i stället, men gelen måste röras om ibland så att den inte förkolas. Du bör *inte* använda Bunsenbrännare för att smälta agaros.



VAR FÖRSIKTIG!

Smält, varm agaros kan orsaka brännskador och måste därför hanteras försiktigt, särskilt direkt efter den blivit upphettat i en mikrovågsugn.

TBE-buffert (Tris-Borat-EDTA)

Om den används som beskrivits utgör bufferten ingen allvarlig säkerhetsfara. Använd buffert kan hällas ut i vasken.

Infärgning (med bromfenolblått)

När färgen används som beskrivits utgör den ingen säkerhetsrisk. Använd färg kan spolas ned i vasken.

Kolfiberelektroder

Detta papper kan ha små, lösa fibrer, som kan orsaka hudirritation om man hanterat det mycket. Använd skyddshandskar om du finner det obehagligt att hantera. Det är inte nödvändigt att använda ansiktsmask eftersom fibrerna är för stora att komma in i lungorna.

Fibrerna kan lösas i kroppsvätskor och är helt bionedbrytbara.

Strömförsörjning

NCBEs utrustning för gelelektrofores är gjord för att användas vid låg spänning (≤ 36 volt) med torrbatterier. **Under inga omständigheter får denna spänning överstigas, eftersom de elektriska komponenterna inte är isolerade mot användaren.**

NCBE tillhandahåller nu också en liten transformator som kan användas i stället för batterierna.



VAR FÖRSIKTIG!

En allvarlig och till och med dödlig elektrisk stöt kan inträffa om du ansluter utrustningen direkt till huvudströmmen

DNA-färg (Azur A)

Den koncentrerade färglösningen för DNA är eldfängd och måste hållas borta från öppen eld. Färgämnet är Azur A vilket, när det späds enligt instruktionen ovan, utgör en 0,04% lösning i 20% etanol. I denna koncentration utgör färgen ingen allvarlig säkerhetsfara. Man bör dock undvika skvätt på hud eller i ögonen, till exempel genom att använda skyddshandskar och skyddsglasögon. Använd färglösning kan spädas med vatten och hållas ut i vasken.

Etiska och andra eventuella problem

Denna laboration innebär inga etiska eller andra problem.

Recept

TBE-(Tris/Borat/EDTA) buffert

Används vid tillverkning av agarosgel och som buffert vid elektroforesen

Ger 1 liter koncentrerad lösning.

Kan förvaras under obegränsad tid vid rumstemperatur.

Ingredienser

1 g natriumhydroxid (MW 40,00)

108 g TRIS-bas (MW 121,10)

55 g borsyra (MW 61,83)

7,4 g etylen-diamin-tetraättiksyra (EDTA, dinatriumsalt, MW 372,24)

Tillredning

Tillsätt ingredienserna i 700 ml avjoniserat eller destillerat vatten.

Rör om så att de löser sig. Fyll på med avjoniserat eller destillerat vatten till 1 liter.

Varning

Undvik att andas in pulver av TRIS eller EDTA. Använd skyddsmask för näsa och mun. Båda kemikalierna klassas som irriterande och kan orsaka problem vid direkt hudkontakt eller inandning.

Observera: När bufferten skall användas späds det färdigblandade koncentratet med destillerat vatten i förhållandet 1:9.

Viktigt!

Använd inte TRIS-HCL till denna buffert. Du skall använda TRIS-bas

Azur A*Färg för nukleinsyror*

Ger 50 ml koncentrerad färglösning

Kan förvaras under obegränsad tid vid rumstemperatur.

Ingredienser

0.08 g Azur A (MW 291,8)

50 ml etanol (40% vattenlösning)

Tillredning

Tillsätt Azur A-pulvret till 50 ml 40% etanol. Rör om för att lösa färgen.

Varning

Den koncentrerade DNA-färgen är eldfängd och får inte lagras eller användas i närheten av öppen eld eller andra källor där den kan antändas. Färgflaskan måste hållas tillsluten för att undvika att alkoholen avdunstar.

Vid utspädning till arbetskoncentrationen (0,04% i 20% etanol) utgör färgen ingen allvarlig säkerhetsfara. Dock bör skvätt undvikas på hud eller i ögon; använd till exempel skyddshandskar och skyddsglasögon. Använd färg kan spädas med vatten och hållas i vasken.

FÖRSTA HJÄLPEN (Azur A-pulver)**ÖGONKONTAKT**

Badda ögonen med rikligt med vatten under minst 15 minuter. Sök läkarhjälp.

HUDKONTAKT

Tvätta huden med tvål och rikligt med vatten. Om det uppstår irritation – sök läkarhjälp.

