

John Schollar och Andy Harrison  
NCBE, The University of Reading

## Mångfaldigande av mänskligt mitokondrie-DNA

### Syfte

Med denna procedur kan du mångfaldiga ett 460 baspar långt stycke DNA, som finns i kontrollregion av mitokondriens DNA. Man kan göra detta med hjälp av tre vattenbad eller en PCR-maskin, om man har tillgång till en sådan. Efter att DNA är mångfaldigat, körs det på en elektroforesgel.

Observera: Denna laboration har modifierats efter ett protokoll, som har utvecklats vid Dolan DNA Learning Center vid Cold Spring Harbor Laboratory. Ytterligare detaljer kan hämtas från DNA Learning Centers hemsida:  
<http://vector.cshl.org/geneticorigins>

### Utrustning och material

#### Behov per person eller grupp

*För DNA-extraktion och för PCR*

- Isoton sportdryck, 3–5 ml (apelsinsmak fungerar bra, eftersom den färgar de extraherade cellerna så att det är lättare att se)
- Ren, engångsmugg (papper eller plast)
- Steril engångsspruta (1 ml, utan nål)
- Chelex-massa 500µl (10% i 50 mM Tri-buffert, pH 11)
- Primrar, 5 µl av vardera (i Cresylrött "loading dye" — Se sid 9):  
5'-TTAACTCCACCATTAGCACC-3'  
5'-GAGGATGGTGGTCAAGGGAC-3'
- Färdiggjord PCR-mix, som innehåller buffrad dNTPs, Taq polymeras och MgCl<sub>2</sub> (t. ex. *Amersham-Pharmacia 'Ready-to-go'* kulor)
- Sterilt eller avjoniserat vatten, 10 µl
- Mikrocentrifugrör 2 st (1.5 ml)
- Mikropipetter för 5–40 µl
- Spetsar till mikropipetterna
- Mineralolja (behövs endast om du använder en PCR-maskin utan uppvärmbart lock)
- PCR-maskin

eller... *För manuell cykling*

- Vattenbad, 3 st (som håller temperaturer på 94, 55 och 72°C).
- Flytblock för mikrocentrifugrören
- Stoppur

*För elektroforesen*

- Agaroslösning, (1,5% i TBE buffert. Den kan smältas i en mikrovågsugn och sedan hållas flytande i ett vattenbad på 55–60°C.)
- TBE-buffert
- Azur A lösning, till färgning av gelen (0,04% i 20% etanol)
- Mikropipetter, 5–40 µl

#### KORRESPONDENS TILL

John Schollar  
National Centre for Biotechnology  
Education, The University of Reading,  
Whiteknights,  
Reading RG6 6AP  
The United Kingdom  
[J.W.Schollar@reading.ac.uk](mailto:J.W.Schollar@reading.ac.uk)

- Pipettspetsar
- Gelelektroforesutrustning och spänningsaggregat
- EJ HELT NÖDVÄNDIGT: 1 kb DNA stege, 20 µl i TE buffert (innehållande 1 mg DNA) eller 20 ml Lambda DNA (innehållande 2 µg DNA) klyvt med *Hind III*.

Du behöver också

- Spritpenna, fin spets, permanent

## Utförandet

### A Isolering av mitokondrie DNA

- 1 Skölj munnen under 60–90 sekunder med den isotona sportdrycken. Skrapa försiktigt loss celler från munnens insidor med hjälp av tänderna, medan du sköljer. *Munceller, som innehåller mitokondrier kommer då art sköljas ner i drycken. Eftersom drycken är isoton förhindras art cellerna sprängs (lyseras).*
- 2 Spotta ut drycken med saliv och munceller i engångsmuggen.
- 3 Mät upp 1 ml av drycken, som nu innehåller munceller, med hjälp av en steril spruta och för över detta till ett centrifug rör. Var noga med att se till at du får med celler från muggens botten och försök att undvika att få med skum från saliven.

