

DNA-analyser:

Introduktion till DNA-analyser med PCR och gelelektrofores

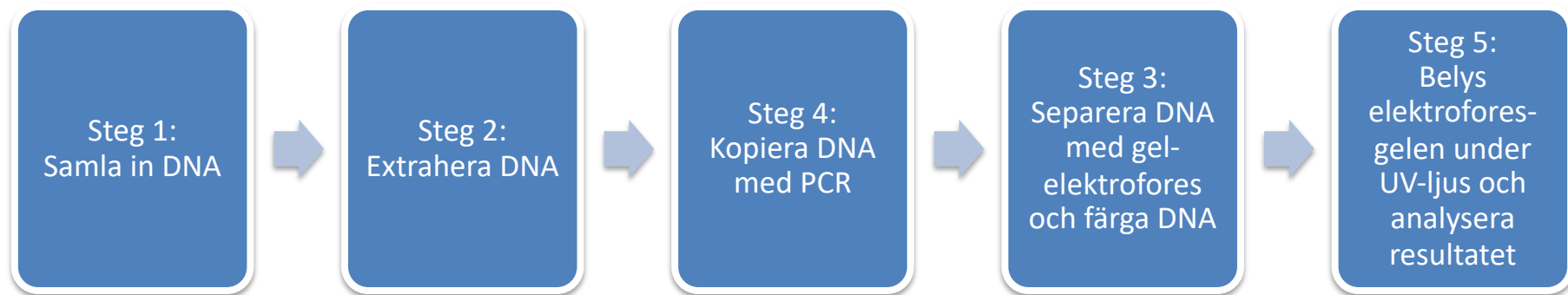
Niklas Dahrén



Användningsområden för DNA-analys

- Ta reda på vems DNA som har hittats på en brottsplats.
- Faderskapsanalys.
- Identifiera olika arter/upptäcka nya arter.
- Undersöka hur närbesläktade olika arter är.
- Släktforskning.
- Avslöja utdöda djurarters släktskap med nuvarande.
- Diagnosticera monogena genetiska sjukdomar.
- Upptäcka bakterier i t.ex. dricksvatten.

Översikt över DNA-analys med PCR och gelelektrofores



Steg 1: Samla in DNA

- ✓ Innan en DNA-analys kan göras måste DNA:t först samlas in.
- ✓ DNA kan samlas in från t.ex. olika kroppsvätskor (saliv, sperma, blod) som hittas på en brottsplats.
- ✓ DNA kan även samlas in från personer genom s.k. topsning i munnen eller genom blodprov.

Steg 2: Extrahera DNA

- ✓ Att extrahera DNA innebär att DNA:t renas fram från cellerna och att "skräpet" avlägsnas (med skräp menas t.ex. proteiner, cellmembran, organeller och annat som finns i cellen).
- ✓ Extraktionen sker genom tillsats av olika kemikalier och enzymer som löser upp cellmembranet och kärnmembranet och frigör DNA-molekylerna från histonerna etc.

Steg 3: Kopiera DNA med PCR

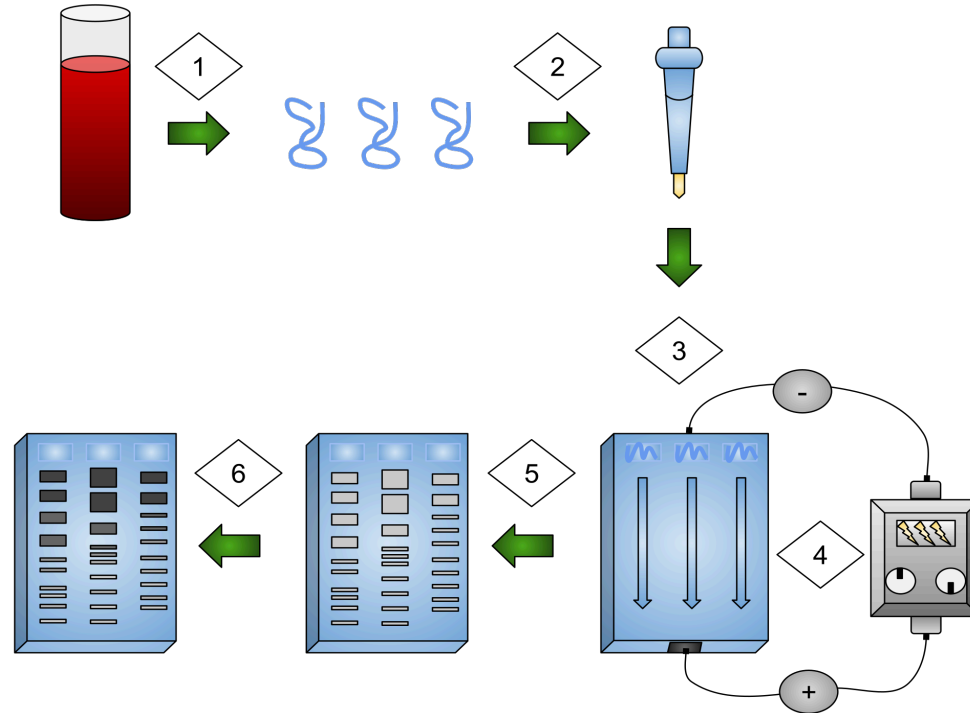


Bildkälla: "PCR masina kasutamine" by Karl Mumm - Own work. Licensed under CC BY-SA 3.0 via Wikimedia Commons - http://commons.wikimedia.org/wiki/File:PCR_masina_kasutamine.jpg#mediaviewer/File:PCR_masina_kasutamine.jpg

