

DNA ekstraksjon gruppe 2

Date: 2024-09-05

Tags: DNA

Created by: Sivert Helland Veseth

Purpose:

Ekstrahere DNA fra heil-blod og analysere ACTN3 genotypen ved hjelp av PCR og elektroforese-separasjon av DNA-fragmenter.

Methods:

Extraction of DNA from whole blood / Utført 05.09.2024

Background

This protocol is adopted from Bartlett, J. M. S. and D. Stirling (2003), PCR protocols, Ch 6.

Materials

- 15 ml centrifuge tubes
- 1.5 ml centrifuge tubes
- Waterbath (65°C)
- Tube rotator

Methods

Blood can be collected in heparin or EDTA-vacutainer tubes. Process samples on the same days as collection if stored at room temp.

1. Move 3mL of whole blood to a 15 mL tube.
2. Add 12 mL of **Reagent A**
3. Mix slowly by rotation, 4 min at room temp.
4. Centrifuge 3000 g for 5 min at room temp.
5. Discard supernatant without disturbing cell pellet. Remove all moisture by inverting and blotting on paper or by pipetting.
6. Add 1 mL of **Reagent B**, vortex to re-suspend the cell pellet.
7. Add 250 µl of **5 M sodium perchlorate** and mix by inverting tube several times. ⚠ Sodium perchlorate is harmful if swallowed and causes irritation. Keep away from heat.
8. Place the tube in 65°C waterbath for 15-20 min.
9. Cool to room temp. 10 Add 2 mL of ice-cold **chloroform**. ⚠ Toxic, perform operation in fume hood with appropriate protective equipment.
10. Mix on a rotating mixer for 30 to 60 minutes (more or less will reduce DNA yield).
11. Centrifuge, 2400g for 2 min. Careful not to disturb the separated phases.

12. Transfer upper phase into a clean falcon tube with a sterile pipette.
13. Precipitate the DNA by adding 2-3 mL of chilled **100% ethanol**, invert tube. DNA should appear in the solution.
14. Transfer the DNA to a 1.5 mL tube allow to air dry.
15. Resuspend in 200 ul of **TE buffer**.
16. Quantify DNA concentration with the spectrophotometer, 200-500 ng/ul is expected.

Solutions

0.5 M EDTA, pH 8, for 1 l:

COMPONENT	WEIGHT
EDTA	146.1 g
NaOH	~20g

Add EDTA to 800 mL ddH₂O, adjust pH with NaOH. Autoclave 15 psi, 15 min.

1 M Tris-HCl, pH 7.6, for 1 L:

COMPONENT	WEIGHT
Tris-base	121.1 g

Add to 800 mL ddH₂O, adjust pH with HCl and make up to 1L. Autoclave 15 psi, 15 min.

Reagent A, red blood cell lysis, pH 8. For 1L:

COMPONENT	CONCENTRATION	WEIGHT/VOLUME
Tris-HCl	0.01 M	10 ml 1 M Tris-HCl
Sucrose	320 mM	109.54 g
MgCl ₂	5 mM	0.47 g
Triton X-100	1%	10 mL

Adjust pH to 8 with NaOH. Autoclave 10 psi, 10 min.

Reagent B, cell lysis

COMPONENT	CONCENTRATION	WEIGHT/VOLUME
Tris-HCl	0.4 M	400 mL 1 M Tris-HCl
NaCl	150 mM	8.76 g
EDTA	0.06 M	120 mL 0.6 M EDTA
SDS	1%	10 g ¹

Adjust pH to 8 and make to 1 L with ddH₂O. Autoclave at 15 min at 15 psi².

5 M sodium perchlorate, for 100 mL:

COMPONENT	WEIGHT/VOLUME
sodium perchlorate	70 g

Dissolve in 80 mL ddH₂O make to 100 mL.

TE-buffer, for 1 L:

COMPONENT	CONCENTRATION	WEIGHT/VOLUME
Tris-HCl	0.01 M	10 mL 1 M Tris-HCl ph 7.6
EDTA	1 mM	2 mL 0.5 EDTA

Adjust pH to 7.6, make to 1 L, autoclave 15 min at 15 psi.

Chloroform, chill to 4°C.

Ethanol (100%), chill to 4°C.

Avvik:

Pkt 2 - Pipettering: Tok litt for mykje av Reagent A og måtte ta ut litt av tuben med helt blod (dette var prøven til Sivert).

Pkt 4 - Sentrifugert 15 min på 1400 G.

Pkt 8 - Ble ikkje satt i vannbad, men i oppvarmet metalformer.

Pkt 11 - Sentrifugert 1400 g på 6 min.

+ Etter pkt 15 ble prøvene sentrifugert i 7 sek på 7.5 rpm. Etterpå ble de liggende i 20 min, så i vortex i 20 sek også 5 sek i sentrifuge på 7.5 rpm

Prøven til Sivert feilet å få frem DNA. Mistenker at det kanskje kan ha med at under den første pippeteringen, der supernatet ble tatt vekk, så ble noe av celle-pellet tatt med.