INANDNING

Förutsatt att personen är vid medvetande, skölj ur munnen med vatten. Åstadkom kräkning. Sök läkarhjälp.

OBSERVERA

Vid användning skall Azur A-koncentratet spädas med lika del destillerat vatten.

Agarogel

För att separera små fragment av nukleisyra

Ger 100 ml 1,5% agaros

Kan förvaras under obegränsad tid vid rumstemperatur.

Ingredienser

1,5 g agaros för elektrofores

100 ml TBE-buffert

(1x – gjort från koncentratet, ovan)

Tillredning

Tillsätt agarospulvret till den utspädda TBE-bufferten. Upphetta i kokande vattenbad eller i mikrovågsugn så att agarosen löses. Mindre än 1 minut vid 940 watt räcker för att smälta 100 ml gel. Kärlet med smält agaros skall inte stängas helt, men kan täckas med en plastfilm som punkteras med ett eller två små hål. Kärlet skakas lätt halvvägs genom upphettning-proceduren för att gelen skall blandas ordentligt.

När gelen är smält, kan agaroslösningen hållas i ett vattenbad vid 55 - 60 °C.

Kontrollera att gelen är ordentligt blandad innan geler gjuts i elektroforestankar.

Varning!

Het, smält agaros kan brännas, så den måste hanteras varsamt. Det är lämpligt att låta den smälta agarosen svalna något tills den lätt kan hanteras innan man gjuter geler.

Bromfenolblått färg

För färgning av DNA-fragment i elektroforesgeler

Ger 100 ml

Kan förvaras under obegränsad tid vid rumstemperatur.

Ingredienser

0,25 g bromfenolblått (MW 669,96)

50 g sackaros (MW 342,30)

1 ml 1-M TRIS (pH 8, MW 121,10)

Tillredning

Ingredienserna ovan sätts till 60 ml avjoniserat eller destillerat vatten.

Rör om för att lösa ingredienserna. Fyll på till 100 ml med avjoniserat eller destillerat vatten.

Förberedelser och tidsåtgång

Undersökningen är en komplex process i många steg. Det är därför nödvändigt med noggrann planering för att passa in den i en serie normala skollektioner eller en enda lång laboration. Hela proceduren, inklusive att torka FTA[®]-kort och PCR-processen, men utom elektroforesen, tar cirka 3 timmar. Tidsåtgången för elektroforesen beror på utrustning och strömkälla – den kan ta så lite tid som 30 minuter (vid 90 V) eller vara så långvarig som 3,5 timmar (vid 27 V) om man använder utrustning från NCBE. Större geler med annan utrustning tar längre tid.

Som en grov vägledning, är tiden för denna laboration följande:



Att ta fram DNA på FTA[®]-kort: 10 minuter

Torktid: 60 min

MÖJLIGT STOPP

Att rena DNA-prover: 20 minuter

MÖJLIGT STOPP

Att göra PCR-reagenser: 10 minuter

PCR för hand: 50 minuter

PCR i maskin: ~ 90 minuter

MÖJLIGT STOPP

Att förbereda och gjuta geler: 30 minuter

Elektrofores: 30 minuter
- 3,5 timmar

Färgning av gelen: 10 minuter

För att spara tid kan gelerna gjas i förväg. Gjutna geler kan sparas i kylskåp flera dagar före användandet, om de är täckta med TBE-buffert och placerade i tillslutna plastpåsar.

Det är också möjligt att stoppa proceduren efter elektroforesen, men detta är inte att rekommendera. Gelen kan färgas upp till 24 timmar efter man kört elektroforesen, men om man väntar längre kommer DNA att spidas i gelen och banden blir mindre tydliga. Icke färgade geler skall förvaras täckta med TBE-buffert i slutna plastpåsar i kylskåp.

Felsökning

Pipettövning

Elevernas förmåga att mäta upp exakta volymer med hjälp av mikropipetter förbättras vid övning. Det är därför en god ide att öva pipettering av vätskor (t. ex. matfärger) innan man startar arbetet med dyrbart DNA, enzymer och andra reagenser.

Observera

Agaros, löst i utspädd buffert, inte vatten, måste användas för de riktiga gelerna med DNA.

Att ladda gelen

En stadig hand fordras för att ladda gelerna. Övningsgeler kan göras av billigare agar (använd 1% lösning) än agaros. Under övningar kan vatten användas i stället för buffert över gelen. Övningsgeler kan tvättas av och återanvändas många gånger.

Att smälta agaros

Var noga med att det kärl som används för att göra agarosgelen i är rent. Små områden med damm påverkar inte hur elektroforesen går, men det kan störa när man försöker se de svaga banden i gelen.

