

Niels Bonderup Dohn

Danmarks Pædagogiske Universitetsskole
Aarhus Universitet
Institut for Didaktik
Tuborgvej 164
2400 København NV, Danmark

PCR med Lego Mindstorms

Hur man bygger en tämligen billig och programmerbar PCR-apparat med Lego-bitar.

Introduktion

Polymeras-kedjereaktionen (PCR) är en teknik som har många tillämpningar inom molekylärbiologin. PCR-principen innebär ett mångfaldigande (*amplification*) av en utvald bit DNA med hjälp av enzymer. DNA-biten kan vara en enkel gen, en del av en gen eller en icke kodande sekvens. Vanligen utförs PCR genom att man blandar *template*-DNA, *primers* (oligonukleotider), värmestabilt DNA-polymeras (*Taq*), de fyra deoxynukleosidtrifosfaterna (dNTP) och reaktionsbuffert i ett PCR rör. PCR-processen omfattar en serie av upprepade cykler, vardera bestående av följande tre steg: (1) Denaturering, dvs separation av DNAs två strängar (vid 90-94°C), (2) Hybridisering (*annealing*), då *primers* binder till de två *template*-DNA strängarna (vid 50-60°C), (3) DNA-syntes, då *Taq*-polymeras förlänger den komplementära DNA-strängen med startpunkt från en *primer* och den slutliga kopian av DNA-dubbelsträngen bildas (vid 72°C, när *Taq*-polymeras är effektivast). PCR produkterna analyseras därefter med hjälp gelelektrofores och färgning.

Det är inte alltför ovanligt att man idag utför PCR i gymnasiets biologiundervisning, detta tack vare att det finns undervisningskit att köpa från olika firmor (t ex NCBE och BioRad). I undervisningen sker PCR-reaktionen vanligen genom att man utgår från en rättsmedicinsk berättelse, som eleverna kan känna igen från TV-serier som CSI: Crime Scene Investigation. Tanken är att eleverna utför en mycket enkel PCR-analys, varefter de kan lösa fallet [1-2]. Elever finner ofta att rättsmedicinska problemställningar från verkliga livet är mycket motiverande. På Internet kan man hitta webbsidor från bl a amerikanska FBI och brittiska FSS med verkliga exempel på mord och våldtäkter som klarats upp med hjälp av PCR och DNA-profilanalys [3-4].

För många lärare kan det emellertid vara svårt att arbeta med PCR om skolan inte har en PCR-apparat (en PCR-apparat är i princip bara ett programmerbart värmeblock). Manuell PCR kan utföras genom att placera PCR-rören i en hållare som kan flyta och som man för mellan tre vattenbad med de temperaturer som motsvarar de tre stadierna i PCR-cykeln.

Korrespondens:
E-post: Bonderup.dohn@mail.dk

Detta var den procedur man använde sig av i början [5]. Metoden är emellertid så oinspirerande att utföra att det är stor risk att eleverna gör misstag. Alternativt kan man konstruera en PCR-robot med hjälp av robot-kittet: Lego Mindstorms. Jag presenterar i följande text en PCR-robot, som jag har byggt av ett set av Lego Mindstorms NXT 2,0, nr 8547, kompletterat med en handfull Lego Technic-klossar. Meningen är att visa att det är möjligt att bygga en pålitlig PCR-robot med Lego. Se figur 1.



Fig 1. PCR-robot byggd med Lego Mindstorms och ett vattenbad.
Foto: J-O Strömberg.

Lego Mindstorms

Lego Mindstorms NXT 2,0 är ett avancerat robot-kit som utvecklats av Lego och MIT Media Lab. Det finns i två versioner, antingen ett (Set #8547) som säljs i detaljhandeln, eller ett annat (Education Base Set #9797), som säljs genom Lego Education. De kan också köpas på Internet (se under "Inköpsställen"). NXT är en klossformad mikrodator, som kan ta emot impulser från upp till 4 sensorer och kontrollera upp till 3 motorer via RJ12 kablar.