Determination of ACTN3 genotype / Utført 06.09.2024

Background

This protocols is adopted from Schadock et al. (2015)¹ and is suitable for determining the ACTN3 genotype.

Materials

- A PCR machine
- Specific primers

Primers used un Schadock et al.

PRIMER	SEQUENCE	FINAL REACTION CONCENTRATIONS	VOLUME OF 100 UM IN 500 UL PRIMER MIX
hsACTN3_F1	CGCCCTTCAACAACTGGCTGGA	0.5 uM	10 ul
hsACTN3_R1	GATGAGCCCGAGACAGGCAAGG	0.5 uM	10 ul
hsACTN3Tif_F2	CAACACTGCCCGAGGCTGACTG	0.125 uM	2.5 ul
hsACTN3Cir_R2	CATGATGGCACCTCGCTCTCGG	0.25 uM	5 ul

Add primers to 472.5 ul nuclease free H₂O to make a 4X primer mix.

- PCR master mix
- PCR reactions tubes

Methods

- Extract DNA (from whole blood or muscle)
- Mix sample, master mix and primer mix per reaction in a PCR reaction tube:

COMPONENT	VOLUME
2X Master mix	10 ul
Primer mix	5 ul
Sample (correspondning to 100-250 ng genomic DNA)	5 ul

- Run the PCR reaction

TIME	TEMPERATURE	CYCLES
2 min	95°C	
10 sec	95°C	
10 sec	68°C	35 cycles
45 sec	72°C	
2 min	72°C	

- Run the PCR product on a 2% agarose gel using 2-5 ul of the reaction mix. Use a DNA ladder and H₂O as negative control.

Analysis

A R/R genotype produces two bands at 690 and 413 bp. A X/X genotype produces two bands at 690 and 318 bp.

Avvik:

Litt usikkerhet om det ble tilsatt primer i den ene prøven til Jens.

General DNA Agarose Gel Electrophoresis protocol

Background

This protocol is suitable for electrophoresis separation of DNA fragments from PCR reactions.

Solutions

- 10X TBE, for 1 l:

COMPONENT	WEIGHT	CONCENTRATION
Tris base	121.1 g	1M
Boric acid	61.8 g	1 M
EDTA (disodium salt)	7.4 g	0.02 M

- 6X DNA loading dye, for 10 ml:

COMPONENT	AMOUNT	CONCENTRATION
Glycerol	3 ml	30 %
Bromophenol blue	25 mg	0.25%

Make to 10 ml final volume.

Materials

- Horizontal electrophoresis unit with power supply
- Conical flask for gel preparations
- Heat (microwave or hotplate)
- Gel combs

Methods

Gel preparation

- Dilute 10X TBE buffer to make a 1X solution (100 ml in 900 ml H₂O).
- Add 100 ml of 1X TBE to a conical beaker. Add agarose to create a suitable percentage gel (2 g for 2% gel).
- If using Sybr Safe gel stain, add the stain 1:10000 to the mixture (10 ul in 100 ml)
- Heat the mixture until the solution gets clear (e.g. 1 min in microwave or on a hotplate).
- Let the mixture cool to about 60 degrees (it should feel warm but not hot).
- Pour the mixture into a gel casting tray and place the comb at its designated place.
- The gel will polymerize in 1 h, remove the comb after polymerization.

Running the gel

- Place the gel in the electrophoresis unit.
- Pour 1X TBE into the electrophoresis tank to cover the well.
- Mix samples with loading dye (1 ul of 6X dye per every 5 ul of sample).
- Add DNA ladder and samples to the wells
- Set voltage to 150 V, run four about 1 h (until dye is about 80% through), check that samples moves towards the positive elctrode!

Visualisation

- Visuialize the gel i G:Box using the UV light emitter and Sybr green settings.

Brønn nr. 1: DNA-stige

Brønn nr. 2 og nr. 3: Anders

Brønn nr. 4 og nr. 5: Adrian

Brønn nr. 6 og nr. 7: Jens

Brønn nr. 8: DNA-stige

Brønn nr. 9, 10, 11 og 12: Hennie

Avvik

Kom en liten sky over brønn nr. 5 som var Adrian sin.

Prøve som skulle i brønn 9 havnet utenfor brønnen og i væsken.

Stod i 53 min på 150 V.

Tilsetter Sybr Safe gel stain etter vi har varmet opp gelen.

På prøvene til Adrian var det ulik farge etter tilsetningen av fargestoffet. Mistenker også at det ikkje ble påført nok mengde av DNA i blandingen.

