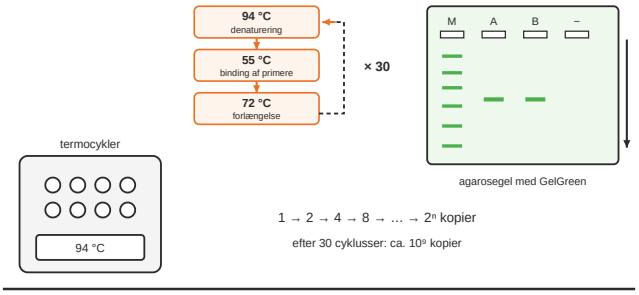
Første PCR: fra skabelon til bånd på gelen

Navn: Klasse: Dato:

> **Hvordan kan man lave mange kopier af et bestemt stykke DNA, og passer produktets længde med den, der kan forudsiges ud fra primerne?**



Første PCR: fra skabelon til bånd på gelen

Vores hypotese

Det skal I bruge

- PCR Express Kit: Princip og implementering af PCR
- PCR thermocycler 16 brønde
- phorEasy elektroforesesystem
- PCR/DNA agarosegelkit + TAE-buffer + GelGreen™-farvestof
- Mikropipette, justerbar, 2-20 µl
- Mikropipette, justerbar, 20-200 µl
- Kølet stativ til PCR-mikrorør
- Farvet mikrorør – rød
- Bægerglas 400 ml
- Måleglas 250 ml
- Ohaus Scout SKX vægt, 220 g
- Beskyttelsesbriller, komfort
- Nitrilhandsker, Medium
- Pipettespidser til mikropipetterne (findes ikke i LabDidakts sortiment)
- Mikrobølgeovn til at smelte agarose
- Is eller køleelementer til det kølede stativ
- Demineraliseret vand
- Affaldsbeholder til brugte spidser og rør
- Computer eller tablet med termocyklerens software (valgfrit)

Sikkerhed

Der arbejdes kun med en færdig DNA-skabelon fra sættet, og der laves ingen genmodificerede organismer. Brug handsker og beskyttelsesbriller. Smeltet agarose kan koge over og give forbrændinger: varm i korte intervaller, sving flasken eller glasset med en varmehandske, og lad den køle til ca. 60 °C, før gelen støbes. Termocyklerens låg og blok bliver op til ca. 100 °C, så åbn den først, når programmet er færdigt. GelGreen er et DNA-farvestof: undgå hudkontakt, og opsaml gel og buffer som affald efter skolens regler. Elektroforesen kører med strøm, så låget skal være lukket, mens den kører, og der må ikke spildes buffer på apparatet. Kig ikke direkte ind i det blå lys uden filteret i låget. Læreren skal følge skolens retningslinjer og sikkerhedsdatabladene.

Sådan gør I

1. Før forsøget: Find skabelonens sekvens og primernes sekvenser i sættets materiale. Markér, hvor de to primere binder, og beregn, hvor mange basepar produktet bliver.

2. Hold reagenserne kolde i det kølede stativ. Pipettér PCR-blandingen, primerne og skabelonen sammen i et PCR-rør efter sættets vejledning, og lav også en negativ kontrol uden skabelon. Skift spids mellem hvert reagens, og bland ved at pipettere forsigtigt op og ned.
3. Sæt rørene i termocykleren, og start programmet fra sættets vejledning. Et typisk program er en kort opvarmning til ca. 94 °C og derefter 25-30 cyklusser med denaturering ved ca. 94 °C, binding af primere ved ca. 55 °C og forlængelse ved ca. 72 °C. Følg cyklusserne på termocyklerens skærm eller i softwaren.
4. Mens PCR'en kører, støbes gelen: Bland TAE-bufferen, og smelt agarosen i bufferen i mikrobølgeovnen. Lad den køle lidt, tilsæt GelGreen, og hæld gelen i støbebakken med kammen i. Lad den stivne.
5. Læg gelen i elektroforeseapparatet, og dæk den med buffer. Fjern kammen forsigtigt. Pipettér DNA-stigen i den første brønd og PCR-produkterne og den negative kontrol i de næste. Notér rækkefølgen.
6. Luk låget, og start elektroforesen. DNA er negativt ladet og vandrer mod den positive pol. Følg båndene i det blå lys, mens de vandrer.
7. Tag et billede af gelen. Bestem PCR-produktets længde ved at sammenligne med stigen, fx ved at tegne log(antal basepar) mod vandringsafstanden for stigens bånd og aflæse produktet på kurven.
8. Sammenlign med jeres forudsigelse, og vurdér den negative kontrol. Beregn, hvor mange kopier der teoretisk er dannet efter det antal cyklusser, I har kørt.

Vores målinger

Bane	Prøve	Forventet længde (bp)	Vandringsafstand (mm)	Målt længde (bp)

Graf eller tegning

Spørgsmål

1. Hvor langt forudsagde I, at produktet ville blive, og hvad viste gelen?

2. Hvad er formålet med hver af de tre temperaturer i en cyklus?

3. Hvorfor skal DNA-polymerasen være varmestabil?

4. Hvad viser den negative kontrol, og hvad betyder det, hvis der er et bånd i den?

5. Hvor mange kopier er der teoretisk efter 30 cyklusser, og hvorfor bliver det færre i virkeligheden?

Vores konklusion