# Laboration: Extraktion av ditt eget DNA

## Syfte:

Syftet med laborationen är att extrahera DNA från egna kindceller så att det blir synligt för blotta ögat!

## Material:

Sterila tops, saltlösning för att skölja munnen, saltlösning att tillsätta, proteas, trisbuffert, lysbuffert, mikropipett, liten plastpipett, stor graderad plastpipett, testtub med skruvlock, centrifugtub, stor tub med skruvlock, alkohol (etanol eller 1-propanol), vattenbad, centrifug. (Obs. Centrifugtuberna och halsbandstuberna ser likadana ut).

## Teoretisk bakgrund:

**Vad menas med extraktion av DNA?**Extraktion av DNA betyder att vi gör så att DNA-molekylerna lämnar cellkärnan och tar sig ut genom cellen. Det är en förutsättning för att vi sedan ska kunna se DNA:t. När DNA:t är gömt inuti cellkärnan kan vi inte se det (om vi inte har elektronmikroskop).

**Hur kan DNA:t bli synligt för blotta ögat?**Jo, därför att när DNA:t är utanför cellen minskar vi lösligheten genom tillförsel av både salt och alkohol. I vanliga fall binder DNA-molekylerna hellre till vattenmolekyler istället för till andra DNA-molekyler (DNA:t är då löst i vattnet och syns inte för blotta ögat). Saltet bryter dock vätebindningarna mellan DNA-molekylerna och vattenmolekylerna, vilket minskar lösligheten radikalt. Den iskalla alkoholen minskar lösligheten ytterligare eftersom alkoholmolekylerna inte så gärna binder till DNA-molekylerna (jämfört med vatten). Allt detta leder till att DNA-molekylerna binder till varandra istället. Man säger då att DNA:t har fällts ut (är olösligt). När många DNA-molekyler binder till varandra bildas en tunn vitaktig tråd vilket kan ses med blotta ögat!

**Men hur får vi ut DNA-molekylerna från cellen?**För att få ut DNA-molekylerna från cellerna måste vi lösa upp både cellmembranet och kärnmembranet. Det sker genom en s.k. ”lysbuffert” som fungerar på ungefär samma sätt som diskmedel. Diskmedelsmolekyler har en ände som binder smuts (fett) och en ände som binder vatten och kan på så sätt borra sig in i smutsen, binda smutsen och sedan avlägsna den från t.ex. en tallrik. Lysbufferten innehåller molekyler som på samma sätt har en ände som kan binda till fettsyrorna i kärn- och cellmembranet och en ände som kan binda till det omgivande vattnet. Molekylerna borrar sig in, binder och sliter lös fettsyrorna och tar sedan med sig dem ut i det fria vattnet. Membranen löses upp och DNA-molekylerna kan då ta sig ut ur cellen!

**Varför har man iskall alkohol?:**Det finns flera anledningar till varför man har iskall alkohol (etanol eller 2-propanol). En viktig anledning är att DNA:t löser sig ännu sämre i iskall alkohol jämfört med normaltempererad alkohol.

*Hög temperatur= stor rörelse hos DNA-molekylerna= de binder inte så lätt till varandra*

De synliga DNA-trådarna bildas alltså lättare vid en lägre temperatur och DNA:t blir också fastare och lättare att linda upp på pinnen. En annan anledning är att kylan skyddar DNA:t från ett enzym som heter ”DNase” (de-en-as). DNase förekommer fritt i cytoplasman (cellvätskan) och har som uppgift att bryta ned ”främmande DNA”. Främmande DNA kan t.ex. komma in i cellen i form av ett virus. Det är då viktigt att cellen kan skydda sig mot viruset genom att bryta ned dess DNA. DNase bryter dock inte ner cellens eget DNA eftersom det DNA:t ligger skyddat i cellkärnan. Problemet vid DNA-extraktionen är att DNA:t tar sig ut i cytoplasman och sedan vidare ut ur cellen. DNase kan då börja bryta ned cellens egna DNA-molekyler. Kylan hämmar dock enzymet vilket innebär en minskad nedbrytning. De flesta enzymer arbetar effektivast vid en ganska hög temperatur (kroppstemperatur).

**Varför tillsätter man proteas?**   
”Proteaser” är enzymer som bryter ned proteiner. I det här fallet används proteaset för att bryta ned histonerna som DNA:t är lindat runt. När detta sker frigörs DNA:t från histonerna. Vi erhåller då ett renare DNA. DNA-molekylerna har då lättare att binda till varandra (när histonerna inte är i vägen) vilket gör att vi lättare kan se DNA:t.