Detaljhandelkittet, #8547, innehåller förutom mikrodatorn, tre interaktiva servomotorer, en ljussensor med trippelfunktion (skiljer mellan färg, ljussättning och kan fungera som en lampa), en ultraljudsensor, två trycksensorer, 1 USB 2.0 kabel, 7 RJ12 kablar i olika längder och över 600 Lego Technic element (Technic klossar, kuggjul, axlar, etc.). Mjukvaran MINDSTORMS 2.0 som har grafiskt gränssnitt, baseras på den professionella industrimjukvaran Lab VIEW från National Instruments. Mjukvaran gör det lätt att bygga program och att ladda ner dem till NXT via Bluetooth eller USB kabel.

Det har nyligen blivit möjligt att förbinda Lego Mindstorms med över 30 Vernier sensorer med hjälp av en adapter (köps separat från Lego Education eller Vernier Software & Technology) [6].

Idé, design, programmering

Lyckad PCR beror huvudsakligen på överföring av värmeenergi till innehållet i PCR-röret och tiden mellan två temperaturer, den så kallade *ramp time*. Kvalitativt är PCR i vattenbad oöverträffat, eftersom en flytande värmekälla utgör det snabbaste sättet att ändra temperaturen. Lego-roboten utgörs av en roterande bas med höj- och sänkbar arm, som flyttar en provrörshållare med 32 stycken 0,5 ml PCR-rör mellan tre vattenbad med temperaturer som motsvarar de tre stadierna i en PCR-cykel. Denna robotdesign fordrar att robotarmen måste vara lätt men ändå stabil.

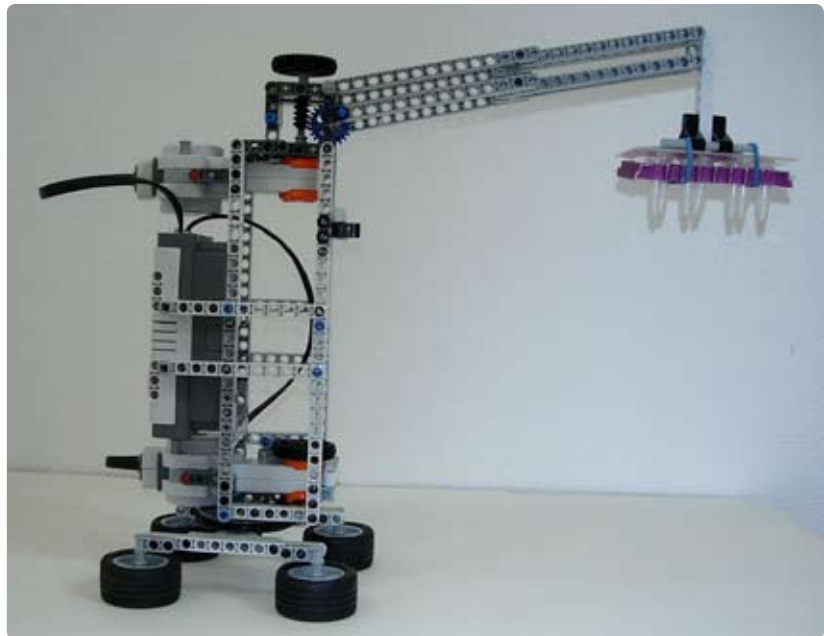


Fig 2. PCR-robot med eppendorfställ byggt av en pipettspetsbox.
Foto: J-O Strömberg.

Roboten är monterad med dubbla kugghjul på motorerna, som gör det enkelt att ställa in robotarmen noggrant i förhållande till vattenbadens position och till vattennivån (figur 2, ovan). Legos Kundservice rekommenderar att Lego bitarna inte utsätts för hett vatten (max. 40°C). Våra egna test har visat att bortsett från en liten avfärgning, kan bitarna klara en kort exponering i 94°C vatten. PCR-rören placeras i ett lättviktigt provrörställ, som är utskuren ur en pipettspetsbox, t ex Gilson P1000 (eller motsvarande av ett annat märke).

En platta, som håller rören på plats med hjälp av klämmor eller gummisnoddar, är utskuren från locket på pipettspetsboxen. (Se figurer 3 och 4).

