

KRIMINALDETEKTIVEN GERNINGSSTEDETS GÅDE

PCR

Elevvejledning

PCR trin for trin

PCR involverer en række gentagne cykler, der hver består af følgende tre trin: Denaturering, primer påsætning og forlængelse af den påhæftede primer ved hjælp af *Taq* DNA-polymerase.

Før selve DNA amplifikationen påbegyndes, klargøres de prøver af genetisk materiale, som skal undersøges, dvs. fra hhv. gerningsstedet og de mistænkte

Derefter blandes skabelon DNA, primers (oligonucleotider), termostabil DNA-polymerase (*Taq*), de fire baser (T, A, G og C) og reaktionsbuffer i et mikrocentrifugerør. Mikrocentrifugerøret placeres i termocykleren, eller de nødvendige vandbade klargøres.

Termocykleren indeholder en aluminiumsblok, hvori prøverne placeres. Denne aluminiumsblok kan lynhurtigt afkøles og opvarmes til meget forskellige temperaturer. Dette kaldes termalcyklung.

I en cyklus opvarmes først til 94 °C, hvorved DNA-strengene vil denaturere eller adskilles. Dette kaldes denatureringstrinnet.

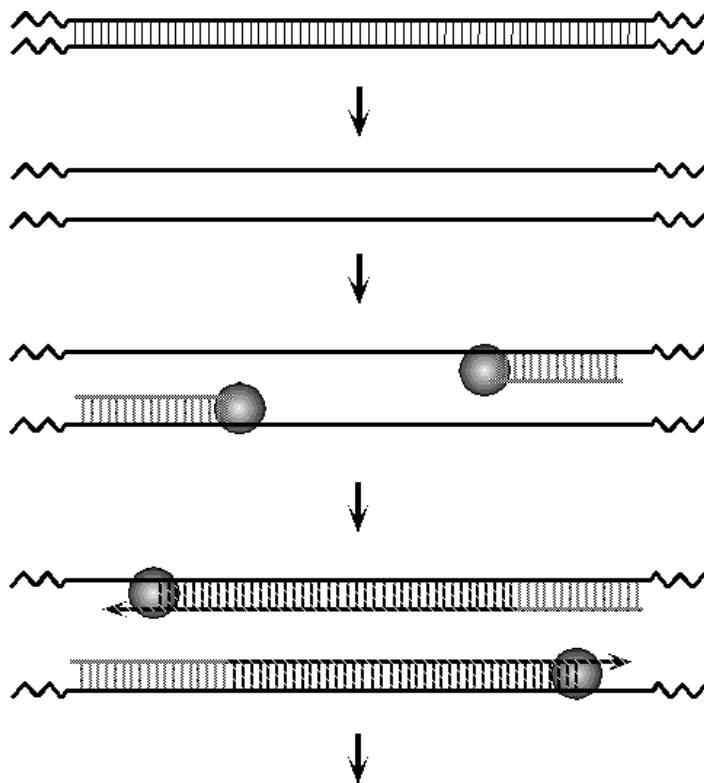
Derefter afkøles lynhurtigt til 60 °C, hvorved primeren bindes til de enkelte skabelon-DNA-streng. Dette kaldes vedhæftningstrinnet. De to oprindelige DNA-streng vil eventuelt samle sig igen eller konkurrere med primerens komplementære bindingssteder. Men der tilsættes i dette forsøg så megen primer, at den originale DNA-streng "udkonkurreres".

Til sidst opvarmes til 72 °C, hvorved *Taq* DNA polymerase forlænger de komplementære DNA streng med start fra primeren, og den endelige færdige kopi af DNA-dobbeltstrengen kan dannes. Dette trin kaldes forlængelsestrinnet.

Taq polymerasen arbejder mest effektivt ved 72°C, hvorfor det er vigtigt at ramme præcis denne temperatur.

En cyklus = denaturering + vedhæftning + forlængelse

De to nye sæt dobbeltstreng DNA, der er dannet nu, danner dernæst udgangspunkt for næste cyklus, og på denne måde mangedobles DNA-strengantallet efterhånden. Ved 40 cykler dannes der eksempelvis over en milliard kopier af det originale DNA stykke.



Normalt køres der 40 cykler. Ved hver cyklus fordobles antallet af DNA-streng. Efter 40 cykler vil der således være $1,1 \times 10^{12}$ ekstra kopier af den oprindelige stump DNA.

PCR laver DNA med eksakte længder og sekvenser. I den første cyklus vedhæftes de to primere til DNA-udgangsmaterialet i hver sin ende på de to komplementære streng. Efter den første fuldendte cyklus er der dannet to nye streng, der er kortere end det oprindelige DNA, men længere end det specifikke DNA-stykke, som man ønsker at mangedoble. Først efter 3. cyklus er man oppe på fuld længde.