Results:

Extraction of DNA from whole blood

Spectrometer (rekkefølge)

4 første rutene er TE

4 neste rutene er Anders

4 neste rutene er Adrian

4 siste rutene er Jens

Avlesing av dei 4 rutene: starter oppe til venstre -> høgre -> venstre rad 2 -> høgre rad 2

Konsentrasjon

- Anders (4 rutene etter TE-kontroll) = 1. 525.7598 / 2. 520.7598 / 3. 514.0931 / 4. 518.7010 - **cov** = 0.9306584

- Adrian (4 neste rutene) = 1. 509.4853 / 2. 487.8186 / 3. 507.4265 / 4. 493.3088 - **cov** = 2.12284

- Jens (4 siste rutene) = 1. 221.2500 / 2. 219.1912 / 3. 223.6029 / 4. 223.9951 - **cov** = 1.007233

260/280 ratio

- Anders (4 rutene etter TE-kontroll) = 1. 1.9117 / 2. 1.9181 / 3. 1.9206 / 4. 1.9195 - **cov** = 0.207753

- Adrian (4 neste rutene) = 1. 1.9125 / 2. 1.9128 / 3. 1.9146 / 4. 1.9109 - **cov** = 0.07928975

- Jens (4 siste rutene) = 1. 1.9137 / 2. 1.9105 / 3. 1.9018 / 4. 1.9105 - **cov** = 0.2677152

260/230 ratio

- Anders (4 rutene etter TE-kontroll) = 1. 2.2953 / 2. 2.2941 / 3. 2.3025 / 4. 2.3040 - **cov** = 0.2174121

- Adrian (4 neste rutene) = 1. 2.2960 / 2. 2.3053 / 3. 2.3102 / 4. 2.2972 - **cov** = 0.2935868

- Jens (4 siste rutene) = 1. 2.3821 / 2. 2.3800 / 3. 2.3650 / 4. 2.2977 - **cov** = 1.68646

Ref verdier*:

Konsentrasjon = 200 til 500 ng per mikroliter

260/280 = 1.8 - sier noko om det er forurenset med materier som protein eller phenol

260/230 = 2 til 2.2 - sier noko om det er forurenset med materier som karbohydrat, phenol eller glykogen.

*Wilfinger WW, Mackey K, Chomczynski P. Effect of pH and Ionic Strength on the Spectrophotometric Assessment of Nucleic Acid Purity. BioTechniques 1997;22(3):474-81.

*<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/Product-Bulletins/TN52646-E-0215M-NucleicAcid.pdf>

General DNA Agarose Gel Electrophoresis protocol

Anders: Et bånd rett over 300 bp, ingen bånd ved 690 bp i brønn nr.2 og nr.3.

Adrian: Ser ingen bånd.

Jens: Et bånd rett over 300 bp og et bånd under ved brønn nr.7, ingen bånd ved brønn nr.8.

Conclusion

Basert på at vi teller første trinn som 50 bp og øker hvert trinn med 50 bp, indikerer resultatene at Anders har genotype RR i begge brønnene. For Adrian var det imidlertid ikke mulig å lese av genotype, uavhengig av brønn. Jens sin prøve i brønn nr. 2 viser to bånd, men et av båndene, plassert ved 350 bp, samsvarer ikke med noen av de forventede genotypene, noe som gjør det utfordrende å tolke hans resultat. Jens sin andre prøve viser ingenting.

Ingen av prøvene viser et bånd rundt 690 bp, som normalt ville fungert som en kontroll for å bekrefte gyldigheten og kvaliteten av våre resultater. Dette manglende kvalitetsstempet fører til at vi tolker våre resultater som ikke valide.

Vi mistenker at feilen oppsto på dag 2, gitt at spektrofotometriske verdier fra dag 1 var tilfredsstillende. Selv om det er vanskelig å nøyaktig fastslå hvor feilen skjedde, antar vi at feil under pipetteringen utgjør den største feilkilden, på grunn av begrenset erfaring og tekniske ferdigheter i gruppen. En mulig årsak til manglende validering kan være at én prøve, i brønn nr. 9, havnet utenfor brønnen og kom i kontakt med buffervæskan.

Det er også verdt å nevne at gruppe 1 sto for tilberedningen av primermiksen, mens gruppe 2 (oss) tilberedte mastermiksen. Dette gjorde det vanskelig for noen av gruppene å kvalitetssikre eventuelle avvik i de ulike prosessene.

Gitt gruppens begrensede erfaring og kunnskap innen molekylærbiologiske teknikker, er det mulig at avvik har oppstått uten at vi som gruppe har identifisert dem.

Attached files

bloxberg-proof_2024-09-06T1318420200.zip (Timestamp archive by Sivert Helland Veseth)
sha256: 2dabf449b84660ee44c07653010c0690b74fab58800931ad32863d09a2cc368a

IDR4000_DNA_agarose_ACTN3_gr.12.tif (Gr. 2 har brønn 2 til 8.)
sha256: a1572bc77bfc150c984ef92d37ed8d801bcd67b27a8e82c9cecc093b477829b



Unique eLabID: 20240905-10827dc6fdeb94d74d5c478021ab156466c35cb7
Link: <https://elab.inn.no/experiments.php?mode=view&id=84>