Av bekvämlighetsskäl bör man använda en mikrovågsugn för att lösa och smälta agarosen. Mindre än en minut är tillräckligt för 100 ml gel vid 940 W. Kärlet (kolv eller bägare) för att smälta agarosen i får inte tillslutas helt, men kan täckas över med en plastfilm, som man stuckit ett par små hål i. Snurra runt kärlet halvvägs genom smältproceduren för att säkra att gelen blir ordentligt blandad.

Agarogel kan göras med hjälp av en värmeplatta (eller kokplatta). I detta fall måste kärlet med gelen snurras runt under uppvärmningen för att undvika förkolning. Bättre är att ställa kärlet med agaros i en kastrull med kokande vatten. Att använda bunsenbrännare är inte att rekommendera.

När gelen tillverkats kan den förvaras i smält form om den placeras med sitt kärl i ett vattenbad vid 60 °C tills den behövs. Var försiktig när du hanterar smält agaros; den är mycket varm och kan brännas. Gelen måste få lov att svalna något innan den hälls upp.

Elektroforesen tar för lång tid

Om färgen inte har rört sig från brunnarna efter 20 minuter och inga bubblor syns vid katoden, måste de elektriska kontakterna mellan batterier och elektroder kontrolleras. Kontrollera också att det finns tillräckligt med buffert ovanför gelen, men inte så mycket att det mesta av strömmen passerar genom bufferten och inte genom gelen. Kom ihåg att under långa körningar (t.ex. under natten) eller i en varm miljö kan vätska från bufferten avdunsta. Tanken bör under sådana förhållanden vara täckt, för att minska eller förhindra sådan avdunstning.

Det finns ingen DNA på gelen

Om man kan anta att PCR - processen fungerat, kan det ändå finnas några vanliga orsaker. En orsak kan vara att du inte laddat med tillräckligt DNA i brunnen. En andra möjlighet är att DNA-provet försvunnit genom att botten i brunnen blivit skadad och genombruten, och en tredje kan vara att DNA-provet inte blivit tillräckligt väl blandat med laddningsfärgen.

DNA-banden är mycket otydliga

Det kan vara många tänkbara orsaker till detta problem. Förutsatt att PCR-processen har fungerat som den skall, så kan en orsak vara att ditt DNA-prov inte blivit tillräckligt väl blandat med laddningsfärgen. För att undvika detta, bör du alltid föra DNA-lösningen upp och ner några gånger i mikropipettens engångsspets.

Har du fått tillräckligt mycket av DNA-provet ned i brunnen?

Använder du färgen på rätt sätt? Efter det du tillsatt Azur A till gelen, hållt av färgen och sedan sköljt bort eventuellt överflöd av den, skall du vara noga med att inte lämna kvar något vatten på gelen. Du kan eventuellt få bort kvarvarande vattendroppar genom att försiktigt med ett finger (filtrerpapper) torka av gelytan. Den blå färgen som först finns i gelens övre skikt kan åter lösas upp i små vattenrester på ytan. Detta minskar givetvis den mängd färg som kan tränga vidare ner i gelen och färga nukleinsyran.

Under inga omständigheter skall du försöka avfärga gelen. Även om detta kan vara nödvändigt om man färgar med metylenblått (för att få bort bakgrundsfärg) skall det inte göras vid användning av Azur A. Metoden med Azur A har särskilt tagits fram för att slippa avfärgning. Geler färgade med metylenblått bleknar snabbt, medan Azur A-färgen varar i flera månader.

Banden på gelen ligger mycket nära varandra och är svåra att urskilja.

Även här kan det finnas ett par orsaker. Bufferten kan ha utsatts för kraftig avdunstning under elektroforesprocessen, vilket minskat hastigheten i DNA-vandringen genom gelen. En annan anledning kan vara en felaktig agaroskoncentration i gelen. Gör alltid mera gel än du behöver, för att kunna vara säker på att få rätt koncentration. Det är en mycket signifikant skillnad mellan till exempel en 0,8% och en 1,5% agarosgel. Ett litet fel i uppvägningen av agarospulvret kan lätt ge felaktigheter på denna nivå. Agaroskoncentrationen du skall ha i denna laboration skall vara 1,5% (vikt till volym).

“Öppna undersökningar”

Eleverna kan välja vilka växter de vill undersöka i denna laboration, till exempel växter som man tror har utvecklats nyligen jämfört med sådana som har släktskap med gamla, fossila arter. Lägg märke till att fiberrika vävnader som till exempel barr från tall eller i stjälkar på många växter kan vara svåra att få att fungera med metoden med FTA[®]-kort.

