

# DNA-ekstraksjon fra fullblod

**Date:** 2023-09-06

**Tags:** DNA

**Created by:** Petter Leistad

---

## Mål

Trene på og gjøre et forsøk på å utvinne DNA fra fullblod.

## Generelle rutiner i molekylærlab

- Bruk alltid labfrakk og hansker, og ha på heldekkende sko. Det er ikke tillatt med mat og drikke på laben. Hold området rent og ryddig.
- EcoOnline: kjemikalier
  - <https://www.ecoonline.com/no/>
  - EcoOnline er en ressurs for å lese seg opp på ulike kjemikalier. Her finnes det info om fare knyttet til stoffet og hvordan man kan minimere risikoen og håndtere kjemikalet (MSDS: material safety data sheet)
- Avfallshåndtering
  - Sjekk MSDS for å finne ut av hvordan en kjemikalie skal håndteres når det skal kastes.
  - Vær nøye med kildesortering og farlig avfall.
  - Biologisk avfall kastes i gule bøtter og kjemikalieavfall destrueres lokalt
- Kjemikalisikring i praksis
  - Sørg alltid for å ha personlig verneutstyr.
  - Det innebærer labfrakk, hansker, briller og tilstrekkelig avtrekk.
  - Pass på søl og skader.
  - Dersom noe skulle søles eller noen skades, sjekk EcoOnline for informasjon

### • Labjournal

- Labjournalen fungerer som en "dagbok" som skal inneholde metode (protokoll og evt. avvik), resultat og konklusjon.
  - Det er viktig å merke alt av prøver korrekt. DINE: **D**ato, **I**nnhold, **N**avn og **E**ksperiment
  - Dette hjelper samarbeidspartnere og deg selv å forstå hva du har gjort.
  - En god journal er essensielt når en skal skrive masteroppgave.
- Journalen føres elektronisk i elab.inn.no

# Metode

## Modulkurs 1: DNA ekstraksjon og -analyse

DNA ekstraksjon:

1. Danning av lysat
2. Rensing av lysatet
3. Binding til "purification matrix"
4. Vasking
5. Elution

DNA analyse/PCR:

1. DNA amplification
2. Genotyping, f.eks. gel elektroforese

## Protokoll DNA ekstraksjon og -analyse

### DNA ekstraksjon

1. Ta en blodprøve i et EDTA-rør
2. Overfør 3 ml helblod over i et 15 ml glassrør (vakuum-glassrør)
3. Overfør 12 ml av *Reagent A* over i 15 ml i røret.
4. Miks dette sakte sammen i romtemperatur i 4 min
5. Sentrifuger 15 ml rør på 3000 g i 5 min i romtemperatur \*
6. Fjern supernatanten uten å røre pelleten. Dette kan gjøres ved blotting på papir eller pipettering \*\*
7. Overfør 1 ml av *Reagent B* over i glassrøret og bland med pelleten
8. Overfør 250 µl med 5 M *sodium perchlorate* og miks dette sammen ved å vende røret flere ganger
9. Sett røret i 65°C vannbad i 15-20 min \*\*\*
10. Kjøl ned røret til romtemperatur
11. Overfør 2 ml iskald *kloroform*
12. Miks dette sammen i 30-60 min \*\*\*\*
13. Sentrifuger på 2400 g i 2 min. Pass på så lagene ikke blander seg
14. Overfør det øverste (blanke) laget over i et falcon rør. Pass på å ikke bryte hinnen
15. Overfør 2-3 ml av kjølig 100% *etanol* og vend røret. DNA skal bli synlig \*\*\*\*\*
16. Overfør DNA til et 1,5 ml rør og la det tørke
17. Overfør 200 µl med *TE buffer* \*\*\*\*\*
18. Kvantifiser DNAet med et spektropometer. 4 brønner med *TE-buffer*, 4 brønner med DNA. 200-500 ng/µl er forventet

\* vi sentrifugerte 2 x 8 min på 2600g fordi sentrifugen vi egt. skulle bruke var ødelagt

\*\* pelleten var ikke fast nok til å kunne blottes, så vi fjernet så mye supernatant som mulig uten å komme borti pelleten

\*\*\* vi brukte vannblokk

\*\*\*\* 54 min

\*\*\*\*\* DNA ble ikke synlig. Foreleser tilsatte ytterligere 1,5 ml 100% etanol og satte prøvene i fryseren (-20°C) over natta

\*\*\*\*\* 100 µl TE buffer

### Resultat DNA ekstraksjon:

DNA dukket ikke opp i løsningen på trinn 14 av DNA-ekstraksjon fra fullblod i noen av de 3 rørene som ble brukt.