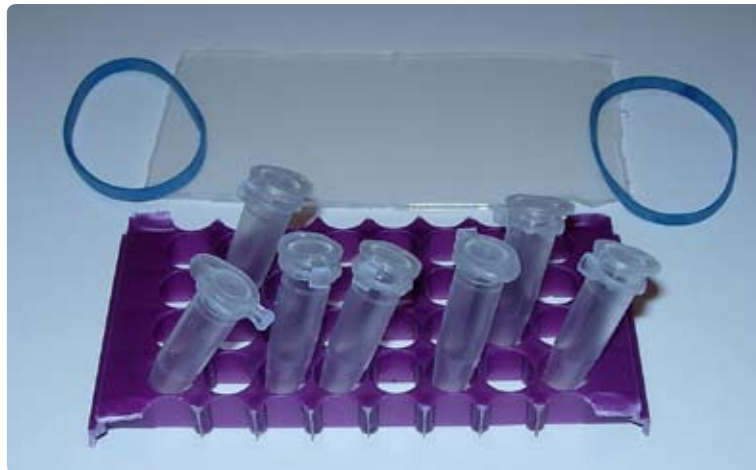


Fig 3. PCR-stället med eppendorfrör. Bilden visar delarna som PCR-stället byggs upp av. Foto: J-O Strömberg.

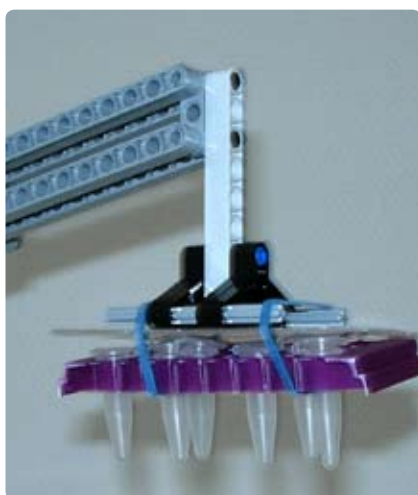


Fig 4 PCR-stället som hänger i robotarmen. Foto: J-O Strömberg.

