

# Isolering af humant genomisk DNA

Af Niels Bonderup Dohn, Institut for Filosofi, Pædagogik og Religionsstudier, Syddansk Universitet, niels.bonderup.dohn@dig.sdu.dk  
og Jesper Bertram Bramsen, Molekylærbiologisk Institut, Århus Universitet, JEBB@mb.au.dk

Gymnasieelever er som regel meget interesserede i genteknologi. Deres umiddelbare interesse er dog ikke nødvendigvis vidensbaseret, men er ofte snarere en form for nysgerrighed over for en ny teknologi. For eksempel har den danske ROSE-undersøgelse ([www.dpu.dk/rose](http://www.dpu.dk/rose)) vist, at blandt 15 årige skoleelever er 58% af pigerne og 43% af drengene interesserede i at lære om hvordan genteknologi kan hindre sygdomme (Henrik Busch, pers. kom.). Ifølge Todt & Götz udvikles elevens interesse for genteknologi for alvor i 16 års alderen, og forfatterne har påvist at hvor pigerne mest er interesserede i de sociale og etiske aspekter ved genteknologi, er drengene mere interesserede i de økonomiske og tekniske sider (Todt & Götz, 1998). For mange elever, der for første gang møder genteknologi i gymnasiets biologiundervisning, kan DNA imidlertid virke ret abstrakt og u håndgribeligt. Set fra et didaktisk synspunkt kan positive 'hands-on' erfaringer være medvirkende til at fange mange elevens interesse, og samtidig kan de opnå en mere 'fuldstændig' forståelse for genteknologi, end de kan gennem lærebogens tekst og figurer alene.

Det er efterhånden blevet muligt at udføre en lang række genteknologiske eksperimenter i biologi. Et par gode, velkendte eksempler er 'Isolering af DNA fra løg' fra Biofag nr.7, 1994 og Eske Bruuns 'Elektroforese', som udmærker sig ved at være enkle, billige og ufarlige. Dertil kommer kommercielle forsøgskits fra firmaer som f.eks. NCBE, BIORAD og EDVOTEK.

Vi præsenterer her en forsøgsvejledning, hvor eleverne kan oprense deres eget DNA, enten fra celler høstet ved kindskrab eller fra blodets indhold af hvide blodceller. Den umiddelbare store fordel ved at oprense humant genomisk DNA er metodens autenticitet. Vi mener, at for elever er forsøget mere autentisk og dermed interessant, når de har med deres *eget* DNA at gøre, end hvis det drejer sig om en konkret eller abstrakt repræsentationsform som løg-DNA eller farvestoffer, hvor man fortæller dem: "at der er ligesom med menneske-DNA".

Et generelt problem ved genteknologiske forsøg er at de let kan virke som en 'black box', hvor eleverne starter med noget velkendt biologisk materiale i et mikrocentrifugerør ('eppendorf-rør'), tilsætter en række ukendte opløsninger og ender i bedste fald med bånd på en gel. Hvad der er foregået i de enkelte trin undervejs i centrifugerøret kan de have problemer ved at rekonstruere – "der er jo ikke noget at se". Samtidig er eleverne ikke *helt* sikre på, at båndene på gelen rent faktisk repræsenterer et vellykket resultat, og for eksempel *ikke* skyldes noget læreren har tilsat. Det handler med andre ord om forsøgets *gennemsigtighed*. Denne øvelse er ikke så enkel som 'isolering af DNA fra løg', men for at kompensere for dette har vi i forsøgsvejledningen angivet hvilken rolle de enkelte opløsninger har efterhånden som de skal anvendes.

## Isolering af humant DNA

### Introduktion

Oprensning af DNA fra celler er første trin i mange genteknologiske undersøgelser. I dette forsøg skal der oprenses DNA af epithelceller fra mundhulens slimhinde eller fra blodets hvide blodceller. Princippet ved metoden er, at først høster man cellerne, derefter nedbryder (lyserer) man cellemembraner og kernemembraner med et sæbestof for at frigøre DNA. Med et proteinspaltende enzym, proteinase k, fordøjer man proteinerne og endelig udfældes DNA med salt i iskold ethanol (alkohol).

# Fremgangsmåde

## Cellehøst fra epithelceller i mundhulens slimhinde

1. Overfør 0,7 mL lysisbuffer til et mikrocentrifugerør.  
Lysisbufferen indeholder 50 mM TrisHCl, pH 7,8, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA (= TE-buffer) og 2% SDS. TE-bufferen fastholder pH'en på et niveau hvor DNA er stabil. SDS er et sæbestof, der bryder celle- og kernemembraner så DNA'et frigøres.
2. Tag en børste eller tandstikker og skrab *grundigt* indersiden af højre kind og området mellem kind og gummer.
3. Dyp børsten/tandstikkeren i centrifugerøret med lysisbuffer. Rør rundt og skrab mod siden af kanten af røret, så alle celler og væsken bliver i røret.
4. Tag nu en ny børste eller tandstikker, og gentag cellehøsten i venstre kind.

