

PÅ JAKT ETTER MIN FAR

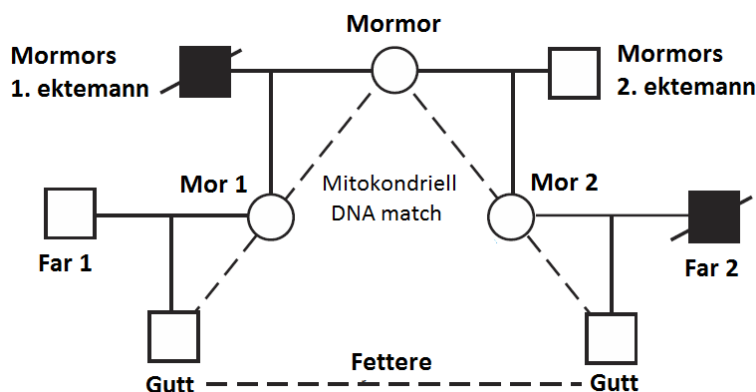
Hensikt

Hensikten med forsøket er å utvikle en grunnleggende forståelse for DNA fingeravtrykksanalyser og deres bruk til å identifisere slektskap mellom personer.

Bakgrunn

Det genetiske fingeravtrykket til et barn er sammensatt av elementer fra begge foreldrene. DNA fingeravtrykksanalyser kan dermed brukes for å finne et barns biologiske mor og far. I slike analyser ser man på flere ulike områder i DNA som varierer fra individ til individ. Disse DNA-sekvensene kalles polymorfe sekvenser, og består av DNA som ikke koder for proteiner.

I dette forsøket brukes DNA fingeravtrykksanalyser for å identifisere de biologiske foreldrene til to gutter som kom bort fra sine foreldre i et krigsherjet land. Guttene var fettere, født med to måneders mellomrom og veldig like utseendemessig. Mødrene var halvsøstre med felles mor (se slektskapstreet under). Ti kvinner pekte seg ut som mulige mødre til guttene, og DNA-fingeravtrykksanalyser basert på mitokondrielt DNA ble utført siden mitokondrie-DNA kun nedarves fra mor til barn. Testen viste som ventet at guttene hadde den samme mitokondrieprofilen, og at denne matchet profilen til to av de ti kvinnene. Deretter ble det gjort fingeravtrykks-analyser av kromosomale DNA-prøver fra barna, mødrene og den ene, gjenlevende faren. Oppgaven er å separere disse behandlede DNA-prøvene (simulert med fargestoffer) ved elektroforese og deretter analysere og sammenlikne båndmønstrene for å identifisere guttenes respektive, biologiske foreldre.



Aktuelle læringsmål

Biologi 2, bioteknologi. Gjør greie for fremstilling av genetiske fingeravtrykk, og hvordan de kan brukes i rettsmedisin og i studier av slektskap mellom individer og grupper av organismer.

LÆRERNOTATER

Utstyr

Medfølgende innhold: Ferdig alikvoterte fargestoffer klare til elektroforese, practice gel loading solution, agarose, konsentrert elektroforesebuffer (50 x TAE), 1 ml engangspipette (plast), 100 ml målesylinder, engangspipetter (plast). Forsøkssettet inneholder materialer til 10 elevgrupper.

Oppbevaring: Alle komponenter oppbevares i romtemperatur.

Nødvendig tilleggsutstyr (foreslåtte varenumre i parentes): Elektroforeseapparat (5441.50/5441.60/5441.65), spenningskilde (5441.22/5441.24), vekt (1028.90), erlendmeyerkolbe 250 ml (0079.10), målesylindre (0118.20, 0118.21, 0118.24)/pipettefyller og pipetter (0153.30, 0140.84), mikrobølgeovn/gassbrenner (0051.11)/kokeplate (0668.10), destillert vann (8903.00-6).

Anbefalt tilleggsutstyr (foreslåtte varenumre i parentes): Hansker (0860.46-49), mikropipetter (0144.06/0134.06) og pipettespisser (0134.06), mikrosentrifuge (0677.00), visualiseringsutstyr (5444.20).