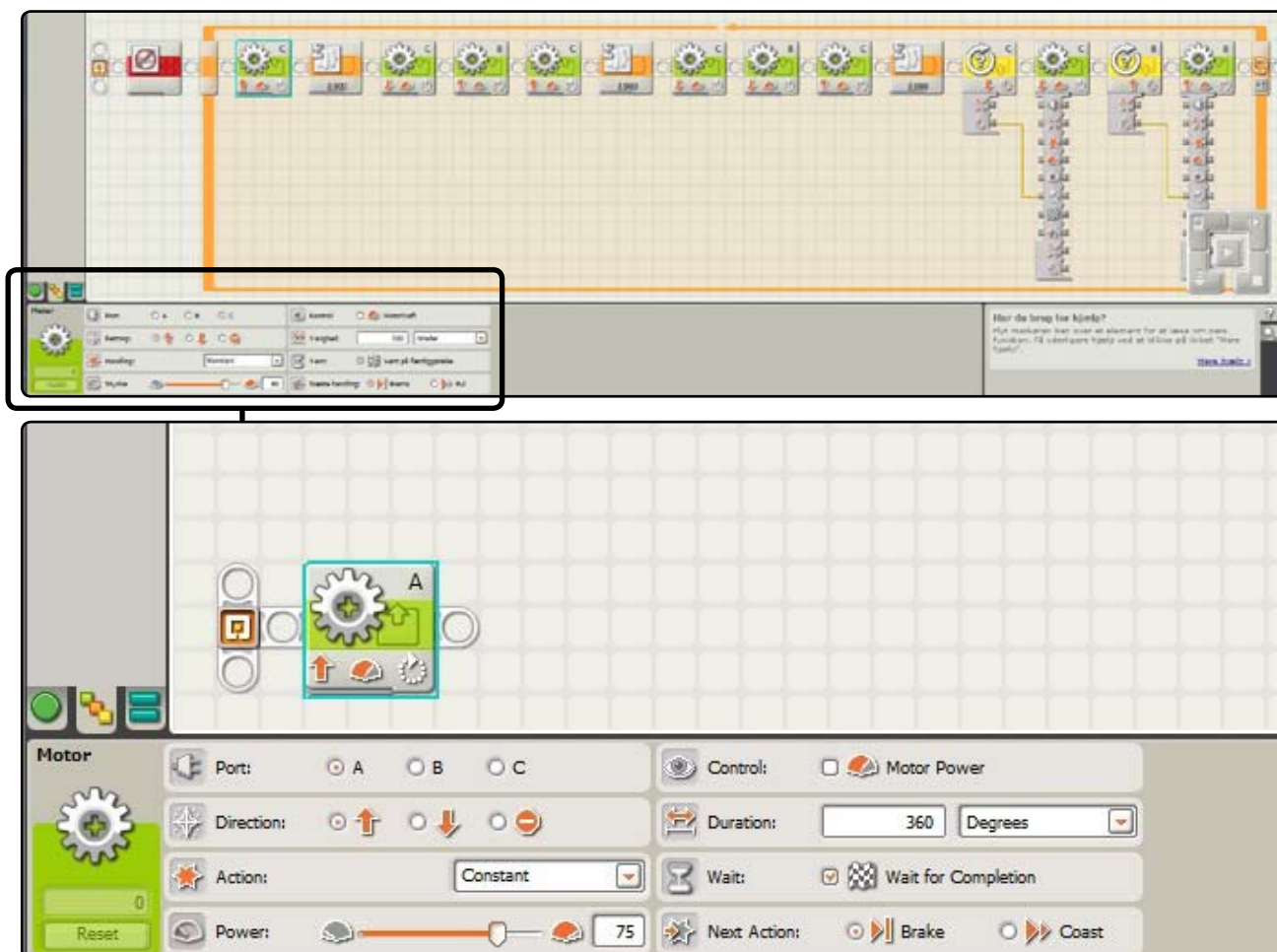
Plattan förhindrar att rören flyter ut från stället och håller PCR rörens lock stängda. Det är därför inte nödvändigt att använda PCR-rör med skruvlock. Fördelarna av att använda en pipettspetsbox är dess låga vikt, som reducerar den kraft som roboten måste använda och boxens tolerans för höga temperaturer (boxen kan autoklaveras).

Programmeringen är enkel. Genom att dra "Move" och "Wait" blocken från Huvudpanelen och släppa dem på programstången, kan parametrar ställas in för vart och ett av blocken via Programpanelen i det nedre vänstra hörnet av skärmen (Se figurer 5 och 6 följande sida).

Motorerna har många alternativ, inklusive hur snabbt de snurrar (kraft) och hur länge de snurrar (varaktighet). Hur länge motorn skall snurra ställs in i antalet varv – inte i sekunder (när batterierna börjar ta slut blir motorrörelsen långsammare). NXT Brick-datorn har ett inbyggt system, som automatiskt stänger av roboten efter en viss tid även om ett program fortfarande står på. Denna "Sleep timer" är inbyggd i NXT datorn och kan hjälpa till att spara batterier.

När man kör en PCR är det nödvändigt att sätta NXT's "Sleep mode" på "Never", alternativt, på "Sleep mode" på 30 minuter, och placera ett "Keep Alive" block i PCR programmets programslinga. På detta sätt kommer NXT att stängas av när mångfaldigandet av DNA är slutfört.

Fig 5 och Fig 6. Bilderna visar Sequence Beam (Fig. 5) och Move Block (Fig. 6). Sequence beam kontrollerar programflödet. Block som är kopplade till Sequence beam kan laddas ner till NXT; de som inte är kopplade kan inte laddas. Kontrollpanelen i nedre vänstra hörnet av bilden visar olika alternativ för inställning av motorn. (port, direction, action, power, control, duration, wait, and next action). Programmeringen utförs genom att ställa in de önskade valen. Foto: N. Bonderup Dohn.