Om data på DNA-sekvenser är kända för de undersökta växtarterna kan man på nätet utnyttja redskap för bioinformation av typen “Clustal-W” för att konstruera fylogenetrad: <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>

Ibland är det möjligt att skilja mellan närbesläktade arter (som havre och vete) genom begränsningar i det mångfaldigade DNA-fragmenten. Se till exempel i Streicher, H. och Brodte, A. (2002).

NCBE har testat och fått goda resultat med:

krasse	gräslök	spenat
kinesisk gräslök	rucola sallad	korriander
vårlök	sockerärtor	vattenkrasse*
persilja	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	brysselkål
<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Selenastrum gracile</i>	mangold

Chili peppar (skalet från olika gröna varianter)

*Vattenkrasse ger vanligen en riklig PCR produkt

Leverantörer

Allt som behövs för denna laboration kan köpas från företag som levererar laboratorieutrustning och – materiel. FTA[®]-kort kan köpas världen över från distributörer av produkter från Whatman[®] (www.whatman.com). Pellets till PCR kan erhållas från GE Healthcare (tidigare Amersham Biosciences), och andra företag.

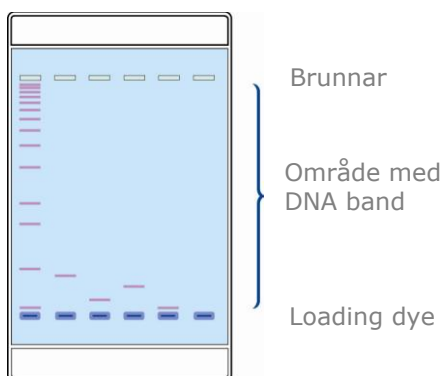
National Centre for Biotechnology Education (UK) säljer ett "kit" till skolor som innehåller vad som behövs för denna laborationen (www.ncbe.reading.ac.uk).

Att slänga eller att återanvända

Allt avfall från laborationen kan slängas utan särskilda åtgärder. Engångsspetsar, eppendorfrör mm kan rengöras, autoklaveras och återanvändas, men detta rekommenderas inte. PCR-reagenserna är mycket känsliga och kan påverkas negativt av minsta förorening.

Förvaring av material

De flesta reagenserna skall lagras torrt och i rumstemperatur. Primers för PCR kan behöva förvaras i frysskåp vid -20 °C (läs leverantörernas instruktioner).



Figur 20

Presentation av resultat

Figur 20 visar ett typiskt resultat.

Andra informationskällor

Mullis, K.B. (1990) The unusual origin of the polymeras chain reaction. *Scientific American* **262**, 36-43.

Making PCR, A story of biotechnology by Paul Rabinow (1996) The University of Chicago Press. ISBN: 0 226 70147 6.

Willmott, C. (1998) An introduction to the polymeras chain reaction. *School Science Review* **80**, 49-54.

Referenser

Denna laborationshandledning baseras på:

Taberlet P., *et al* (1991) Universal primers for the amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* **17**, 1105-1109.

En utvidgning av proceduren med användning av restriktionsenzymet Dde1 för begränsning av PCR-produkten för identifiering av arter finns beskrivet i: Streicher, H. and Brodte, A. (2002) Introducing students to DNA: Identifying nutritional plants in a simple tried and tested laboratory experiment. *Biochemical Education* **30**, 104-105.

Tack

Data på molekylstrukturer

Bilder på molekyler gjordes med hjälp av data från The Protein Data Bank: www.rcsb.org/pdb

Data rörande *Taq* polymeras har publicerats: Eom, S.H., *et al* (1996) Structure of *Taq* polymerase with DNA at the polymerase active site. *Nature* **382**, 2278-281. (Protein Data Bank ID: 1TAU)

Rubisco-molekylen har hämtats från: Taylor, T.C., and Andersson, I. (1997) The structure of the complex between rubisco and its natural substrate ribulose 1,5-biphosphate. *Journal of Molecular Biology* **265**, 432-444. (PDB ID: 1RCX)

Mjukvaran som användes för att få fram bilder på molekylmodeller var *VDM* (Visual Molecular Dynamics) som man kan få gratis på nätet: www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/

PCR – processen

Användningen av universella primers för mångfaldigande av kloroplast-DNA uppmärksammades först av Kenny Hamilton från Breadalbane Academy i Aberfeldy, Skottland. Kenny tog fram en preliminär laboration, medan han hade ett lärarstipendium vid Royal Society of Edinburgh. Craig Simpson vid Gene Expression Programme vid Scottish Crop Research Institute bidrog med ovärderliga råd i utformningen av den ursprungliga laborationen, s liksom när det gällde laboratorieresurser.