## Cellehøst fra blod

*OBS: Af hensyn til mulig smitte er det meget vigtigt, at ingen kommer i kontakt med andre personers blod. Fingerprikkeren skal umiddelbart efter brug bortskaffes i kanylebøtten.*

1. Hånden holdes nedad og rystes kraftigt nogle sekunder. Aftør eventuelt den finger, prøven skal tages fra, med en desinfektionsserviet.
2. Prik hul med fingerprikkeren, og massér en stor bloddråbe frem. Bloddråben afsættes mod kanten i et rent, tomt mikrocentrifugerør. Massér yderligere et par bloddråber frem, som afsættes i samme rør. Der skal bruges 3-4 store dråber blod (>50 µL).
3. Overfør 0,7 mL lysisbuffer til røret. Røret lukkes og vendes et par gange.

## Herfra er metoden fælles for begge celletyper

1. Tilsæt 17,5 µL proteinase k (å 20 mg/mL) opløsning. Pippetér op og ned mindst 10 gange med en 1 mL pipettespids for at hjælpe med nedbrydning af cellerne.  
Proteinase k er et enzym, der bl.a. nedbryder kerneproteiner som binder DNA, og cytoplasmatiske enzymer som nedbryder DNA.
2. Mærk mikrocentrifugerøret med navn, og inkubér det i vandbad (55 °C) i 15 min.
3. Tag mikrocentrifugerøret op af vandbadet, pipetér atter op og ned mindst 10 gange og tilsæt 80 µL 5 M saltopløsning. Luk røret og vend 5-10 gange.  
Na<sup>+</sup> ionerne binder til DNA'ets fosfatgrupper, hvorved den negative ladning neutraliseres. Når NaCl tilsættes, frastøder DNA-molekylerne ikke længere hinanden, og DNA'et har derved lettere ved at fælde ud når der tilsættes ethanol.
4. Overfør mikrocentrifugerørets indhold over i et 5 mL rør.
5. Tilsæt forsigtigt 2 mL iskold 96% ethanol med en pipette. Hold røret på skrå og lad forsigtigt den iskolde ethanol flyde ned langs rørets inderside så ethanolen lægger sig oven på vandfasen.
6. Lad glasset stå uforstyrret 5 minutter i et stativ. Observer eventuel udfældning af DNA, der danner hvide tråde i området mellem de to faser. Luk røret med parafilm og vend 5-10 gange.

DNA er uopløseligt i iskold ethanol, og man vil se det fælde ud i alkoholen som noget hvidt fnugget materiale. Samtidig samler mikroskopiske luftbobler sig til større bobler, der 'løfter' DNA'et fra væskefasen til den organiske fase.

7. Halvdelen af rørets indhold af ethanol, lysisbuffer og DNA overføres til et mikrocentrifugerør, der lukkes og centrifugeres ved 10.000-14.000 omdrejninger (maks. hastighed) pr. min. i 5 min. Derefter kan væskefasen forsigtigt suges fra. Resten af 5 mL rørets indhold af ethanol, lysisbuffer og DNA overføres til samme mikrocentrifugerør, og der centrifugeres igen i 5 min.
8. Efter centrifugeringen suges væsken forsigtigt fra, og røret stilles 1-2 min. omvendt på et stykke køkkenrulle til afdrypning. DNA'et ses nu som en lille, næsten usynlig, hvid 'pellet' i rørets bund. Det er meget vigtigt, at al alkohol er fordampet og DNA'et er tørt inden genopløsning – man kan eventuelt fjerne det sidste ethanol fra røret med en lille spids formet af køkkenrulle.
9. DNA'et genopløses i 20-30 µL TE-buffer ved at suge det nogle gange op og ned i en pipettespids. Det genopløses lettere hvis det kortvarigt opvarmes til 50 °C.

**Næste trin er gel-elektroforese**

## Introduktion

Elektroforese gennem en gel er i dag en meget anvendt metode i arbejdet med DNA. Herved kan man adskille, identificere og oprense forskellige DNA-fragmenter i en prøve, hvor udgangspunktet er en blanding.

Ved gelelektroforese kan man adskille elektrisk ladede molekyler efter deres størrelse ved at trække dem gennem en gel ved hjælp af en elektrisk strøm. Når molekylerne er elektrisk ladede vil de vandre mod den elektriske pol, som har det modsatte fortegn. I en basisk opløsning vil DNA være negativt ladet på grund af fosfat-grupperne i molekylet. DNA vil derfor vandre mod den positive pol. Strukturen i gelen vil forsinke DNA-molekylernes vandring – de største bliver mest forsinket, mens de mindste stykker vandrer længst. Efter et stykke tid i elektroforese vil DNA-molekyler med samme størrelse være nået til samme område i gelen og de vil optræde som et bånd.