Fig. 1



Fig. 2



Fig. 3



- 4 Centrifugera under 5 minuter vid 13 000 rpm. **OBS! Kontrollera att centrifugen är balanserad innan du startar den!**
- 5 Häll bort supernatanten i den bägare du har för avfall. Gör detta med en snärt. En pellet med celler, som finns i botten av röret, skall då stanna kvar. Om du inte har någon pellet, så har du förmodligen fått med för mycket sal iv och alltför få celler. Upprepa momenten 3, 4 och 5 tills du får en klart synlig pellet.
- 6 Låt röret stå upp och nervänt på en bit filter- eller hushållspapper, så att det mesta av vätskan sugts bort. Lite vätska kommer dock att finnas kvar i röret. Papperet skall sedan kastas i avfallet som desinfekteras.

Fig. 4



Fig. 5



Fig. 6



- 7 Tillsätt 0.5 ml *Chelex*-blandning till pelleten. Försäkra dig om att *Chelex*-kulorna är ordentligt uppskakade i bufferten, när du tillsätter blandningen. *Obs: Chelex-kulorna löser sig inte i bufferten.*
- 8 Knacka röret i bordet och skaka det ordentligt, så att cellerna blandas ordentligt i *Chelexen*. Detta kan vara svårt, men är mycket viktigt. Har du tillgång till en Vortex-apparat så är det ett utmärkt hjälpmedel. *Chelexen adsorberar de föroreningar som kan störa PCR.*
- 9 Sätt på locket mycket noga så att det inte öppnas. Sätt därefter röret i ett kokande vatten bad under 10 minuter. **OBS! Var försiktig så du inte bränner dig. Värmen gör att muncellerna lyserar (sprängs) och släpper ut sitt innehåll.**

Fig. 7



Fig. 8



Fig. 9



- 10 Tag upp rören ur vattenbadet och centrifugera dem under 1 minut vid 13 000 rpm. **OBS! Kontrollera att centrifugen är balanserad!** Detta gör att *Chelex* kulor och celldelar, inklusive kärn-DNA hamnar på botten av röret. Det relativt lätta mitokondri-DNA (mtDNA) kommer att hamna i supernatanten.
- 11 För över 40 µl av supernatanten i ett rent och märkt mikrocentrifugrör. Detta är ditt DNA prov, som skall mångfaldigas genom PCR.
- 12 Förvara DNA provet på is eller i en frys tills nästa steg dvs PCR, skall startas.

Fig. 10



Fig. 11

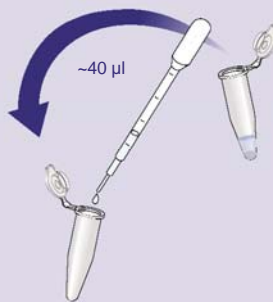


Fig. 12



### B Mångfaldigande av mtDNA

13 Tag ett rör som innehåller de färdigblandade PCR reagensen. Tillsätt 5 µl av din mtDNA lösning. Tillsätt 5 µl av vardera primerlösning. Använd ny pipettspets vid varje pipettering. Tillsätt slutligen 10 µl sterilt, destillerat vatten, vilket ger en totalvolym på 25 µl.

14 Skaka röret och blanda innehållet snabbt men ordentligt bl a genom att knacka på rörets botten med ditt finger. Knacka därefter ordentligt med röret på bordet, så att alla små droppar som finns på rörets väggar åter rinner ner till botten av röret. Försäkra dig om att locket är ordentligt påsatt, eftersom uppvärmningen i nästa steg annars kan orsaka att det öppnas. *Obs: Vanligen placerar man en droppe mineralolja ovanpå PCR reagensen, så art det inte sker någon avdunstning. Om du använder en PCR maskin med ett uppvärmningsbart lock behövs ingen oljedroppe. Du behöver inte heller någon olja om du utför en manuell cykling (med vattenbad), eftersom den vätska som kondenseras på rörets lock, brukar rinna ner i röret igen, när röret flyttas mellan vattenbaden.*