Andy Harrison vid National Centre for Biotechnology Education vid Ubersitetet i Reading, förbättrade och förenklade den ursprungliga laborationen och introducerade utnyttjandet av FTA®-kortet för att få fram växt-DNA. Han förenklade även PCR-processen så att den kunde genomföras lättare och snabbare i skolornas laboratorier.

Appendix 1: Från strå till höstack

PCR-metoden (Polymerase Chain Reaction)

En mycket användbar teknik

PCR metoden kan liknas vid en genetisk kopiator. Från ett litet biologiskt material kan miljoner kopior av ett utvalt DNA-parti göras snabbt, exakt och automatiskt.

Metoden användes först för att utföra medicinska diagnostiska tester, men används idag i många olika sammanhang, t.ex. i polisutredningar och i arkeologiska undersökningar samt för att spåra parnings- och matvanor hos olika djurarter.

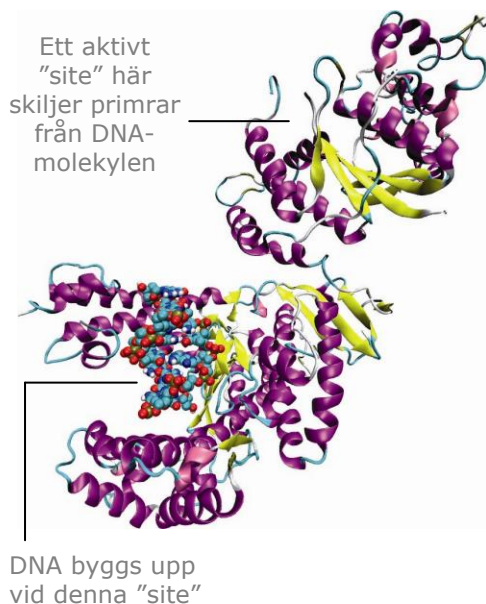
En metod som kallas "DNA shuffling" möjliggör för "proteiningenjörerna" att framställa bättre enzymer för industriellt bruk genom att efterlikna evolutionsprocesser.

Utan en intelligent variant av PCR-metoden, kallad "cycle sequencing" skulle det mänskliga genomprojektet (Human Genome Project) varit nästan omöjligt att genomföra – liksom mycket av den molekylärbiologi som idag utförs i laboratorier runt om i världen. Det är därför föga förvånande att uppfinnaren av PCR-metoden, Kary Mullis, fick Nobelpriset i kemi 1993.

En biltur genom skogen

Vägen fram till PCR-tekniken började en månljus kväll i april 1993. I Kary Mullis version av sin uppfinning, beskriver han hur två nyckelfunktioner klarnade för honom medan han körde till sitt weekendställe i Kalifornien. Mullis måste stanna vid väggkanten två gånger: en gång för att beräkna hur många DNA-kopior som kunde bildas i processen; och en andra gång för att skissa ett diagram, som visade hur den skulle kunna duplicera en speciell del av ett DNA.

Idén var så enkel att folk först vägrade att tro på att det skulle kunna fungera. Ingen kunde heller tro att det inte hade prövats tidigare och man då funnit metoden alltför opraktisk av någon anledning. Efter Mullis inledande arbete, utförde hans kollegor vid Cetus Corporation, ett av de första bioteknikbolagen, omfattande forskning för att förbättra metoden och så småningom togs patent på den. Mullis fick en bonus för sin uppfinning på tiotusen dollar. PCR har sedan blivit så betydelsefull att Cetus-bolaget kunde sälja rättigheterna i processen till Hoffman-La-Roche för 300 miljoner dollar.



Genombrottet som gjorde PCR till en bekväm laborieteknik var isoleringen av DNA- polymeras från *Thermus aquaticus*, en bakterie som finns i heta källor. Enzymet som kallas Taq-polymeras, är stabilt vid höga temperaturer och kan därför klara de höga temperaturerna i reaktionen. I den dataframställda modellen som visas här, är β -sheet-strukturer färgade gula och α -helix-strukturer färgade mangenta. Ett litet fragment av den DNA-molekyl som tillverkas visas som en "space-filling" modell.

Så här fungerar PCR

Den moderna PCR-metoden (en något förändrad version av Mullis ursprungliga idé) fungerar på följande sätt:

Material

- Dubbelsträngat DNA tas ut från det prov som skall undersökas.
- Två enkelsträngade "primers" som placeras på ömse sidor av den DNA-sekvens som skall kopieras. Dessa är vanligen 15-30 baspar långa och är komplementära till (d v s de bildar par med) vardera 5'-ändan av de två DNA-strängarna.
- DNA-provet blandas med primers.
- Lika delar av deoxyribonukleosidtrifosfat (dNTPs) tillsätts. dNTPs är de enheter som DNA är uppbyggt av.
- Värmestabilt *Taq*-DNA-polymeras (som fås från hetvattenbakterien *Thermus aquaticus*) tillsätts ovanstående blandning tillsammans med Mg^{2+} -joner, som behövs som en co-faktor till enzymet. Detta enzym binder ihop dNTPs vid uppbyggnad av nytt DNA.