DNA kan gøres synligt ved at farve gelen med ethidiumbromid, der binder meget effektivt til DNA og flouriserer i ultraviolet lys. *OBS: Ethidiumbromid er mutagent – brug handsker (nitril).*

I dette forsøg skal det oprensede DNA visualiseres ved hjælp af elektroforese.

## Fremgangsmåde

1. Der skal støbes en gel af agarose (et sukkerstof udvundet af tang) i det udleverede elektroforesekammer. Til 100 mL gel bruges 100 mL 1xTBE-buffer tilsat 0,8 g agarose, som smeltes i et bægerglas anbragt i mikrobølgeovn ved max. effekt. Sluk så snart det koger – *pas på stødkogning*. Rør grundigt rundt så agarosen opløses helt. Efter afkøling til ca. 60°C tilsættes 100 µL ethidiumbromidopløsning. Gelen støbes i kamret ved brug af en kam, der danner et antal brønde.  
TBE-buffer indeholder 900 mM TRIS, 900mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (borsyre) og 25 mM EDTA, pH 8,4. Bufferens funktion er at fastholde pH'en i gelen på et niveau hvor DNA er stabil.
2. Når gelen er størknet fyldes der 1xTBE-buffer på, indtil gelen netop er dækket. Først nu tages kammen forsigtigt op, så brøndene fyldes med buffer.

3. Der tilsættes 5 µl markørblanding til mikrocentrifugerøret med DNA-opløsningen. Markørblanding indeholder TBE-buffer, glycerol og bromphenolblåt. Glycerol er tungere end vand, derfor synker DNA-markørblandingen når den overføres til en brønd i gelen. Bromphenolblåt tilsættes for at man kan følge elektroforesen.
4. Der overføres 15 µl DNA-markørblanding til en af brøndene i elektroforesekamret ved at man ganske forsigtigt tømmer indholdet af mikropipetten ud i brønden under bufferen. *Pas på ikke at stikke pipettespidsen ned i bunden af gelen.* Husk at notere hvilken brønd prøven blev placeret i.  
Der kan eventuelt sætte en størrelsesmarkør til en af brøndene.
5. Slut strømmen og lad elektroforesen køre i et par timer ved ca. 120 V (ca. 40 mA, afhænger af gelen/karret).

## Resultatbehandling

Gelen gennemlyses med ultraviolet lys – er der DNA vil det fremtræde som lysende orange bånd. Gelen fotograferes eventuelt.

*OBS: Husk afskærmning mod UV-lys.*

## Lærervejledning

Ovenstående forsøg kan afvikles på 2 timer. I så fald bør eleverne fremstille gelerne i ventetiden mens cellerne fordøjes med proteinase k, så de kan nå at stivne. Har man mindre tid til rådighed, kan mikrocentrifugerørene med det oprensede DNA i TE-buffer opbevares på køl eller nedfryses til næste gang.

Forsøget kan udvides med fordøjelse af DNA'et med restriktionsenzymmer, til det bør der afsættes yderligere 2 timer. Resultatet bliver et 'smear' på gelen.

Det er også muligt at kvantificere den oprensede mængde DNA ved at måle dets absorbans i ultraviolet lys (660 nm), metoden er beskrevet på NCBE's hjemmeside og kan downloades som pdf-fil fra: <http://www.ncbe.reading.ac.uk/NCBE/PROTOCOLS/DNA/quantification.html>

Børsterne, som kan bruges til cellehøst ligner en miniature-udgave af en flaskerenser. De kan købes på apoteker eller hos tandlæger (ca. 35 kr. for 8-12 stk, afhængig af størrelsen).

TE- og TBE-buffer kan købes færdigblandede hos kemikalieforhandlere. Har man ingredienserne stående på skolen, er opløsningerne nemme at fremstille selv. Opskrifter findes bag i 'Eksperimentel Genteknologi' (Nucleus, 1991). Bemærk at vi i lysisbufferen anvender 50 mM TRIS og ikke 10 mM som angivet i 'Eksperimentel Genteknologi'. Lad dem stå natten over med magnetomrøring, så er de klar den følgende dag.

Opskrifter på ethidiumstamopløsning og markørblanding findes i 'Eksperimentel Genteknologi', ligesom der her findes en glimrende gennemgang af elektroforese.