15 Märk locket på ditt rör med en vattenfast tuschpenna.

Fig. 13

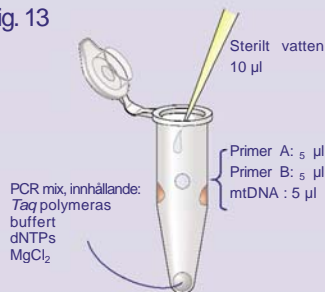


Fig. 14



Fig. 15



16 Förvara ditt material på is eller i en frys tills det skall mångfaldigas.

17 i. Användning av PCR apparat

Programmera PCR apparaten på följande sätt:

Program 1 (1 cykel)

94°C under 2 minuter

Program 2 (30 cykler)

Steg 1 (denaturering) 94°C under 30 sekunder

Steg 2 (sammansmältning) 55°C under 30 sekunder

Steg 3 (duplicering) 72°C under 30 sekunder

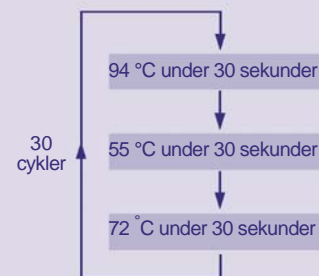
Program 3 (1 cykel)

72°C under 5 minuter, därefter skall det hållas vid 4°C

Fig. 16



Fig. 17i



ii. Manuell cykling

- a Sätt reaktionsröret i ett ställ. Låt stället flyta i det 94°C vattenbadet under *exakt* 30 sekunder. Lämna inte röret i vattenbadet för länge, för då kan *Taq* polymeraset skadas. **OBS! Var försiktig, så att du inte bränner fingrarna!**
- b För över röret samt stället till vattenbadet som håller 55°C och låt det vara där *exakt* 30 sekunder.
- c För slutligen över röret samt ställ till vattenbadet som håller 72°C och låt det vara där *exakt* 30 sekunder.
- d Upprepa steg a–c så att 30 cykler utförs. (Om tiden medger utförs 35 cykler, eftersom detta ger bättre resultat).
- e Håll slutligen röret i det 72°C vattenbadet under *exakt* 5 minuter. Detta gör att allt DNA blir dubbelsträngat igen.

Fig. 17ii



C Elektrofores av mtDNA

18 Gjut en elektroforesgel.

19 Sätt 10 µl av den mångfaldigade DNA lösningen (som innehåller Cresyl Rött 'loading dye') till en eller två av gelens brunnar.

20 Eventuellt kan man sätta 10 µl av en 1 kb DNA stege, som är innehåller Cresyl Rött 'loading dye', till ytterligare en brunn. Denna innehåller DNA fragment av känd storlek (en molekylär linjal), som det mångfaldigade DNA:t kan jämföras med.

**OBS! Ett alternativ till denna stege är att använda Lambda DNA, som är klivet med restriktionsenzymet Hind III.**

Fig. 18

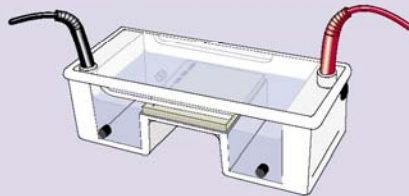


Fig. 19

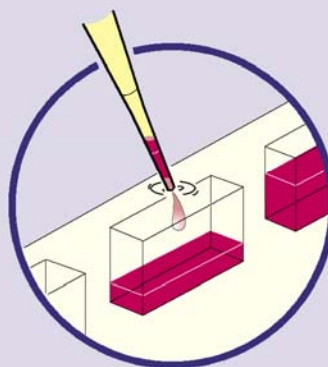
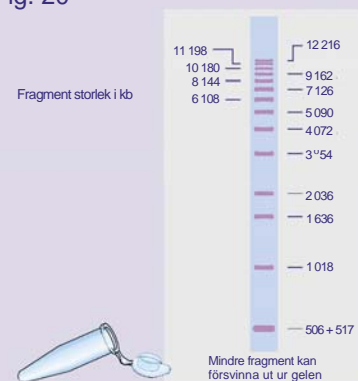


Fig. 20



21 Utför elektroforesen tills loading dye når ~10 mm från kanten av gelen (detta kan ta flera timmar; exakta tiden beror på den spänning man använder sig av).

22 Slå av spänningsaggregatet och färga gelen med Azur A lösning under *exakt* 4 minuter.

23 Håll av färgen, och låt de färgade DNA banden fram kallas. Beroende på gelens tjocklek kan detta ta mellan 20minuter och upp till 6 timmar. Det mångfaldigade DNA bandet syns alldeles bakom det rödfärgade bandet av 'loading dye'. Efter flera timmar kommer Azur A att diffundera genom gelen, så att DNA bandet kan ses tydligare.

*Obs: Ett svag band kan också vara synligt vid ändan av gelen. Detta orsakas av att primrar också mångfaldigas under processen (detta kallas 'primer dimer')*

Fig. 21

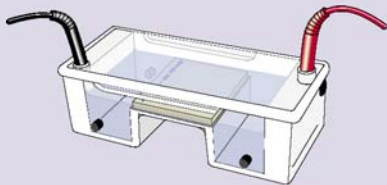
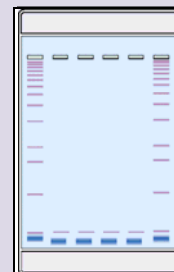


Fig. 22



Fig. 23



## Säkerhet

### Gott laboratorleuppträdande

- Följande säkerhetsregler skall följas för att minimera riskerna att allvarliga sjukdomar skall spridas:
- Tag inte med prover hemifrån eller från en okänd källa;
- Tag inte prov från någon som är sjuk eller som man vet har en smittsam sjukdom;
- Alla skall bära lämpliga skyddskläder t.ex. gummi- eller plasthandskar, skyddsglasögon och skyddsrock eller förkläde;
- Supernatanter och prov kan spolats ut genom laboratoriets vanliga avlopp;
- Alla skall tvätta händerna i slutet av laborationen;
- Förvara inte prover i en kyl eller i en frys, som används att förvara mat i.

### Hantering av prover

'Muntvättmetoden', som används för att isolera DNA ger flytande avfall; risken att sprida smittsamma sjukdomar är mycket mindre än vid hosta och snuva. Vidare minimeras risken att sprida smitta genom följande:

- Varje laborant arbetar endast med sitt eget prov;
- Provet steriliseras genom att det upphettas till kokning under 10 minuter;
- Laborationen innehåller inte något moment där man odlar upp provet, som skulle kunna göra att patogener växer;
- Prov och plastmateriel kastas efter experimentet.



### Vattenbad

Var försiktig vid hanterandet av det kokande vattenbadet. Det kan vara nödvändigt att använda pincetter för att lyfta centrifugrörsstället från vattnet och också att använda skyddshandskar.

### Agarogel

Smält agaros måste handhas med försiktighet, eftersom det kan åstadkomma brännskador om man får det på huden.

## Etiska förhållningssätt

### Samtycke och förtroende

Vid denna laboration kan frågor angående användningen av personliga genetiska data ställas. Till exempel:

- Vad används mitt DNA prov till?
- Säger min DNA typ något om mitt liv eller om min hälsa?

Ett mänskligt DNA prov skall endast göras om eleven ger sitt samtycke och han/hon förstår avsikten med försöket. Laborationen skall alltså förklaras innan den utförs och deltagarna skall ha möjlighet att avstå från laborationen. Lärare kanske vill att föräldrar ger ett skriftligt godkännande, om eleven är under 18 år.

DNA proven får endast användas i det syfte som uppgetts. Alltså skall DNA proven kastas efter laborationens slut. (Muncellsprov är inte heller stabila vid lagring under längre tid.)

Alla elevernas mtDNA kommer att ge identiska mönster på elektroforesgelen - vid laborationen framkommer därför inte heller några personliga data.

