**Labbrapport- DNA, extraktion, PCR, agarosgelelektrofores samt pyrosekvensering**

**Nacka Gymnasium**

**Emil Nygren**

NN3a

Labbrapport- DNA, extraktion, PCR, agarosgelelektrofores samt pyrosekvensering

# Sammanfattning:

Laborationen gick ut på att rena ut DNA från hårrötter för att sedan kopiera upp en viss sekvens av strängen via PCR. Kontrollera produkten vi agarosgelelektrofores och därefter sekvensera DNA:t.

## Metod:

Första steget var att extrahera ut och rena DNA:t ur hårsäckarna:

Lysering:

1. Hårrötter placeras i ett eppendorf rör och en lysis buffert (ATL) tillsattes för att lösa upp cellmembranet och för att delvis denaturera proteiner.
2. Därefter tillsattes proteinas K, som användes för att klyva proteiner till mindre bitar.
3. Det här fick sedan stå över natten, då har alla hårrötternas celler lyserat och DNA:t från mitokondrierna och cellkärnan kommer på så sätt ut i lösningen. Så att des

Rening:

1. Lysate buffert och AL buffert tillsattes till eppendorf röret med DNA:t, samt tilsattes etanol för att skapa en fällning och på så sätt kunna rena ut DNA:t från andra cellkomponenter.
2. Blandningen fördes över till QIAamp Mini kolonnen och därefter centrifugerades den. Vid centrifugering fastnar DNA:t i silikagelmembranet medan övriga cellkomponenter, salter och buffertarna filtreras bort.
3. DNA:t tvättades ytterligare två gånger med saltlösningar (AW1 och därefter AW2 lösning), efter varje tillsatt lösning centrifugerades lösningen och andra ämnen bort från DNA:t
4. Kolonnen centrifugerades ytterligare 3min utan någon tillsatt lösning, för att torka kolonnens membran.

Eluering:

1. Nuclease free water tillsattes till membranet vilket gör så att DNA:t tillåts passera genom membranet vid centrifugering.

**PCR:**

Polymeras chain reaction användes för att kopiera upp till stora mängder DNA.

1. Nuclease free water tillsattes till ett PCR-rör.
2. Därefter tillsattes en master mix, som bland annat består av DNA-polymeras, dNTP och PCR-buffert.
3. Två primers tillsattes, dessa primers är specialtillverkade så de kan binda till specifika platser i DNA:t och på så vis kopiera upp den delen av strängen som tittar på.
4. Till sist tillsattes DNA:t och PCR-röret placerades i masskopieringsmaskinen. Maskinen sköter amplifiering genom att variera temperaturen. Först höjs temperaturen till 95ºC så att DNA:t denatureras, dubbelsträngarna delas. Temperaturen sänks sedan ca 50°C så annealing sker, här fästs primerna till DNA:t. Tillsist höjs temperaturen till 70ºC då sker elongeringen, DNA-polymeraset binds in och kopiering av strängarna sker. Denna cykel återupprepas därefter många gånger tills man har stora mängder DNA.

**Gelelektrofores:**

PCR produkten ska nu kontrolleras via gelelektrofores.

1. En agragosgel skapas med hjälp av Agragos, TBE buffert och SyBr-safe. Som sedan gjutes i ett geltråg.
2. När gelen har stelnat täcks den med TBE-buffert och i de två yttre kamrarna tillsattes en stege (Mol, weight marker).
3. PCR-produkten tillsammans med en loading buffert tillsattes till en av kamrarna.
4. En spänning mellan 80 och 100 volt sätts över gelen, så att DNA strängarna kan vandra i gelen beroende på deras längd.
5. Därefter kontrollerades PCR-produkten.

**Pyrosekvensering:**

Pyrosekvensering används för att sekvensera DNA:t.

1. DNA:t separeras till enkelsträngar genom att först fäst biotin till ena DNA-strängen och Strepatividin tillsätts till provröret med DNA:t, strepatividin kan binda till biotinet. NaOH-lösning tillsätts till provet och gör så att DNA strängarna separeras.
2. NaOH och obundna DNA-strängar pippeteras bort.
3. Sekvenserings primers tillsätts och provet placeras till sekvenseringsmaskinen.
4. Maskinen ritar upp ett nukleotid- ljusdiagram som bassekvensen kan avläsas ifrån.