Forberedelser

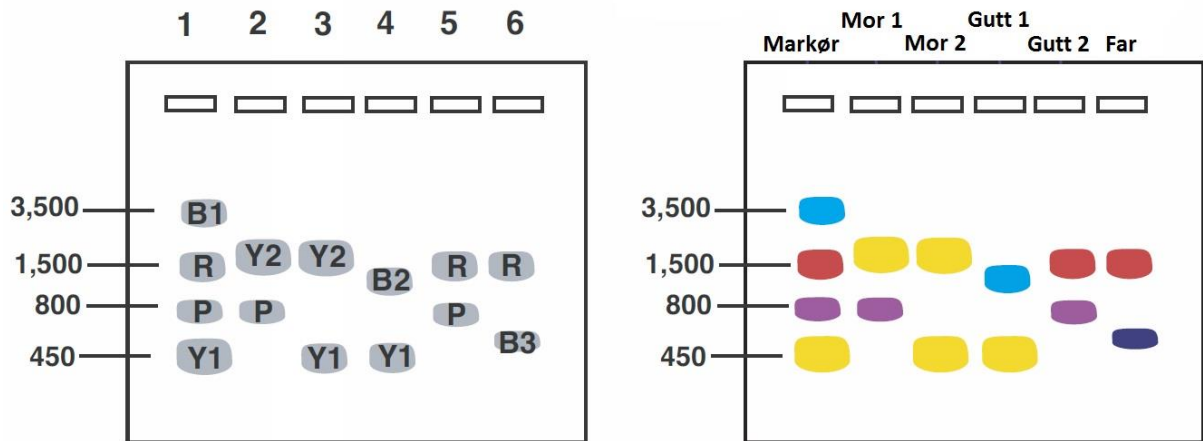
Agarosegelene kan støpes på forhånd for å korte ned forsøks tiden. Ferdigstøpte geler kan forsegles med plastfolie og oppbevares i kjøleskap i inntil 1-2 uker. Elektroforese-buffere (TAE) og FlashBlue-fargeløsningen kan også fortynnes på forhånd.

Forsøks tid

Ca. 45 minutter

Resultatanalyse – fasit

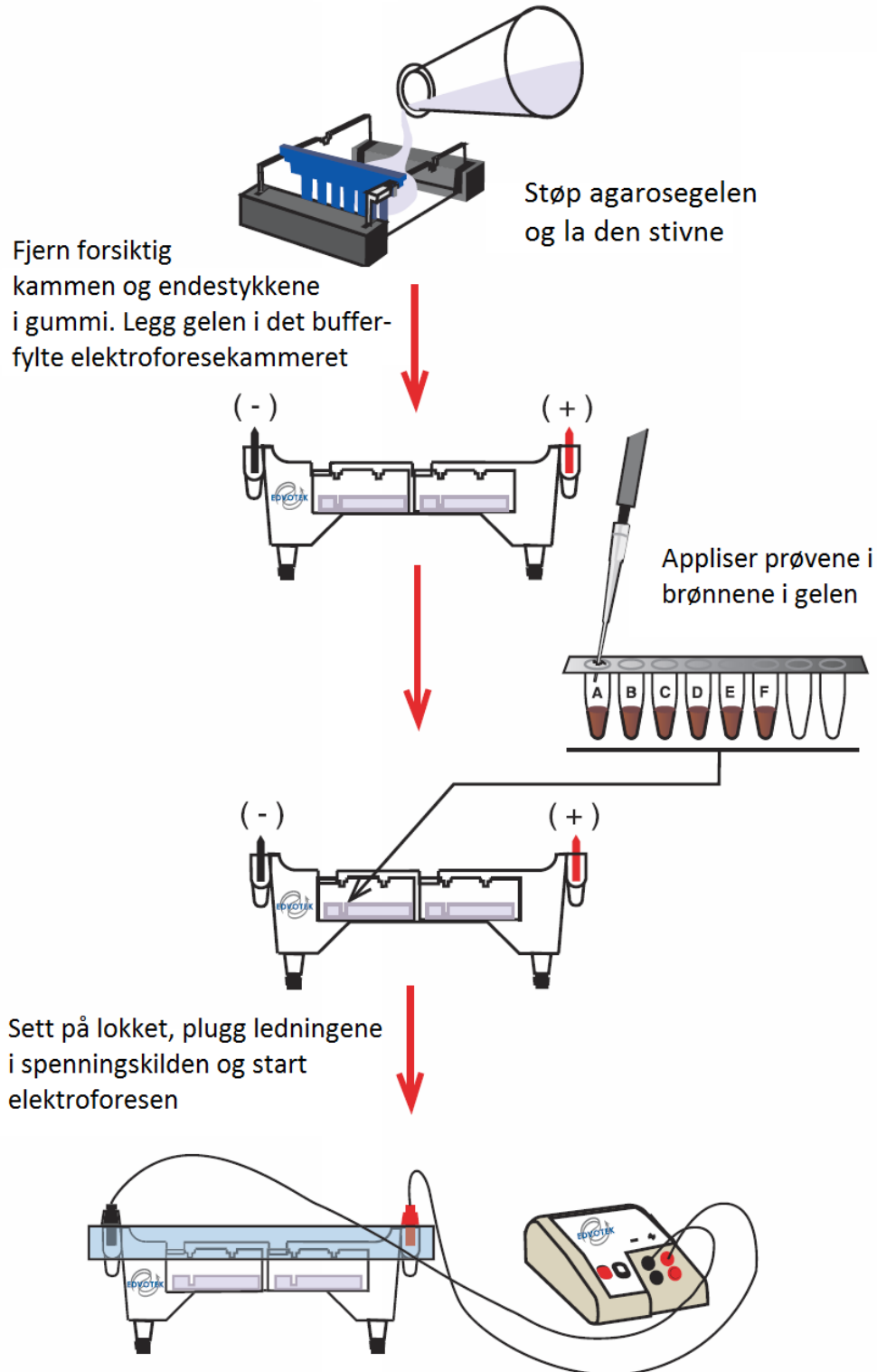
1. Se Figur 1 på neste side for skjematisk gel med forventede resultater. Det lille båndet hos Gutt 2 (brønn 5) matcher det lille båndet hos Mor 1 (brønn 2). Det røde båndet hos Gutt 2 passer med det røde båndet hos faren (brønn 6). Gutt 2 er derfor biologisk barn av Mor 1 og faren. Det gule båndet hos Gutt 1 (brønn 4) passer med det nederste, gule båndet hos Mor 2 (brønn 3). Altså er Gutt 1 biologisk barn av Mor 2. Ingen av båndene hos Gutt 1 matcher bånd hos Faren (brønn 6), som dermed ikke kan være biologisk far til gutt 1.
2. De fargede båndene representerer DNA-fragmenter av ulik lengde fra DNA fra mødrene, barna og faren.
3. Mitokondrielt DNA nedarves alltid fra mor. Eggceller inneholder mange mitokondrier, mens sædceller kun har et fåtall mitokondrier. Det befruktete egget (zygoten) vil derfor inneholde mitokondrier som nesten utelukkende kommer fra morens egg.
4. I motsetning til mitokondrielt DNA som kun består av DNA fra mor, består genomisk DNA i cellekjernen av to sett med DNA. Det ene settet er arvet fra mor, mens det andre er arvet fra far.



Figur 1. Skjematisk fremstilling av fargestoffenes relative plasseringer i agarosegelen etter elektroforese. Forkortelser: B1 = Blå 1, B2 = Blå 2, B3 = Blå 3, P = Purple (lilla), R = Rød, Y1 = Yellow (gul) 1, Y2 = Yellow (gul) 2. Tallene viser størrelsene (tilsvarende basepar i DNA) på de ulike fargestoffene i markøren.

ELEVVEILEDNING – PÅ JAKT ETTER MIN FAR

Flytskjema – oversikt over forsøket



Utførelse

Laboratoriesikkerhet

Bruk hansker og vask hendene godt med såpe og vann etter å ha jobbet i laboratoriet.

Støping av 0.8 % agarosegeler

1. Sett et gelkar i støpekammeret eller forsegl karet med endestykker/tape og sett i en kam med 6 tenner (se punkt 1 i flytskjemaet). Vei inn 0.39 g agarose og overfør til en 250 ml erlendmeyerkolbe. Tilsett 1.0 ml 50x konsentrert TAE-buffer og 49.0 ml destillert (deionisert/demineralisert) vann (**eller** 50 ml 1x TAE-buffer). Dette er nok til 1 stk 0.8 % agarosegel.
2. Kok opp i mikrobølgeovn (høy effekt i ca 1 min). Kok opp gjentatte ganger (høy effekt i ca 25 s) til agarosen er fullstendig oppløst og løsningen er klar som vann. Roter kolben innimellom for å få en jevn agaroseløsning. Følg nøye med for å unngå at det koker over. Sjekk at det ikke er uløst agarose eller klumper i løsningen.
3. Avkjøl agaroseløsningen under rennende vann mens du roterer kolben til temperaturen er ca 60 °C (når du kan holde kolben i hånden uten å brenne deg). Sett gelkaret på et horisontalt underlag og hell i agaroseløsningen. La stå til gelen har stivnet (20-30 min).