## Appendix

### Förberedelser

Om vatten bad används vid manuell cykling, så måste de vara förvärmade. Det är ibland svårt att hålla temperaturer nära kokning (vissa typer värmer inte vattnet till denna höga temperatur). Ett alternativ kan då vara att använda en bågare med kokande vatten. Var då noga med, att inte överhetta reaktanterna, eftersom detta kan resultera i att Taq-polymerasets aktivitet förstörs eller reduceras. God organisation (dvs, en elev kontrollerar tiden, medan de andra för över rören mellan vattenbaden) är nödvändig för att lyckas med manuell cykling.

### Tidsplan

Denna aktivitet tar omkring 90 minuter, plus preparation, körning av elektroforesen samt färgning av gelerna. Man kan förvara PCR-produkten i en frys och köra elektroforesen vid senare tillfälle.

Agarogeler kan gjutas medan DNA provet mångfaldigas i PCR apparaten.

### Felsökning

Det är inte tillrådligt att äta eller dricka under åtminstone en timme innan man skall isolera mtDNA, eftersom detta kan göra att man förlorar många lösa celler från munslemhinnan.

Det kan också vara bra att svälja en gång innan man börjar munsköljningen, så att man blir av med överskottssaliv i preparationen.

### Ytterligare undersökningar

Tyvärr är det mycket lite man kan vinna på att ändra i ovanstående protokoll. De flesta variationer (t.ex. ändring av vattenbadens temperatur eller ändring av tider) kommer troligen bara att resultera i misslyckade mtDNA mångfaldiganden eller i ett icke specifik mångfaldigande (primers kan då binda vid felaktiga positioner — detta syns då som en DNA-smet i stället för ett distinkt band på gelen). Eftersom materialet till denna typ av laboration är relativt dyrt, så är troligen också ett fritt experimenterande utanför laborationens ramar inte genomförbart i en skola.

Det finns emellertid numera relativt billiga PCR preparationer tillgängliga (med det menas; olika blandningar av dNTPs, Taq polymeras och MgCl<sub>2</sub>). En jämförelse mellan dessa kan vara av intresse för vissa skolor.

### Avfallshantering och återcyklning av material

Munprover och plastmaterial som är kontaminerat med saliv etc skall först läggas i en lösning med lämpligt desinfektionsmedel. Plastföremål bör sedan tvättas innan de kastas — pipettspetsar och centrifugrör som är gjorda av polypropylen kan återvinnas men bör inte återanvändas.

All övrig utrustning kan kastas bland vanliga sopor.

### Förvaring av material

Tillverkarnas eller återförsäljarnas instruktioner skall följas. Mångfaldigat DNA kan förvaras fruset vid -20°C under flera veckor, men bryts ner vid alltför lång förvaring.

### Ytterligare läsning

Mullis, K.B. (1990) The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American* 262 (4) 36–43.

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

*Historical study of the development of the PCR.*

Willmott, C. (1998) An introduction to the polymerase chain reaction. *School Science Review* 80 (290) 49–54.

Betsch, D. and Berard, J. (1999) D1S80 PCR with the \$25 thermal cyclers. *Biochemical Education* 27 (1) 45–47.

*The seven daughters of Eve* by Bryan Sykes (2002) Corgi, London. ISBN: 05 5214 876 8. *Popular account of the use of mitochondrial DNA in anthropology.*

## Webb sidor

Making PCR. Key documents describing the development of PCR.

<http://sunsite.berkeley.edu/pcr>

Cold Spring Harbor Laboratory's Dolan DNA Learning Center

Animated simulations of PCR, cycle sequencing etc.

<http://vector.cshl.org>

More information about PCR can be obtained from the Weizmann Institute's authoritative *BioGuide*:

<http://bioinformatics.weizmann.ac.il/mb/bioguide/pcr/>

contents.html

## Primer preparation

### Mitokondrie DNA primer/'Loading dye' mix

*Blir tillräckligt för 50 PCR reaktioner.*

*Kan förvaras fruset i upp till ett år.*

645 µl av sterilt, destillerat vatten  
60 µl av Cresyl Red loading dye  
10 µl av primer [15 pmol/µl]

Vortexa ovanstående ingredienser så att de blandas väl.