## Läraren förbereder:

1. Läraren förbereder proteaslösningen: Läraren tillsätter 200 mikroliter ”Trisbuffert” till tuben med enzymet proteas, väntar i några minuter och för sedan tillbaka hela innehållet till tuben med resterande trisbuffert. Läraren avslutar med att blanda ordentligt. Vi har då fått vår proteaslösning!
2. Läraren blandar till saltlösningen: Läraren blandar 8 små påsar salt i 500 ml dricksvatten.
3. Läraren gör i ordning ett vattenbad: Ett vattenbad med 37 graders varmt vatten.

## Metod (ca 60 min behövs):

1. Skölj munnen med 3 ml saltlösning i ca 45 sekunder. Spotta försiktigt ut lösningen i en mugg.
2. Centrifugera salivlösningen enligt följande procedur:

* Ta fram en centrifugtub (1,5 ml tub utan skruvlock) och skriv ditt namn på tuben.
* Överför 1,5 ml av salivlösningen till centrifugtuben med hjälp av en stor graderad plastpipett. Var noga med att se till att du får med celler från muggens botten och försök att undvika att få med skum från saliven. **Obs. spara innehållet i muggen!**
* Centrifugera tuben på maxfart i ca 2 min. Obs. Placera en till tub mittemot i centrifugen (en annan grupps tub) så att det blir jämvikt i centrifugen!
* Kolla om ni ser en vit ”pellets” i botten av testtuben.
* Ta bort och släng ”supernatanten” (det som är ovanför den vita pelletsen) med hjälp av en plastpipett.
* Fyll centrifugtuben med ytterligare 1,5 ml salivlösning.
* Centrifugera tuben på maxfart i ca 2 min på samma sätt som tidigare.
* Ta bort och släng ”supernatanten” (det som är ovanför den vita pelletsen).

1. Ta fram en tom testtub (skruvlock) och tillsätt 1 ml lysbuffert (lysis buffer) med en mikropipett.
2. Överför 200 mikroliter lysbuffert från testtuben till centrifugtuben (som innehåller pelletsen) med hjälp av en mikropipett.
3. Gör så att pelletsen löser sig igen genom att röra om lite försiktigt med pipetten och genom att suga lite försiktigt med pipetten i lösningen.
4. Överför nu allt innehåll i centrifugtuben till testtuben med hjälp av mikropipetten (i den är det nu 800 mikroliter lysbuffert kvar).
5. Sätt på locket och vicka försiktigt fram och tillbaka så att innehållet blandas.
6. Använd en liten plastpipett och tillsätt 2 droppar proteaslösning till testtuben.
7. Sätt på locket på testtuben och tippa försiktigt testtuben flera gånger åt båda sidorna så att innehållet blandas.
8. Sätt ned testtuben i ett 37 graders varmt vattenbad i 15 min (enzymet proteas är mest aktivt vid denna temperatur).
9. Ta upp testtuben från vattenbadet och tillsätt 4 droppar NaCl-lösning (som finns i den vita flaskan) med en liten plastpipett.
10. Sätt på locket på testtuben och tippa försiktigt testtuben flera gånger åt båda sidorna så att innehållet blandas. Knäpp ev. försiktigt med pekfingret mot sidan av tuben.
11. Låt testtuben stå i rumstemperatur i ca 4 minuter.
12. Överför allt innehåll till en lång tub med ett vitt skruvlock. Använd en plastpipett.
13. Tillsätt 1 ml iskall alkohol (etanol eller 1-propanol) med hjälp av en stor graderad plastpipett. Håll tuben med 45 graders vinkel och pipettera ut alkoholen mot kanten (alldeles ovanför vätskeytan) så att alkoholen rinner längs kanten ned i lösningen.
14. Låt tuben stå still i ca 5 minuter.
15. Undersök om buntar med DNA-molekyler syns i gränsytan mellan saltlösningen och alkoholen! DNA-molekylerna har en vitaktig färg.

## Frågor att besvara:

Läs igenom den teoretiska bakgrunden och försök sedan att besvara följande frågor:

1. Vad menas egentligen med DNA-extraktion?
2. Varför använder man en lysbuffert?
3. Varför tillsätter man NaCl?
4. Varför tillsätter man enzymet proteas?
5. Varför tillsätter man alkohol?
6. Varför ska alkoholen helst vara iskall?
7. Varför tror du att man använder sig av ett varmt vattenbad?