Test

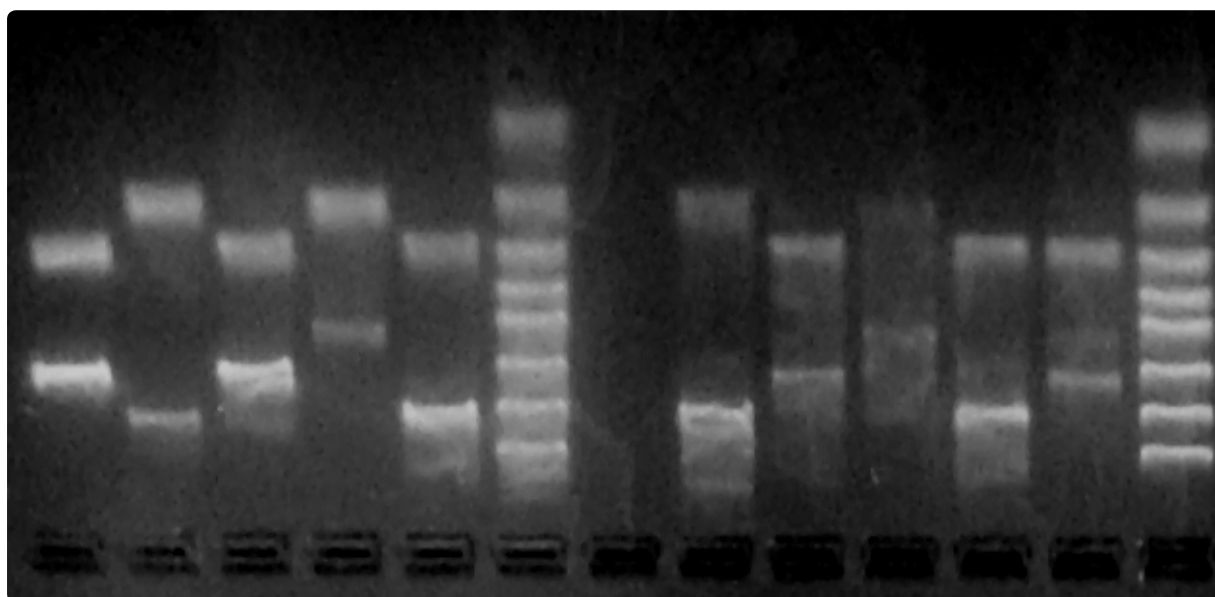
PCR roboten har testats på Molekylärbiologiska Institutionen, Aarhus Universitet. Det testades med kittet Crime Scene Investigator PCR Basics Kit (BioRad catalog No. 166-2600EDU), med vilket man kan simulera DNA-profilering. DNA-profilering används ofta i kriminallaboratorier. DNA-proven som finns i detta kit är plasmider som har framtagits för att likna storleken av TH01 alleler, vilket resulterar i PCR-produkter i storlekar från 200 till 1000 bp. TH01 locus är en polymorf mikrosatellit-region som är lokaliserad i den första intronen av tyrosin-hydroxylas genen. Denna repetitiva icke kodande tetranukleotid DNA-sekvens innehåller fem upprepningar av [TCAT] [7].

Innan testet utfördes kalibrerades tre vattenbad till 52°C, 72°C och 94°C. Reaktionskomponenterna blandades som tidigare beskrivits i "Introduktionen" genom att tillsätta primers till blandningen av nukleotidtrifosfat (dNTP), buffert och *Taq* DNA-polymeras – den s k Master-mixen. *Template*-DNA tillsattes så följande slutkoncentrationer erhöles: 0,025 units/ μ l *Taq*-polymeras, 0,8 mM dNTP och 0,5 μ M av vardera primer. Någon mineralolja tillsattes inte (används för att förhindra avdunstning) eftersom det inte var nödvändigt. Hälften av PCR-rören sattes i PCR-roboten, och den andra hälften i en professionell PCR-apparat. (Primus 96 MWG-Biotech som jämförelse).