SDS og proteinase k kan skaffes gennem kemikalieforhandlere. Prisen stiger med materialets renhed. Til denne type forsøg kan man fint klare sig med den billigste løsning. SDS blandes i TE-bufferen (= lysisbuffer) og stilles med *forsigtig* magnetomrøring – det skummer meget. Proteinase k kan købes som stamopløsning eller frysetørret hos kemikalieforhandlere. Den frysetørrede løsning har længst holdbarhed. Man kan så fremstille opløsninger efterhånden som de skal anvendes (20 mg/mL vand). Der skal bruges ca. 0,35 mg til fordøjelse pr. prøve, dvs. 17,5 µL. Vi har forsøgt med NOVO Neutrase, som et billigt alternativ til proteinase k, men *uden* succes.

Neutrase påvirkes tilsyneladende af SDS, så det resulterer i proteinudfældning i form af en stor brun, 'snasket' pellet.

Man kan diskutere hvorvidt ethidiumbromid bør benyttes i gymnasieundervisningen grundet dets mutagene effekt. Den umiddelbare fordel ved ethidiumbromid er dets følsomhed, selv ganske lave DNA-koncentrationer fremtræder tydeligt. Der findes andre mere eller mindre ugiftige alternativer, som f.eks. methylenblåt og dets oxidationsprodukter såsom Azur A, Toluidine blue O og Brilliant cresyl blue men de har ikke samme følsomhed. Desuden kan de have tendens til at farve gelen mørkeblå. I mange af de kommercielle forsøgskits til undervisningsbrug indgår der ikke ethidiumbromid men én eller anden blanding af ovennævnte farvestoffer samt Nile blue A. Det er også muligt at indfarve gelen fra start med Nile blue A, så man løbende kan følge DNA'ets vandring under elektroforesen (Adkins, S. & Burmeister, M., 1996).

Hvis man vælger at farve med et andet stof end ethidiumbromid, bliver resultatbehandlingen meget lettere: gellerne kan forsigtigt løftes op fra elektroforesekammeret på et lille stykke tilklippet overhead-transparent og anbringes i en plastlomme. De kan derpå scannes i en almindelig flat-bed scanner og billedfilerne kan så gemmes på klassens hjemmeside eller konferencemappe.

Azur A købes hos kemikalieforhandler eller fra NCBE. 0,08 g Azur A blandes i 500 mL ethanol (40%) og omrøres til det er helt opløst. Det skal inden brug fortyndes med 500 mL demineraliseret vand, så koncentrationen bliver 0,04 g i 20% ethanol.

Procedure (fra NCBE):

1. Efter endt elektroforese hældes TBE-bufferen fra, gelen anbringes forsigtigt i en lille bakke og dækkes helt med Azur A-opløsningen. Farves i 4 minutter.
2. Farven hældes tilbage på flasken. Gelen skylles dernæst med 70% ethanol i nogle få sekunder. Hæld derefter fra til genbrug.
3. Skyl gelen med almindelig vandhanevand nogle gange. DNA'et bliver synligt efter 10-30 min.

På Biosites hjemmeside (<http://www.biosite.dk/virksomheder/virksomheder.htm>) kan man finde links til forhandlere af udstyr, kemikalier m.m.

## **Acknowledgement**

Forsøget er blevet udviklet og afprøvet på kurset 'Undervisningsforsøg – Biologiundervisning' på Århus Universitet. Tak til kursisterne for konstruktiv feed-back.

## **Litteratur**

Adkins, S. & Burmeister, M.(1996): Visualization of DNA in agarose gels as migrating colored bands: Applications for preparative gels and educational demonstrations. *Analytical Biochemistry* 240, 17-23.

Grimberg, J., Nawoschik, S., Belluscio, L., McKee, R., Turck, A. & Eisenberg, A. (1989): A simple and efficient non-organic procedure for the isolation of genomic DNA from blood. *Nucleic Acids Research*, vol.17, no.20, 8390.

Jeanpierre, M. (1987): A rapid method for the purification of DNA from blood. *Nucleic Acids Research*, vol.15, no.22, 9611.

Lahiri, D.K., Bye, S., Nurnberger, J.I., Hodes, M.E. & Crisp, M. (1992): A non-organic and non-enzymatic extraction method gives higher yields of genomic DNA from whole-blood samples than do nine other methods tested. *Journal of biochemical and biophysical methods* 25, 193-205.

Miller, S.A., Dykes, D.D & Polesky, H.F. (1988): A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nuclear Acid Research*, vol.16, no.3, 1215.

Todt, E. & Götz, C. (1998): Interesse von Jugendlichen an der Gentechnologie. *Zeitschrift für Didaktik der Naturwissenschaften* vol.4, no.1, 3-11.

Wang, L., Hirayasu, K., Ishizawa, M. & Kobayashi, Y. (1994): Purification of genomic DNA from human whole blood by isopropanol-fractionation with concentrated NaI and SDS. *Nuclear Acid Research*, vol.22, no.9, 1774-1775.