Når man således har fået den præcise længde på DNA, påbegyndes den eksponentielle fordobling ved de næste cykler (X^n , hvor X er antallet af udgangsmaterialet og n er antallet af cykler). Der vil altid være et sæt originalt udgangs-DNA-materiale, som ikke er fuldt kopieret. Dette betyder dog ikke noget, når der køres et tilstrækkeligt antal cykler.

Hvad skal vi bruge?

Materialer:

Isbad med DNA allel-stige, mastermix og primere (MMP, blå)	1	<input type="checkbox"/>
DNA fra gerningsstedet og de mistænkte	5	<input type="checkbox"/>
PCR-rør (med skruelåg hvis der skal laves manuel termalcykling)	5	<input type="checkbox"/>
PCR adaptorer (mikrocentrifugerør uden låg)	5	<input type="checkbox"/>
Skumholder	1	<input type="checkbox"/>
Mærkepen	1	<input type="checkbox"/>

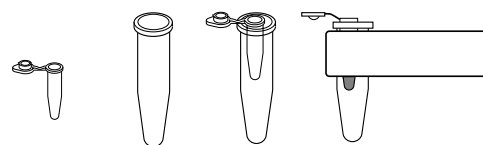
Mikropipette 2-20 μ L
Spidser til mikropipetten – med aerosolbarriere

1
1 æske

Fremgangsmåde ved første del:

1

Mærk de udleverede PCR-rør med hhv. CS, A, B, C og D samt dine initialer.



2

Stil rørene på is under hele forberedelsen

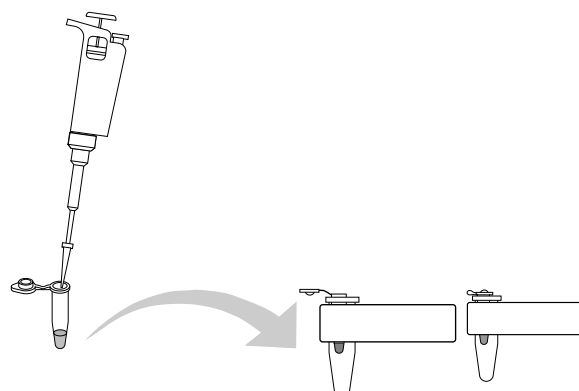
3

Overfør 20 μ L DNA fra de udleverede mikrocentrifugerør til de respektive PCR-rør. Følg skemaet.

Følg skemaet.

Fx overføres 20 μ L fra GS-mikrocentrifugerøret til dit GS-mærkede PCR-rør.

Vigtigt: Skift pipettespids hver gang du arbejder med et nyt rør.



4

Overfør derefter 20 μ L mastermix (MMP) til hvert PCR-rør.

Brug pipetten til at blande med ved at suge op og ned et par gange.

Vigtigt: Skift pipettespids hver gang du arbejder med et nyt rør.

Luk rørene.

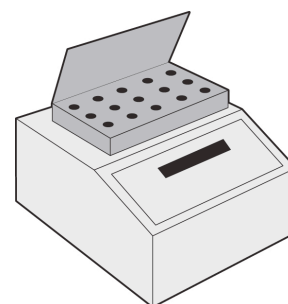
Indholdet i PCR-rørene skulle nu gerne være blåt

5

Stil de lukkede PCR-rør i hver sin adaptor.

6

Start PCR-maskinen (eller den manuelle termalcykling).



Hvad skal vi bruge ved anden forsøgsgang:

Materialer:

3 % agarosegel

1

PCR-prøver fra forrige forsøgsgang

5

TAE elektroforesebuffer (1x konc.)

350 mL

Orange G loading dye	60 μ L	<input type="checkbox"/>
Allel-stige (orange væske)	25 μ L	<input type="checkbox"/>
Mikropipette 2-20 μ L		1 <input type="checkbox"/>
Spidser med aerosolbarriere til mikropipetten		1 æske <input type="checkbox"/>
Gelelektroforeseudstyr		<input type="checkbox"/>
Strømforsyning		<input type="checkbox"/>
Fast Blast DNA farve (fælles for alle grupper)		<input type="checkbox"/>
Kar til farvning af gel		<input type="checkbox"/>

Fremgangsmåde:

Elektroforese:

1

Gør elektroforeseapparatet klar.

2

Tag de 5 PCR-rør og placer dem i hver deres PCR-adaptor og placer dem i skumholderen.

3

Tilsæt 10 μ L Orange G loading dye til hvert PCR-rør og bland godt ved at suge op og ned med pipetten.

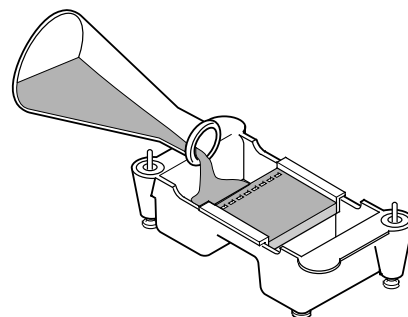
Vigtigt: Husk at skifte pipettespids for hvert nyt rør.

4.

Overfør 20 μ L fra hvert rør til brøndene i gelen.

Rækkefølgen skal være:

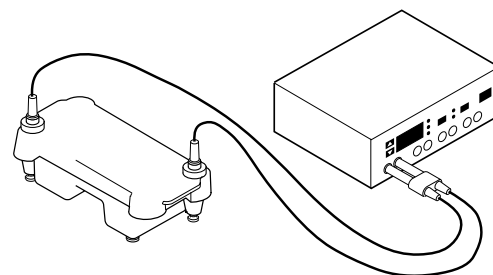
1. Allel-stige (reference)
2. Gerningsstedet
3. Mistænkt A
4. Mistænkt B
5. Mistænkt C
6. Mistænkt D



5

Start elektroforesen og kørs i 30 minutter ved 100V.

Sørg for, at den orange farve ikke løber ud af gelen



Farvning af gelen:

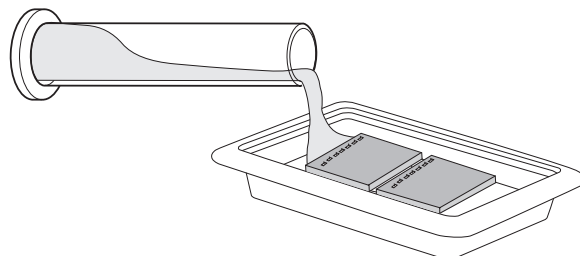
6

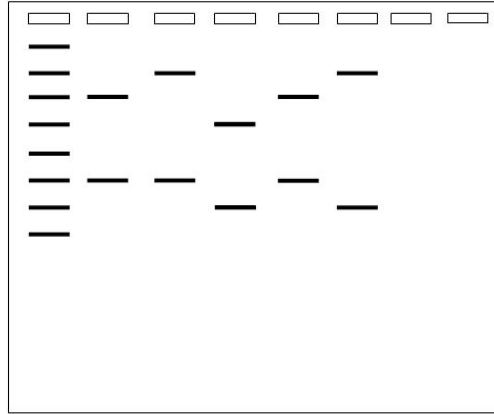
Flyt forsigtigt gelen fra elektroforesekarret over i det kar, der skal bruges til farvning.

Pas på! Gelen glider meget let.

7

Farv gelen – benyt én af de to metoder:





A

Langsom farvning – gelen står natten over.
denne metode **anbefales**

B

Hurtig farvning – ca. 20 minutter

A Langsom farvning – anbefales.

1

Tilsæt 120 mL 1x Fast Blast DNA farve til farvekarret.
Karret kan indeholde 2 geler

2

Lad farven virke i 4-24 timer. Ryst let undervejs,
hvis det er muligt

3

Hæld farven fra. Gelen er nu klar, idet det **ikke**
er nødvendigt at affarve.

4

Placer gelen mod en lys baggrund og aflæs resultatet

5

Lufttør eventuelt gelen mellem to lag cellofan
eller OH-transparenter.

6

Gelen kan opbevares længe, men undgå at den
udsættes for direkte lys, da det vil få båndene til at blegne

B Hurtig farvning

Med denne metode farves gelen på 15 minutter, men efterfølgende er det nødvendigt med megen affarvning for at kunne se båndene bedst muligt:

1

Dæk gelen med 100x Fast Blast DNA farve

2

Farv gelen i 5 minutter mens der rystes let

Hæld farven tilbage på flasken.

Farven kan genbruges 7 gange

3

Vask gelen med 40-55°C varmt vandhanevand i 10 sekunder.

4

Vask derefter gelen 3 gange 5 minutter i

lunkent vand (40-55°C).

Hvis ikke gelen er tilstrækkeligt affarvet, fortsættes der, til det er tydeligt at se båndene.

5

Placer gelen mod en lys baggrund og aflæs resultatet.

6

Lufttør eventuelt gelen mellem to lag cellofan eller OH-transparenter.

7

Gelen kan opbevares længe, men undgå at den udsættes for direkte lys, da det vil få båndene til at blegne.