Alla delar som behövs för PCR-reaktionen (vid sidan av primers och DNA-provet) kan torkas till små pellets i rätt proportioner. Sedan behöver man endast tillsätta primers och DNA-provet till ett provrör med dessa små pellets. Detta innebär att man slipper pipettera små volymer av flera reagenser, vilket förbättrar tillförlitligheten i processen.

Processen

När alla kemikalier som behövs för tillverkningen av DNA har blandats, utför PCR-apparaten tre steg som ingår i processen. Dessa upprepas 20-40 gånger.

Denaturering

Det dubbelsträngat DNA delas upp i två enkelsträngade kedjor genom upphettning till 94-98 °C.

Avkylning

Blandningen kyls av till 50-65 °C. Primers binder till den komplementära DNA-strängen.

Uppbyggnad

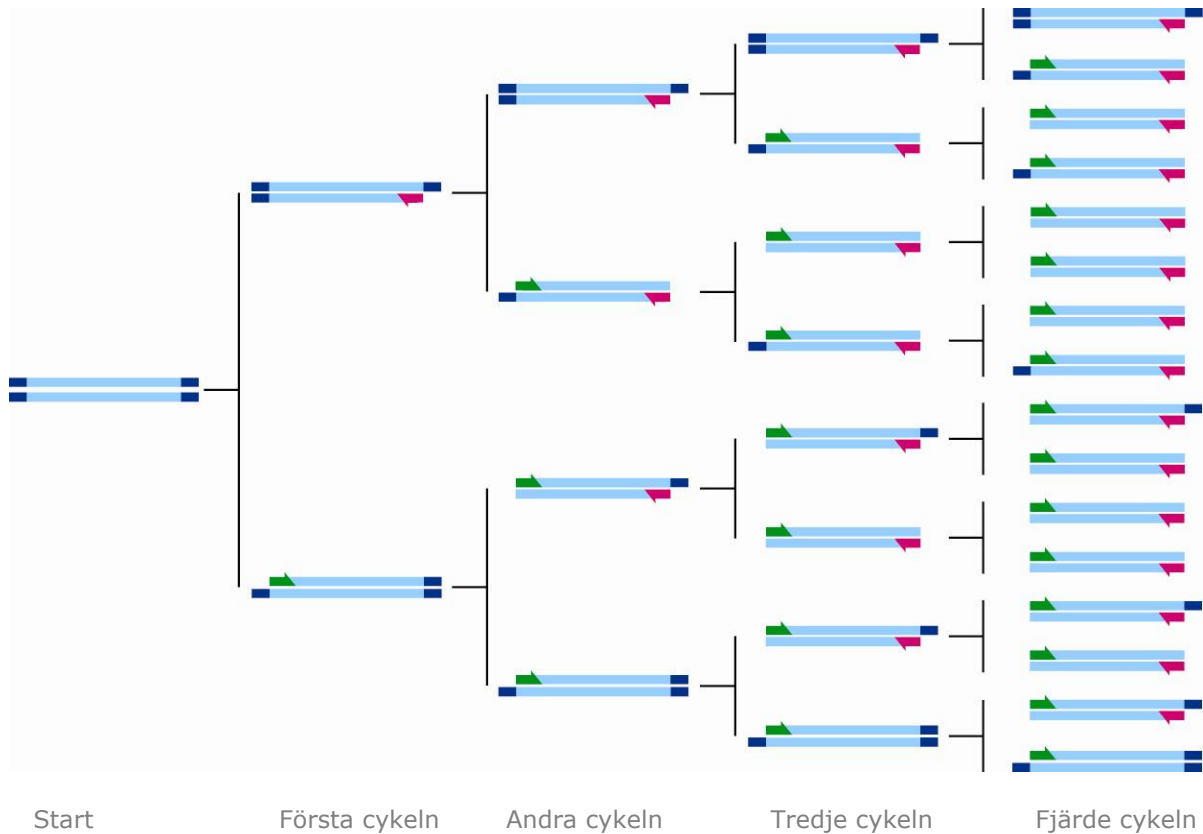