Applisering av prøvene på gelen

1. Fjern endestykkene/tapen på gelkaret og legg gelen i elektroforesekaret slik at brønnene er nærmest den negative (svarte) elektroden (se punkt 2 i flytskjemaet). Hell 1x TAE-buffer i karet til buffernivået er omtrent 5 mm over gelen. Ta kammen forsiktig ut av gelen. Se til at det er buffer i alle brønnene.
2. Sentrifuger prøvene kort eller dunk dem lett mot bordplaten for å samle hele volumet nederst i røret. Appliser 35 µl av prøvene A-F i brønnene 1-6 på gelen i rekkefølge, fra venstre mot høyre (se punkt 3 i flytskjemaet og Tabell 1 under). Pass på at du ikke stikker pipettespissen for langt ned slik at det blir hull i brønnen. **Tips:** dersom brønnene er vanskelige å se kan det hjelpe å legge et svart/mørkt papirark e. l. under elektroforesekaret.

Tabell 1. Skjema for applisering av DNA-prøvene på gelen.

Brønn	Prøve	Beskrivelse
1	A	Markør (standard fargestoffer)
2	B	Mor 1
3	C	Mor 2
4	D	Gutt 1
5	E	Gutt 2
6	F	Far

Elektroforese

1. Sett lokket på elektroforesekaret og koble til spenningskilden. Kjør gelen på 70-125 V i 30-60 min (se punkt 4 i flytskjemaet). Tiden det tar å separere DNA-molekylene avhenger av spenningen og størrelsen på elektroforeseapparatet. Se Tabell 2 under for anbefalte innstillinger av elektroforeseapparatene fra Edvotek. Ikke sett spenningen høyere enn anbefalt da for høy spenning kan resultere i at gelen smelter. Når elektroforesen er i gang dannes små, synlige bobler på elektrodene, og de negativt ladete DNA-molekylene vandrer mot den positive elektroden. La fargestoffene migrere 3-4 cm vekk fra brønnene.
2. Når elektroforesen er ferdig, skrus strømmen av før lokket fjernes.

Tabell 2. Anbefalte innstillinger for Edvoteks elektroforeseapparater. Tids- og spenningsangivelsene kan også brukes som retningslinjer for elektroforeseapparater av de fleste andre merker. Gjengitt med tillatelse fra Edvotek.

Volt	Tid og spenning	
	M6Plus Minimum/maksimum	M12 og M36 Minimum/maksimum
150	15/20 min	25/35 min
125	20/30 min	35/45 min
70	35/45 min	60/90 min
50	50/80 min	95/130 min

Visualisering av DNA

1. Legg gelen i en gjennomsiktig plastpose (f. eks. en ziplock-pose eller brødpose). Legg gelen på en lyskilde med hvitt lys for tydelig visualisering av DNA-båndene (punkt 6 i flytskjemaet). Resultatet kan dokumenteres ved å ta bilde av gelen med et digitalkamera.

Avfallshåndtering

Geler og plastavfall kan kastes i restavfallet. Elektroforesebufferen (1x TAE-buffer) kan helles ut i vasken. Skyll godt med vann etterpå.

Resultatanalyse

1. Sammenlign DNA-profilene (de genetiske fingeravtrykkene) til de to mødrene (brønn 2 og 3), barna (brønn 4 og 5) og faren (brønn 6) og bestem hvem som er biologiske foreldre til de to guttene.
2. Hva representerer de ulike fargede båndene som ble separert ved elektroforese?
3. Hvorfor har forskjellige individer, for eksempel søsken, ulike genetiske fingeravtrykk?
4. Hva er grunnlaget for DNA fingeravtrykksanalyser med mitokondrielt DNA?
5. Hva er forskjellen mellom DNA fingeravtrykksanalyser basert på mitokondrie-DNA og genomisk DNA?