OBS: Det är nödvändigt att justera dessa volymer för primers som kommer i en concentration annan än 15 pmol/µl.

### Mitokondrie DNA kontroll regionens primer sekvenser

5'-TTAACTCCACCATTAGCACC-3'

5'-GAG GATG GTG GTCAAG G GAC-3'

## För gelelektroforesen

### TBE (Tris-Borat-EDTA) buffert, pH 8.5

*Denna buffert används till agarosgeler och som elektroforesbuffert*

Receptet ger 1 l av en koncentration som skall spädas 10x innan användning

Kan förvaras under obegränsad tid vid rumstemperatur

- 1 g natriumhydroxid
- 108 g Tris (hydroxymetyl) aminometan (Tris-bas)
- 55 g Borsyra
- 7.4 g Etylendiamintetraättisyra (EDTA, dinatriumsalt)

Rör ner ovanstående kemikalier i 700 ml avjoniserat eller destillerat vatten. Rör om så att det löses. Fyll därefter på med avjoniserat eller destillerat vatten till totalvolym 1 l. *Observera: Denna lösning är koncentrerad och skall spädas med 9 volymer vatten innan den används.*

### Cresyl red 'loading dye'

*Används till att ladda DNA fragment i elektrofores gelen*

Blir 50 ml  
Förvaras vid rumstemperatur

- 0.1 g cresyl red
- 17 g sackaros
- 50 ml sterilt destillerat vatten

Blanda ovanstående ingredienser.

### Agaros gel

*Används till separation av små fragment av nukleinsyror*

Receptet ger 100 ml 1.5 % agaroslösning

Kan förvaras under obegränsad tid vid rumstemperatur

- 1.5 g DNA elektrofores-grade agaros
- 100 ml TBE buffert (1x)

Sätt agarospulvret till TBE bufferten. Värm i kokande vattenbad eller i mikrovågsugn så att agarosen löser sig. Mindre än 1 minut vid 940 W effekt är tillräckligt för att smälta 100 ml agarosgel. Det kärl som används för den smälta agarosen får inte vara förslutet, men lätt täckt av en plastfilm, som man har gjort ett eller ett par små hål i. Skaka försiktigt på kärlet när man värmt ungefär halva tiden, så att agarosen är väl blandad. Tillsätt destillerat vatten som ersättning för det som avdunstat. Smält agaros kan förvaras i detta tillstånd i ett vattenbad på 55–60 °C. Kontrollerar att agaroslösningen är väl blandad innan gelen gjutes.

### FÖRSIKTIGHET!

Varms, smält agaros kan skälla huden och måste därför hanteras med försiktighet. Det kan vara bra att låta agarosen kylas av något, så att den är lätt att hantera, innan man gjuter gelerna.

### Azur A

*Färglösning för nukleinsyror*

Receptet ger 50 ml av 2x användarkoncentrationen

Kan förvaras under obegränsad tid vid rumstemperatur

- 0.08 g Azur A
- 50 ml etanol (40% etanol i vattenlösning)

Tillsätt Azur A i fast form till 50 ml 40% etanol. Rör om så att det löses.

### FÖRSIKTIGHET!

Den koncentrerade DNA färgen kan lätt antändas och får inte ställas i närheten av en öppen låga eller på annan plats där det finns risk för gnistbildning. Färgflaskan måste vara försluten för att förhindra avdunstning. När man spätt ut färglösningen till den koncentration som används vid färgning (dvs 0.04 % i 20 % etanol), finns det inte längre någon risk för antändning, men man skall givetvis vara försiktig så att man inte stänker färglösning i ögon eller på hud. Använd därför skyddshandskar och skyddsglasögon. Använd färg kan spädas ut med vatten och spolas ner i avloppet.