Steg 3: Kopiera DNA med PCR

- ✓ **PCR=** Polymerase chain reaction.
- ✓ **Syftet med PCR-metoden:** Med PCR-metoden kan vi kopiera upp de DNA-sekvenser vi är intresserade av så att dessa går att analysera med hjälp av en elektrofores i nästa steg. När vi gör en DNA-analys så vill vi nämligen inte analysera allt DNA i cellerna, utan vi vill enbart titta på vissa DNA-sekvenser.
 - Ska vi göra en medicinsk DNA-analys så vill vi titta på en eller flera specifika gener som är inblandade i sjukdomen och därför kopierar vi upp dessa i stora mängder.
 - Vill vi göra en kriminalteknisk DNA-analys eller faderskasanalys så vill vi titta på s.k. STR-sekvenser som finns utanför generna (p.g.a. stor variation mellan olika personer i dessa sekvenser) och därför kopierar vi upp dessa STR-sekvenser i stora mängder.
- ✓ **Fördelen med PCR-metoden:** Fördelen med PCR-metoden är att vi på ett relativt enkelt sätt kan få väldigt stora mängder av de DNA-sekvenser vi vill analysera även om provet från början bara består av ett fåtal celler med DNA. När PCR-metoden kom på 80-talet så revolutionerade det bl.a. kriminaltekniken eftersom det nu räckte med ytterst små mängder DNA från brottsplatsen för att kunna göra en DNA-analys.
- ✓ **Nobelpriset för PCR-metoden:** Kary Mullis fick nobelpriset i medicin 1993 för uppfinningen av PCR-metoden.

Steg 4: Separera DNA-sekvenserna med gelelektrofores och färga DNA-sekvenserna

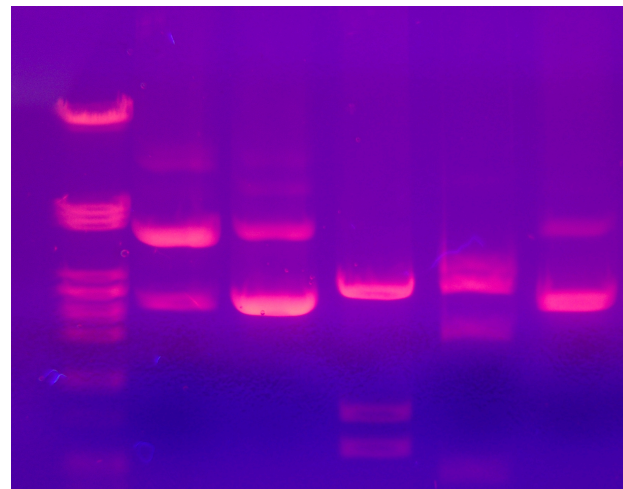


Steg 4: Separera DNA-sekvenserna med gelelektrofores och färga DNA-sekvenserna

- ✓ **DNA-sekvenserna separeras utifrån storlek:** I en elektrofores "tvingar" man de olika DNA-sekvenserna att "vandra" genom en gel. Vandringen sker p.g.a. att en spänning kopplas på. DNA-sekvenserna är negativt laddade och kommer därför vandra från minuspolen i riktning mot pluspolen. Gelen som DNA-sekvenserna ska vandra genom liknar en "djungel". Ju större DNA-sekvenserna är desto svårare är det för dessa att ta sig igenom "djungeln". Efter en bestämd tid stänger man av spänningen. Korta DNA-sekvenser har då vandrat långt i gelen medan långa DNA-sekvenser har vandrat en kort bit. Ett bandmönster uppkommer i gelen där varje band motsvarar DNA-sekvenser med samma storlek (olika DNA-sekvenser kan alltså finnas i samma band om storleken av DNA-sekvenserna är detsamma).
- ✓ **Färgning av DNA-sekvenserna före eller efter elektroforeskörningen:** För att vi ska kunna se bandmönstret under UV-lampan i nästa steg så måste DNA-sekvenserna färgas. Färgningen kan antingen göras före själva gelelektroforesen (tillsätter ett fluorescerande ämne i gelen vid själva geltillverkningen) eller efter att gelelektroforeskörningen är klar genom t.ex. etidumbromidkort som läggs på gelen under tryck.

Steg 5: Belys gelen med UV-ljus och analysera resultatet

- ✓ **Efter gelelektroforeskörningen och färgningen** kan vi placera gelen på ett UV-bord. Om vår DNA-analys har fungerat (kopieringen med PCR och elektroforeskörningen) så ska det synas ett bandmönster på gelen.
- ✓ **Varje band i gelen motsvarar stora mängder** av en specifik DNA-sekvens. Ibland kan ett band i gelen innehålla flera olika DNA-sekvenser, men då är dessa sekvenser exakt lika långa (annars skulle de inte hamna på samma plats i gelen).
- ✓ **DNA-stege:** Längst till vänster i gelen brukar man placera en s.k. DNA-stege (ser ut ungefär som en repstege i gelen). Det är ett DNA-prov som innehåller ett flertal olika DNA-sekvenser med olika kända längder. Detta prov används som referens för att se om elektroforeskörningen har fungerat och även som en storleksreferens om man vill ta reda på storleken av de DNA-sekvenser man har analyserat i sina prov.



Bildkälla: By Mnolf - Photo taken in Innsbruck, Austria, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1131449>

Tips på filmklipp att titta på:

- ✓ Geleetrofores: <https://www.youtube.com/watch?v=ZDZUAleWX78>

Se gärna fler filmer av Niklas Dahrén:

<http://www.youtube.com/Kemilektioner>

<http://www.youtube.com/Medicinlektioner>