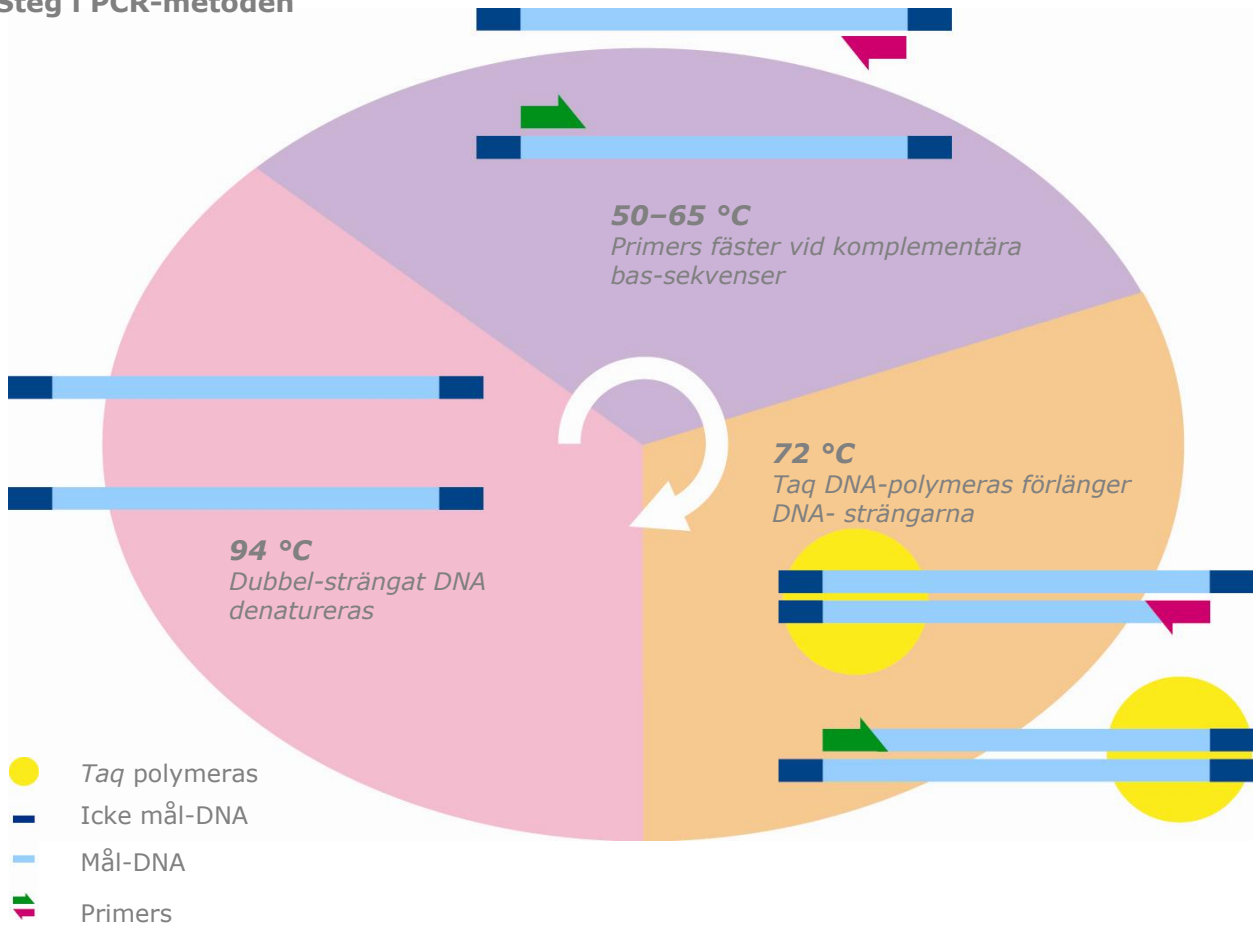
Genom att hetta upp till 72 °C (optimala temperaturen för *Taq* polymeras) syntetiseras nya DNA-strängar längs provsträngarna. Vid detta steg fördubblas antalet DNA-molekyler i provröret.

Cykeln med upphettning och avkyllning upprepas nu. Vid varje cykel (som varar ca 2 minuter) dubblas antalet DNA-molekyler. Efter 25 cykler har mer än en miljon kopior av det ursprungliga provet bildats.

Vid de första försöken med PCR användes vattenbad med tre olika temperaturer. Det dröjde dock inte länge innan processen automatiserades. Den första PCR-maskinen kallades "Mr Cycler". För att minska avdunstningen från de små volymerna under de upprepade temperaturcyklerna har moderna PCR-maskiner en upphettad platta över provrörens mynningar.

