

Gjelder:	Elevoppgave for VGS	Emne:	Laboratorieuka 2009, BIO2	Dato:	13.02.2009
Fag:	BIO2			Side:	Side 1 av 6
Ansvarlig:	Heidi Engstrøm Gro Hagen Elin Stavdal				

Crime-Scene

Fredag 13.02.09 var det innbrudd på gateplan ved Høgskolen i Ålesund. En rute er knust og det er mye rot på stedet. Politiet er tilbakeholdne med informasjon, men bekrefter at de har tips om mulig motiv og gjerningsperson. Ubekreftede kilder sier at det foregår topphemmelig forskning ved Institutt for biologiske fag og det spekuleres i om dette var målet for tyvene. Det er fra politiets side kalt inn spesial ekspertise til å gjennomføre DNA analyse av spor som er funnet på åstedet.

Åstedsbilder:



Etterforskere sikrer spor



Institutt for biologiske fag (IBF) sine ansatte følger åstedsgrensningen

Gjelder:	Elevoppgave for VGS	Emne:	Laboratorieuka 2009, BIO2	Dato:	13.02.2009
Fag:	BIO2			Side:	Side 2 av 6
Ansvarlig:	Heidi Engstrøm Gro Hagen Elin Stavdal				

CSI-case (Crime-Scene-Investigation)

Restriksjonsenzym-kutting av DNA fra mistenkte

Gel-elektroforese av restriksjonsfragmentene for identifikasjon av mistenkt

"DNA-fingermerke blir nå brukt rutinemessig for å løse forbrytelser. I de siste årene har man ofte sett i nyhetene at forbrytelser, selv begått år tilbake i tid, har blitt løst ved hjelp av DNA-teknologi. DNA-teknologi har også blitt brukt for å utelukke mistenkte fra en forbrytelse. Disse analysene utføres i hovedsak av Rettsmedisinsk institutt, som er et institutt ved Universitetet i Oslo. Det vokser stadig opp nye bioteknologibedrifter som utfører slike analyser. Her ved Høgskolen er det to studieretninger som har bioteknologi som fag; Bioingeniør og Marin Bioteknologi (ved Institutt for Biologiske Fag)."

HENSIKT:

Denne øvelsen skal demonstrere bruk av spesifikke endonukleaser (restriksjons-enzymmer) til kutting av DNA. Gelelektroforese skal benyttes for å separere DNA-fragmentene etter størrelse og senere visualiseres de med en fargeløsning som heter **Fast Blast Stain**. Øvelsen skal også demonstrere hvordan teknikken kan få fram et DNA-fingermerke.

I denne øvelsen skal 6 ulike prøver av plasmid-DNA analyseres. En prøve er tatt fra en hypotetisk "Crime-scene" (åsted) og 5 av prøvene er hentet fra såkalte "mistenkte". De "mistenkte" skal kuttes med to ulike restriksjonsenzym, *EcoRI* og *PstI*.

TEORI:

Restriksjonsenzymmer fungerer som molekylære "sakser" som kutter spesifikke basesekvenser på DNA'et.

EcoRI gjenkjenner og kutter følgende:

```
5'.....G↓AATT C.....3'
3'.....C TTAA↑G.....5'
```

PstI gjenkjenner og kutter følgende:

```
5'.....CTGCA↓G.....3'
3'.....G↑ACGTC.....5'
```

Et restriksjonsenzym fester seg til DNA molekylet og jobber seg oppover helixen til det finner den aktuelle basesekvensen (restriksjonssetet) og kutter DNA-tråden der. Hvis den samme basesekvensen gjentar seg på DNA-tråden, så vil restriksjonsenzymene også kutte tråden der. Dette gir mange ulike fragment, med ulik størrelse.

Agarosegelen separerer DNA-fragmentene etter størrelse. DNA-fragmentene er negativt ladd og vil vandre mot den positive polen i elektroforesekaret. Agarosegelen består av et nettverk av polymerer som hindrer fragmentene i å vandre raskt gjennom gelen. Jo mindre et fragment er, jo raskere vil det vandre i gelen. Så de minste fragmentene vandrer lengst og de lengste fragmentene kortest.

Gjelder:	Elevoppgave for VGS	Emne:	Laboratorieuka 2009, BIO2	Dato:	13.02.2009
Fag:	BIO2			Side:	Side 3 av 6
Ansvarlig:	Heidi Engstrøm Gro Hagen Elin Stavdal				

Hver enkelt person har likheter og ulikheter i DNA sekvensen. Ved å kutte DNA'et med restriksjonsenzym, er det mulig å få fram et unikt mønster i agarosegelen for hver enkelt person. Enkelte folkegrupper har mer lik DNA' sekvens enn andre grupper. Det er da ikke like enkelt å bruke DNA' teknologi til å skille en person fra en annen.

DNA' materialet kan hentes fra blod, hår, vev, sæd etc. DNA' analysene kan også hentes fra tørt materiale, som inntørket blod, eller mumifisert vev.