### Mulige feil:

Mest sannsynlig flere grunner til at vi ikke fikk et resultat på DNA ekstraksjonen.

Avvik mellom metode og resultat på grunn av manglende sentrifuge 3000 g? For kort sentrifuge tid?

Transport mellom molekylær og fysiologisk lab?

Vannbad vs temperaturløkk? Det ble brukt temperaturløkk i stedet for vannbad

Det ble forsøkt med en annen metode for å produsere DNA i løsning:

Pga mangel på DNA i løsning ble det tilsatt 1,5 ml 100 % kjølt etanol. Fryst over natten ved -20 grader celsius. DNA var da synlig.

### Protokoll for DNA-analysen (Bestemmelse av ACTN3 genotype, DNA Agarose Gel Elektroforese)

1. Tilsett 10 µl 2 x *Master mix*, 5 µl *Primer mix* og 5 µl DNA i to PCR-rør
2. Tilsett 10 µl 2 x *Master mix*, 5 µl DNA og 5 µl vann i to PCR-rør (kontroll, ingen primer)
3. Tilsett 10 µl 2 x *Master mix*, 5 µl *Primer mix* og 5 µl vann i to PCR-rør (kontroll, ingen prøve)
4. Bland prøvene ved å sentrifugere prøvene på 600 rpm i 1 min
5. Sett PCR-rørene i en PCR-maskin i ca. 60 min
  - 2 min 95°C
  - 10 sek 95°C \*
  - 10 sek 68°C \*
  - 45 sek 72°C \*
  - 2 min 72°C

\* 37 sykluser med 10 sek 95°C, 10 sek 68°C og 45 sek 72°C

1. Bland sammen 2,0 g agarose og 100 ml 1 X *TBE* i en kolbe, putt dette i mikroen i ca. 1 min. Pass på at det ikke koker

2. Kjøøl ned gelen til ca. 60 °C og tilsett gel stain i forholdet 1:10000/10 µl per 100 ml
3. Hell gel-miksen i et gel-beger med kammer for å lage brønner i gelen
4. Gelen stivner etter ca. 45 min
5. Plasser gelen i elektroforese-enheten
6. Tilsett 1 X TBE til elektroforesen slik at det dekker alle brønnene
7. Miks 5 µl DNA med 1 µl *loading dye* \*
8. Rist og sentrifuger prøvene kort på 600 RPM
9. Flytt DNA-miksen og DNA-ladder over i brønnene \*\*
10. Sett på 150 V og sett timeren til 60 min. Se etter at DNA forflytter seg mot den positive elektroden \*\*\*
11. Se gelen i G:Box og bruk UV lys og Sybr green settings

Brønn	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Prøve	L	12.1	12.1	13.1	13.1	13.2	13.2	13.3	13.3	14.1	14.1	L				

\* 2 µl loading dye, feil pipette

\*\* Brønn nr. 2: punkterte gelen. Brønn nr. 11 og 12: feil ved pipettering (slapp opp stempelet mens pipettespissen var i brønnen), usikker på volum av prøven

\*\*\* 50 min

## Resultater DNA-analysen:

DNA-stiger visuelle (brønn 1 og 12) med G:box-visualisering i UV-lys. DNA-prøvene ikke visuelle (brønn 2-11).

## Attached file

IDR4000-Molekylærlab-løsninger-som-ble-brukt.docx  
sha256: 751b69156e5a907075d2259fcf1d27b48db56e8b3fa1bb581a611a42f836a6c3



Unique eLabID: 20230906-b9843bf0682d713d4fb5ddb89a1493ac6e7edcd3  
Link: <https://elab.inn.no/experiments.php?mode=view&id=64>