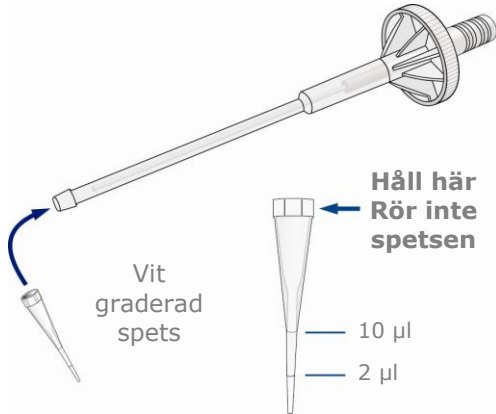
PCR är en mycket känslig process och teoretiskt kan en enstaka DNA-molekyl mångfaldigas. Noggranna försiktighetsåtgärder måste därför vidtas för att förhindra att oönskade DNA-molekyler kommer in i provrören.

Steg i PCR-metoden



Appendix 2: Att mäta små volymer

Tre olika mikropipetter finns med i detta kit, så att du kan pipettera ut rätt volym.

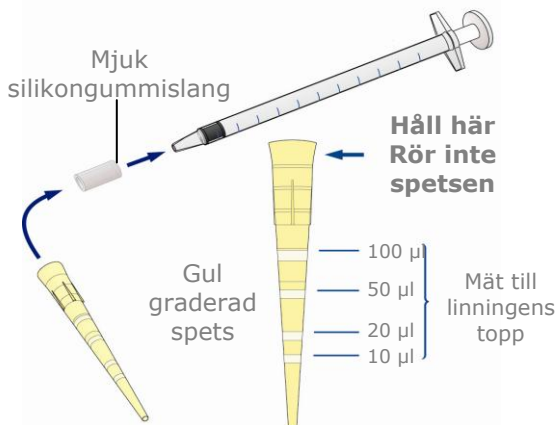


Pipetter med graderade spetsar

Två typer av pipetter – vanliga 1 ml pipetter och tunnare mikropipetter – kan förses med graderade engångspetsar och är användbara för att mäta små volymer. De vita mikropipettspetsarna är markerade vid 2 resp. 10 μ L (mikroliter). De större gula spetsarna passar till en 1 ml spruta och används att pipettera volymer mellan 10 och 100 μ L. För att få en effektiv förslutning mellan spetsen och själva sprutan, så är det nödvändigt att använda en kort bit mjuk silikongummislang, som sträcker sig 1-2 mm utanför sprutmunstycket (om slangen är alltför kort kan du inte få fast en spets på sprutan).

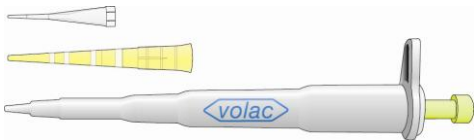
När du använder sådana här sprutor är det mycket viktigt att endast dra upp vätska i spetsen och att använda graderingen på spetsen som guide. Bry dig inte om markeringarna på själva sprutan och var försiktig så att du inte får in vätska i själva sprutan.

Med båda typerna av sprutor får du bäst resultat om du vidtar följande försiktighetsåtgärder:



- Dra aldrig kolven ur sprutan – när kolven sätts in igen kan förseglingen skadas;
- Innan du suger in vätska i spetsen, skall du dra ut kolven något (1-2 mm). Detta ger lite extra luft, som kan användas att skjuta ut den sista droppen vätska från spetsen;
- När du fördelar vätskan, skall du hålla sprutan så vertikalt som möjligt och i ögonhöjd så att du kan se vad du gör;
- Ta bort vätskan från spetsens topp genom att hålla spetsen mot innerväggen av det rör som du pipetterar ner i.
- Rör inte vid pipettspetsen med fingrarna. Det finns proteaser och DNaser i din svett som kan förorena och bryta ner reagensen.

De här pipetterna får användas med vita eller gula spetsar: använd den som är rätt för volymen som behövs



Volym

En mikroliter är en miljondels liter
 $1\ 000\ \mu\text{l} = 1\ \text{ml}$
 $1\ 000\ \text{ml} = 1\ \text{l}$

Volymfixerade mikropipetter

Volymfixerade mikropipetter kan användas för att mäta små volymer med mindre än 1% fel, men för att få det så exakt måste du använda dem korrekt.

För det första måste spetsen sättas ordentligt fast på pipetten, så att det blir en tät förslutning. För det andra skall du lägga märke till att pipetterna verkar på två sätt. Använd dem enligt följande:

- Tryck ner kolven till första stoppet;
- För ner spetsen i vätskan, lätta därefter *försiktigt* på kolven och dra upp vätska i spetsen;
- För att få ut all vätska från sprutan, tryck ner kolven till andra stoppet;
- Efter att all vätska tryckts ut skall spetsen lyftas upp ur vätskan innan man drar upp kolven (annars drar pipetten upp vätskan igen).



Tack

Volvox-projektet finanseras av EU:s Sjätte Ramprogram.