Båda apparaterna programmerades på likartat sätt: en denatureringsstart vid 94°C under 2 minuter, en 3-stegscykel, som upprepades 35 gånger (denaturering vid 94°C under 30 sekunder, hybridisering vid 52°C under 30 sekunder, DNA-syntes vid 72°C under 1 minut) och slutligen en DNA-syntes vid 72°C under 10 minuter. Roboten avslutade processen genom att lyfta upp PCR-rören ur vattenbadet. Det visade sig att robotens *ramp time* var kortare än för den professionella PCR-apparaten (processen avslutades 10 minuter snabbare i roboten än PCR-apparaten). Billiga PCR-apparater som används i undervisning, som inte har ett inbyggt kylsystem, har ännu längre *ramp time* (typisk uppvärmning 2,5°C/sek och kylning 1,5°C/sek). Detta är mycket längre än de cirka 5 sekunder det tog för PCR-roboten att föra prov från ett bad till ett annat.

Fig 7. Bild på gel. Rad 1-5 från vänster visar resultaten för "Crime scene DNA" och "Suspects DNA" som tagits fram med PCR-roboten, medan raderna 7-11 visar resultaten som tagits fram med Primus 96 apparaten. Raderna 6 och 12 visar band från storleksmarkören (1500, 1000, 700, 500, 400, 300, 200 och 100 bp). Foto: N. Bonderup Dohn.

PCR-proven analyserades därefter med hjälp av gelelektrofores (3% agarosgel innehållande 0,05 μ g/ml etidiumbromid). Etidiumbromid användes för att erhålla bästa möjliga fotografiska resultat. Figur 7 visar gelen med resultaten både från PCR-roboten och PCR-apparaten efter PCR-processen. Som framgår av bilden är det ingen skillnad mellan rad 1-5 och rad 7-11 (bortsett från numreringen av PCR-proven). Testet har därmed visat att Lego-roboten ger lika pålitliga resultat som en professionell PCR-apparat.



Diskussion

Syftet med artikeln har varit att visa att det är möjligt att konstruera en pålitlig PCR-apparat med Lego. Roboten är lätt att bygga, programmera och använda. En ytterligare fördel med att använda Lego Mindstorms till att bygga en PCR-robot är att kittet också kan användas för andra ändamål. En bygginstruktion för PCR-roboten finns som .lxf-file (Lego Digital Designer-file) och pdf-fil. Lego Digital Designer kan laddas ner gratis från hemsidan [8]. Efter nedladdningen kan .lxf-filen öppnas och användas som guide för byggandet av roboten. Observera att den aktuella designen kräver ett antal extra Lego Technic byggdelar, som inte finns i modellen # 8547. Dessa delar kan köpas separat från "Brick Link" eller från Legos kundservice (se nedan).

Dessutom kan PCR-programmet för BioRad amplification profil laddas ner, öppnas i Mindstorms mjukvara, och anpassas efter behov. Observera att PCR-roboten byggs så att storleken avpassas till vattenbadet. Om man har större vattenbad är det kanske bättre att utforma PCR-roboten som en bockkran (travers). PCR-roboten kan också utrustas med data logging (Vernier NXT adapter och temperatursensor) för att mäta den verkliga temperaturprofilen vid PCR-analysen. Detta fordrar emellertid Mindstorms 2.0 Education mjukvara, som kan köpas från Lego Education. Roboten har demonstrerats vid några lärarkurser. Feedback från lärare visar att det är en motiverande utmaning för elever att konstruera en PCR-robot och testa dess tillförlitlighet genom att köra PCR baserad DNA-profilering. Design och programmering behöver inte vara lärarens ansvarighet, utan kan givetvis utföras av elever. Flera studier har visat att arbetet med Lego-robotar har starkt motiverat elever samt att de utvecklat problemlösande strategier [9-12]. Dessutom är Lego-robotar ett lämpligt medium att utforska maskinteknik med gymnasieelever [13]. Seymour Paperts arbete, som understödde användningen av Lego konstruktioner i kombination med programmering visar, att elever som lärt sig via robotar har utvecklat förståelse inom matematik, liksom problemlösande kreativitet i allmänhet [14].

Referenser

- [1] Lounsbury, K.M. (2003) Crime scene investigation – an exercise in generating and analyzing DNA evidence. *Biochemistry and Molecular Biology Education* 31(1), 37-41
- [2] McNamara-Schroeder, K., Olanon, C., Chu, S., Montoya, M.C., Alviri, M., Ginty, S. and Love, J.J. (2006) DNA fingerprint analysis of three short tandem repeat (STR) loci for biochemistry and forensic science laboratory courses. *Biochemistry and Molecular Biology Education* 34(5), 378-383
- [3] Federal Bureau of Investigation (FBI) forensic: <http://www.fbi.gov/hq/lab/codis/fbidna.pdf>
- [4] Forensic Science Service (FSS): <http://www.forensic.gov.uk/html/media/case-studies/>
- [5] Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F.A., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354

- [6] Vernier Software & Technology:
<http://www.vernier.com/nxt>
- [7] Budowle, B., Chakraborty, R., Giusti, R., Eisenberg, A. and Allen, R. (1992) Analysis of the VNTR locus D1S80 by PCR followed by high-resolution PAGE. *American Journal of Human Genetics* 48, 137-144
- [8] Lego Digital Designer: <http://ldd.lego.com/>
- [9] Resnick, M., Berg, R. and Eisenberg, M. (2000) Beyond Black Boxes: Bringing transparency and aesthetics back to scientific investigation. *The Journal of the Learning Sciences* 9(1), 7-30
- [10] Barker, B.S. and Ansorge J. (2007) Robotics as means to increase achievement scores in an informal learning environment. *Journal of Research on Technology in Education* 39(3), 229-243
- [11] Bergen, D. (2001): Learning in the robotic world: Active or reactive? *Childhood Education* 77(4), 249-250
- [12] Mauch, E. (2001): Using technological innovation to improve the problem-solving skills of middle school students: Educators' experiences with the LEGO Mindstorms Robotic Invention System. *Clearing House* 74(4), 211-214
- [13] Levien, K. and Rochefort, W. (2002) Lessons with LEGO - Engaging students in chemical engineering courses. In *Proceedings of the 2002 American Society for Engineering Education Annual Conference and Exposition*, Oregon State University, Oregon. American Society for Engineering Education
- [14] Papert, S. (1991) Situating constructionism. In *Constructionism*, eds. Harel, I. and Papert, S. pp., New Jersey: Ablex Publishing Corporation

LEGO-hemsidor

Lego Mindstorms NXT officiella hemsida:

<http://www.mindstorms.lego.com>

Lego Educations officiella hemsida:

<http://www.lego.com/education/>

<http://shop.lego.com/ByCategory/Leaf.aspx?cn=389&d=292>

Internetåterförsäljare

Amazon.co.uk

http://www.amazon.co.uk/s/ref=nb_ss_w_h?url=search-alias%3Daps&field-keywords=lego+mindstorms

Amazon.de

http://www.amazon.de/s/ref=nb_ss_w?__mk_de_DE=%C5M%C5Z%D5%D1&url=search-alias%3Daps&field-keywords=lego+mindstorms

Saknade LEGO-bitar till PCR-roboten

Nedanstående bitar måste skaffas och finns i bygginstruktionen på angivna bildnummer.

.lxf-file	Lego	Lego	
Bildnr	Artnr	Namn	Antal
1/93	48452cx1	Technic, Turntable Large Type 2	1
2/93	33299	Technic, Liftarm 1x3 with 2Axle Holes and Pin/Crank	2
30/93	32291	Technic Axle and Pin Connector	1
60/93	3648	Technic, Gear 24 Tooth	1
70/93	4716	Technic, Gear Worm Screw	1
77/93	41677	Technic Liftarm 1x2 Thin	4
88/93	2905	Technic, Liftarm Triangle Thin	4
93/93	3647	Technic, Gear 8 Tooth	1
	32278	Technic, Liftarm 1x15 Thick	10

Dessa bitar kan köpas från "Brick Link":

<http://www.bricklink.com/catalogSearch.asp?v=C>.
Klicka på varunumret och därefter på "search now!"

Bitarna kan också köpas från Lego Kundservice:

<http://us.service.lego.com/en-GB/replacementparts/default.aspx>

eller:

<http://service.lego.com/en-GB/Contactus/default.aspx>