Materialer:

1. Crime-scene-DNA
2. Mistenkt 1-DNA
3. Mistenkt 2-DNA
4. Mistenkt 3-DNA
5. Mistenkt 4-DNA
6. Mistenkt 5-DNA
7. *EcoRI/PstI*, restriksjonsenzym-mix
8. Sterilt vann
9. *HindIII* lambda digest (DNA)-markører, 0,2µg/µl
10. DNA sample loading dye
11. Fast blast DNA stain, 500×
12. Fargede mikro test tubes
13. Klare mikro test tubes
14. Agarose
15. Elektroforesebuffer, 50×TAE
16. Automatpipetter m/pipettespisser
17. Elektroforeseutstyr
18. Vannbad eller inkubator på 37°C
19. Mikrosentrifuge

Gjelder:	Elevoppgave for VGS	Emne:	Laboratorieuka 2009, BIO2	Dato:	13.02.2009
Fag:	BIO2			Side:	Side 4 av 6
Ansvarlig:	Heidi Engstrøm Gro Hagen Elin Stavdal				

FRAMGANGSMÅTE:

Bruk av automatpipetter

I denne øvelsen skal vi bruke automatpipetter, og vi skal pipettere veldig små volumer. Dette krever en spesiell pipette-teknikk;

1. Innstill ønsket volum. NB: Ikke still inn et volum utenfor pipettens område. Det kan ødelegge pipetten.
2. Sett på pipettespiss. Trykk den fast med en liten vridning.
3. Trykk inn knappen til *første stopp*.
4. Stikk pipettespissen ned i væsken og sug langsomt inn.
5. Ta opp pipetten.
6. Se etter at den inneholder væske, og at det ikke henger væske på utsiden.
7. Sett pipettespissen ned i reagensrøret. Hold det mot rørvæggen
8. Trykk knappen ned til *andre stopp*.
9. Ta ut pipetten. Se etter at væsken henger igjen i røret, og ikke henger igjen på pipettespissen.
10. Væskedråpene i røret sentrifugeres til bunns, blandes med "knipsing" og sentrifugeres igjen.

1. Kutting med restriksjonsenzymmer (enzym må oppbevares på is under hele forsøket)

1.
 - a) Grønt rør merkes CS (crime-scene)
 - b) Blått rør merkes M1 (mistenkt 1)
 - c) Oransje rør merkes M2 (mistenkt 2)
 - d) Lilla rør merkes M3 (mistenkt 3)
 - e) Rødt rør merkes M4 (mistenkt 4)
 - f) Gult rør merkes M5 (mistenkt 5)

NB! Merk også rørene med navnet ditt og dato.

2. Tilsett 10µl av hver DNA-prøve til hvert sitt tilhørende rør. Bruk ny pipettespiss for hvert rør for å unngå forurensning!!! Forsikre deg om at dråpen ligger igjen i bunnen av røret!
3. Tilsett 10µl enzym-mix (merket ENZ) til hvert rør med DNA-prøve. Bruk ny pipettespiss for hvert rør for å unngå forurensning! Tilsett enzymløsning ned i bunnen av røret!
4. Lukk igjen lokket på hvert rør og bland ingrediensene ved å flikke på røret. Sett så rørene ned i en mikrosentrifuge og sentrifuger i 1 minutt.
5. Inkuber rørene ved 37°C i 45 minutter.

Gjelder:	Elevoppgave for VGS	Emne:		Dato:	13.02.2009
Fag:	BIO2	Laboratorieuka 2009, BIO2		Side:	Side 5 av 6
Ansvarlig:	Heidi Engstrøm Gro Hagen Elin Stavdal				

2. Støping av agarose-gel 1 %

Agarose 0,4 g
TAE-buffer (1x) 40 ml

1. Smeltes i mikrobølgeovn.
2. Avkjøles til 50 °C. (Hvis den ikke skal støpes med det samme kan den oppbevares ved 60 °C).
3. Gel-trau tettes med autoklav-tape. Kam settes på plass i ønsket posisjon. Agarosen tømmes opp i gel-trauet. La dette stå helt i ro til agarosen har stivnet.

3. Agarosegel-elektroforese

1. Fjern brønnekammen. Fjern tapen. Fyll elektroforesekaret med 1x TAE-buffer. Bufferen skal så vidt dekke gelen. Pass på at alle brønnene er fylt med buffer.
2. Prøvene tilsettes 5µl loading dye løsning (merket LD). Spinn ned prøvene på en mikrosentrifuge.
3. Brønn 1: Appliser 10µl DNA size marker
Brønn 2: Appliser 20µl CS (grønn)
Brønn 3: Appliser 20µl M1 (blå)
Brønn 4: Appliser 20µl M2 (orange)
Brønn 5: Appliser 20µl M3 (lilla)
Brønn 6: Appliser 20µl M4 (rød)
Brønn 7: Appliser 20µl M5 (gul)
4. Sett på lokket. Pass på polariteten. DNA har negativ ladning, og skal bevege seg mot +polen (rød pol).
5. Sett på spenning 50 Volt til blåfargen har vandret inn i gelen. Øk så spenningen til 100 Volt.
6. La elektroforesen gå til blåfargen har tilbakelagt ca 2/3 av gelen (ca en time, men kan forkortes)

4. Farging av gel

1. Hell 120ml 100× Fast Blast stain i et kar (2 geler pr kar).
2. Ta gelen ut av elektroforesekaret (pass på, den er glatt!), og legg gelen i karet med fargeløsning. La den ligge i ca 2 min. Rør på karet hele tiden!
3. Vask med rennende, varmt vann i 1min.
4. Legg gelen i et kar med varmt springvann i 5 min. Rør på karet underveis!
5. Bytt vann og gjenta trinn 4 en gang til.
6. Fotografer gelen

Gjelder:	Elevoppgave for VGS	Emne:	Laboratorieuka 2009, BIO2	Dato:	13.02.2009
Fag:	BIO2			Side:	Side 6 av 6
Ansvarlig:	Heidi Engstrøm Gro Hagen Elin Stavdal				

JOURNAL:

Mål vandringsslengden for de forskjellige fragmentene. Sammenlign med "Crime-scene-DNA", og bestem hvem av de mistenkte som er den skyldige.

(Hvis vandringsslengden framstilles mot logaritmen til molekylstørrelsen, skal det gi en tilnærmet lineær invers sammenheng).