Restriktionsanalyse

**- et teoretisk eksperiment**

I ”eksperimentet her” skal I vise, hvordan restriktionsenzymer kan klippe DNA i stykker og hvordan man efterfølgende kan adskille de fremkomne DNA-stykker (DNA-fragmenter) vha. en gelelektroforese.

Materialer:

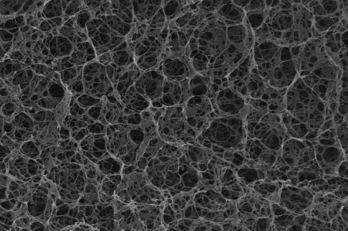
Sakse forsynet med mærkeseddel med angivelse af restriktionsenzym

DNA-stykker på papirstimler

Papirversion af elektroforesekar

Fremgangsmåde:

1. DNA klippes med restriktionsenzymer
2. Find først papirstykkerne med DNA-sekvenserne. På papiret ses et par lange rækker af bogstaverne A, T, C og G. De skal symbolisere rækkefølgen af de N-holdige baser på nukleotiderne i DNA-molekylet.
3. Tag en af de udleverede sakse og noter hvilket restriktionsenzym, saksen skal symbolisere. Noter både enzymets navn og den basesekvens, det klipper ved.
4. Kig DNA-sekvensen igennem og undersøg, om der er steder på DNA-stykket, hvor enzymet kan klippe det over. Vær omhyggelig – man kan godt komme til at overse klippesteder.
5. Brug saksen, restriktionsenzymet, til at klippe DNA’et de fundne steder. HUSK at restriktionsenzymet ikke klipper DNA-strengen lige over.
6. Sørg for at holde styr på, hvilket restriktionsenzym der er brugt til at frembringe DNA-stykkerne (skriv evt. restriktionsenzymets navn på bagsiden af hver DNA-stykke)
7. Gentag punkt 1-5 med en anden saks, der symbolisere et andet restriktionsenzym.
8. Gentag punkt 1-5 men brug begge restriktionsenzymer på det samme DNA-stykke. Klip DNA-stykket først med det ene og dernæst med det andet enzym.
9. Iagttag hvor mange stykker DNA, der er fremkommet ved hver klipning og sammenlign DNA-fragmenternes størrelser.
10. DNA-fragmenter adskilles ved gelelektroforese
11. Find ”elektroforesekarret” – papiret med angivelser af 3 brønde og positiv/negativ pol.
12. Tag de fremkomne DNA-stykker fra de 3 klipninger med et eller to restriktionsenzymer. Placér dem i hver deres brønd ved at lægge dem oven på den afmærkede firkant på papiret.
13. Papiret symboliserer en agarosegel – en geleagtig masse, der består af sammenbundne, spiralformede agarosemolekyler og vand med lidt opløste salte i. Agarosemolekylerne danner, som vist på figur 1 et 3-dimensionelt netværk. Hulrummene mellem agarosesmolekylerne fyldes i den våde gel ud af vandet med de opløste salte. Forestil dig at denne gel er placeret i saltvand. Når elektroforesekarret tilsluttes en strømkilde, vil der dannes en negativ og en positiv pol i karret. Det er angivet med ÷/+ på papiret.
14. DNA-fragtmenterne er alle negativt ladede og er i punkt 2 blevet placeret i brøndene ved den negative pol. De vil nu begynde at vandre ned gennem gelen mod en positive pol. Store DNA-fragtmenter har svært ved at komme gennem netværket i gelen og vandre langsomt afsted. Små DNA-fragmenter kan lettere komme gennem netværket og vandre derfor hurtigere.
15. Lad nu DNA-stykkerne vandre ned gennem gelen. Tag en brønd af gangen.
16. Tegn det resultat I kommer frem til eller tag et foto af det.
17. Hvad ville der ske, hvis gelen kun var tilsluttet en strømkilde i meget kort tid? Flyt DNA-fragmenterne på papiret, så det passer med en kortvarig tilslutning af strøm og tegn/fotografer resultatet.
18. Hvad ville der ske, hvis gelen var tilsluttet en strømkilde i meget lang tid? Flyt DNA-fragmenterne på papiret, så det passer med en længerevarende tilslutning af strøm og tegn/fotografer resultatet.
19. Koncentrationen af agarose i gelen kan varieres. Hvordan vil en højere koncentration af agarose påvirke jeres resultat? Flyt igen DNA-fragtmenterne så det passer med en højere koncentration af agarose.

   
Figur 1. Foto af agarosenetværk.   
(Fra <http://www.npl.co.uk/science-+-technology/advanced-materials/characterisation-of-tissue-scaffold> )

DNA-sekvenser:

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| G | G | T | C | T | G | C | A | G | G | G | A | A | T | T | C | T | G | C | A | G | A | A | T | T | C | C | G | A | A | T | A | C | A | G | G | T | C | T | G | C | A | G | G | G | A | A | T | T | C | T | G |
| C | C | A | G | A | C | G | T | C | C | C | T | T | A | A | G | A | C | G | T | C | T | T | A | A | G | G | C | T | T | A | T | G | T | C | C | A | G | A | C | G | T | C | C | C | T | T | A | A | G | A | C |

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| G | G | T | C | T | G | C | A | G | G | G | A | A | T | T | C | T | G | C | A | G | A | A | T | T | C | C | G | A | A | T | A | C | A | G | G | T | C | T | G | C | A | G | G | G | A | A | T | T | C | T | G |
| C | C | A | G | A | C | G | T | C | C | C | T | T | A | A | G | A | C | G | T | C | T | T | A | A | G | G | C | T | T | A | T | G | T | C | C | A | G | A | C | G | T | C | C | C | T | T | A | A | G | A | C |

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| G | G | T | C | T | G | C | A | G | G | G | A | A | T | T | C | T | G | C | A | G | A | A | T | T | C | C | G | A | A | T | A | C | A | G | G | T | C | T | G | C | A | G | G | G | A | A | T | T | C | T | G |
| C | C | A | G | A | C | G | T | C | C | C | T | T | A | A | G | A | C | G | T | C | T | T | A | A | G | G | C | T | T | A | T | G | T | C | C | A | G | A | C | G | T | C | C | C | T | T | A | A | G | A | C |

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| G | G | T | C | T | G | C | A | G | G | G | A | A | T | T | C | T | G | C | A | G | A | A | T | T | C | C | G | A | A | T | A | C | A | G | G | T | C | T | G | C | A | G | G | G | A | A | T | T | C | T | G |
| C | C | A | G | A | C | G | T | C | C | C | T | T | A | A | G | A | C | G | T | C | T | T | A | A | G | G | C | T | T | A | T | G | T | C | C | A | G | A | C | G | T | C | C | C | T | T | A | A | G | A | C |

Restriktionsenzymer og deres klippesteder:

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| - | T | G | C | A | - |
| - | A | C | G | T | - |

PstI:

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| - | A | A | T | T | - |
| - | T | T | A | A | - |

EcoRI: