

## Kort framgangsmåte til **Gentesting av storfamilie** (Nature's dice)

### Forberedelser

1. Merk 24 prøverør fra nr. 1 til nr. 24 og fordel 25  $\mu$ l fra de tre DNA-løsningene i prøverør som angitt i protokollen fra NCBE avhengig av om dere skal studere en autosomal recessiv tilstand eller en kjønnsbundet tilstand.
2. Merk 4 rør med M for DNA-størrelsesmarkør til sett 2  $\mu$ l av standarden (1  $\mu$ g/  $\mu$ l) dvs. 2  $\mu$ g, 18  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O og 2  $\mu$ l loadingbuffer til hvert av rørene.
3. Sett vannbad eller inkubator på 37 °C.
4. Lag også til utstyr og reagenser til gelelektroforese før dere skal kjøre det:
  - a. Fortynn elektroforesebuffer (TBE) og fargeløsning til 1X konsentrasjon (pass på at du har nok til alle gelene).
  - b. Støp 0,8 % agarosegeler dersom dere ikke bruker ferdigstøpte geler (se egen prosedyre).
  - c. Sett opp elektroforesekaret og spenningskilde samt fargekar.
5. Fordel utstyr på arbeidsstasjonene, ett rør med DNA og ett med restriksjonsenzym til hver elev, ett ark med slektstre til hver elev, pipetter og pipettespisser, skumstativ, lastebuffer, merkepenn, avfallsbokser, labfrakker, vernebriller, engangshansker

### Selve forsøket

#### *Kutting av DNA (1 time)*

1. Ta 20  $\mu$ l av DNA-løsningen du har fått utdelt over i mikrorøret med tørket restriksjonsenzym. Det er viktig å blande godt, og det gjør du ved å dra væsken inn og ut av pipettespissen. Enzymet er farget blått, slik at du kan se når enzymet er løst skikkelig i DNA-løsningen.
2. Sett lokket på mikrorøret.
3. Skriv nummeret ditt (står på DNA-løsningen) på prøven med en vannfast penn. Skriv langt oppe på røret slik at tallet ikke blir gnidd av.
4. Sett prøven din i skumstativet sammen med de andres DNA-prøver.
5. Sett prøvene i vannbad eller varmeskapet for inkubasjon ved 37 °C i 45 minutter. Restriksjonsenzymene vil nå kutte DNA-et på spesifikke plasser.

Her kan dere fortsette med å kjøre gel eller sette prøvene i kjøleskap og kjøre gel dagen etter.

#### *Gelelektroforese*

1. Tilsett 2  $\mu$ l lastebufferbuffer til hver av prøvene. Bland og samle prøven ved å flikke på røret og bank det så legg på bordet for å samle prøven i bunnen av røret igjen. Bruk mikrosentrifuge dersom dere har det.



2. Sett opp gelelektroforeseutstyret (se punkt 4 under forberedelser), legg gelen i elektroforesekaret med brønnene mot negativ pol og hell over 1X elektroforesebuffer.
3. Last prøvene (22  $\mu$ l) på gelene.
4. Last 2  $\mu$ g DNA-størrelsesmarkør i en av brønnene, dvs. hele blandingen på 22  $\mu$ l i røret som er merket M.
5. Sett lokket på elektroforesekaret, koble til spenningskilden og kjør gelen ved 100 V i 30 minutter (kan ta opp til en time avhengig av tykkelse på gelen med mer).
6. Følg med hvordan lastebufferen vandrer.
7. Stopp gelen før fargefronten går ut av gelen. Husk å slå av spenningskilden før dere tar lokket av elektroforesekaret.
8. Legg gelen i et kar og hell over 10 ml Azur A fargeløsning. La stå i akkurat 4 minutter.
9. Hell av fargeløsningen tilbake i beholderen og bruk den igjen senere.
10. Skyll gelen med kaldt deionisert vann. Hell av vannet.
11. Legg gelen i vann over natt.

#### *Analyser resultatet*

1. Skriv ned hvor mange bånd det var i hver av prøvene.
2. Fyll inn alles resultater i slektstreet.
3. Se på arvegangen, er det som forventet?