

Ekstraksjon og analyse av DNA

Introduksjon

Hvilke egenskaper kroppen har tilegnet seg eller har påvirker prestasjon i både idrett og dagligdagse gjøremål. Med styrke- og kondisjonstrening vil organene og skjelettmuskulaturen få adaptasjoner, som vil gjøre kroppen bedre egnet til å gjennomføre arbeidet den er blitt utsatt for (Hughes et al., 2018). Genetikk er også en faktor som vil gi oss forskjellig utgangspunkt for trening og ulik adaptasjon til treningsstimuli (Bouchard et al., 2011). Hvert enkelt individ har egne genotyper, dette vil si forskjellige varianter av samme gen. Genet ACTN3 er et gen for aktin-bindende proteiner i type 2-muskelfibre. Genet har genotypene X/X, R/R og R/X. Tidligere forskning har vist at personer som har genotypen X/X er mer disponert for prestasjon i utholdenhetsidretter. Derimot er de med R/R-genotypen mer disponert for kraft- og styrkerelaterte idretter, mens noen har en kombinasjon med genotype X/R, med lik disponering for utholdenhetsidretter og kraft- og styrkerelaterte idretter (Schadock et al., 2015). Ved å undersøke hvilken genotype et enkelt individ har, skal det kunne være enklere å tilrettelegge trening med mer optimal effekt. Dette kan være relevant i eksempel toppidrett for å optimalisere trening for best mulig prestasjon. I tillegg kan det være med å forklare hvorfor responsen på trening varierer blant befolkningen. Dermed kan en optimalisere treningen med best mulig effekt på individnivå på tvers av grupper i samfunnet. I denne rapporten vil vi bruke metoden til Schadock et al. (2015) for å analysere ACTN3-genet og kartlegge hvilken av de ulike genotypene som finnes hos enkeltpersoner.

Metode

DNA-ekstraksjon

For å kunne analysere ACTN3-genet fra DNA ble det foretatt en blodprøve av hvert enkelt gruppemedlem. For lagring av blodprøver kan det brukes både heparin- og EDTA-vakutainrør. Våres blodprøver ble tatt med EDTA-vakutainrør, dette fordi prøvene ble fryst ned for behandling på et senere tidspunkt.

Selve DNA-ekstraksjonen startet med overføring av 3ml blod (fra blodprøven) til et 15ml rør, hvor det ble tilført 12 ml av Reagens A. Innholdet i røret ble blandet sakte ved rotasjon i 4 minutter i romtemperatur (ca. 23 grader celsius). Deretter ble det sentrifugert med innstilling 3000g i 5 minutter ved romtemperatur. Etter endt sentrifugering ble den supernatante væsken

separert fra pelletet, deretter forsøkte vi å få minimert væskeinnholdet ved å pipettere uten å komme i kontakt med pelletet. 1 ml av Reagens B ble tilført for å hindre at pelletet skulle brytes ned eller reagere på noen måte. Deretter ble 250µl av M sodium perchlorate tilført og blandet ved at vi vendte på røret flere ganger. Rørene ble plassert i et vannbad (65 grader) i 15-20 min. Etter vannbadet ble rørene avkjølt til romtemperatur, og tilført 2 ml av iskald chloroform. Deretter ble rørene plassert i en roterende mikser mellom 30 og 60 min. Jo nærmere 60 min desto bedre blir DNA-pellet. Deretter ble de sentrifugert på innstillingen 2400g i 2 min. Etter sentrifugeringen hadde blodet skilt seg, og det var viktig å være forsiktig ved transport av rørene for å ikke blande blodet igjen. Neste steg besto av å flytte den øverste blanke væsken ved pipettering til ett falcon rør. Ved å tilsette 2-3 ml av 100% kald etanol til den blanke væsken, for deretter å vende på røret, skulle DNA vises i løsningen. Videre overførte vi DNAet fra væsken til et 1.5 ml rør for at det skulle lufttørke. Deretter tilsatte vi 200 µl av TE buffer til falcon røret. I siste steg av DNA-ekstraksjonen skulle DNA konsentrasjonen kvantifiseres ved spektrofotometeret ved 200-500 ng/µl.

Genotyping

Første steg i genotypingen var å forberede geléen. Dette ble gjort ved å fortynne 10X TBE buffer for å lage en 1X løsning, altså 100 ml i 900 ml H₂O. Deretter ble det tilført 100 ml av 1X TBE buffer til et konisk beger. I tillegg ble det tilført agarose for å lage en gelé med passende prosentandel hvor 2g ga 2% gelé. Dersom Sybr Safe blir brukt, tilføres 1:10000 til miksturen. Deretter ble geléen varmet opp til den ble klar (f.eks. 1 min i en mikroovn eller en varmeplate). Etter oppvarming måtte miksturen kjøles ned til omtrent 60 grader. Videre ble miksturen helt i et gelé støpebrett og kammen ble plassert på riktig plass. Etter en time var geléen polymerisert og kammen ble fjernet.

Neste steg var å bruke DNA-ekstraksjonen og tilsette 2X Master mix og primer mix som ble blandet i et PVR reaksjonsrør. Resultatene ble kontrollert ved å bruke DNA ladder og H₂O sammen som en negativ kontroll. For å kjøre PCR ble 2-5 µl av reaksjonsmiksen brukt på en 2% agarose gelé.

Den første syklusen i PCR kalles “oppvarming” og kjøres i 2 min på 95 grader. De tre midterste syklusene er hoveddelen og kjøres 35 ganger. Den siste syklusen kalles “nedkjøling” og kjøres i 2 min på 72 grader.

Elektroforese

Siste fase var å plassere geléen i en elektroforese, hvor vi tilsatte 1X TBE for å dekke til brønnene i geléen. For å kunne visualisere prøvene og DNA ladder mikset vi inn “loading dye”, som besto av 1 µl av 6X “dye” per 5 µl med prøve. Deretter ble elektroforesen satt på 150V i omtrent 1 time.

Resultater

Hovedfunn

Målet med å gjennomføre denne protokollen var å se om det var forekomst av ACTN3-genotypen. I den første delen av DNA-ekstraksjon var det varierende verdier blant gruppemedlemmene.

Innad i denne gruppen varierte konsentrasjonen av DNA fra 106,7157 til 434,3629. Prøvene ble fortynnet slik at DNA-verdiene hadde en lik konsentrasjon på 100ng.

Alle prøvene som til slutt hadde en stor nok DNA-pellet hadde forekomst av ACTN3. Det var gjennomgående like funn hvor det var en kombinasjon av både R/R- og X/X genotypen. Noen hadde en sterkere reaksjon av R/R, mens andre hadde en kombinasjon. Forekomsten av R/R- og R/X genotypen og hvilken grad de har kan en se i figur 1 (se vedlegg).

Avvik

Det er verdt å merke seg at et av avvikene i vår gruppe var at det gikk galt under gjennomføringen av DNA-ekstraksjonen for en av oss, slik at det ble umulig å teste for ACTN3. Akkurat hvor i prosessen det gikk galt er vanskelig å slå fast, men det var ved det siste trinnet i DNA-ekstraksjonen at det ikke var noe visuelt resultat som ville være brukbart videre i testingen.

For å kunne forhindre at slike feil gjentar seg ved gjennomføringen av denne protokollen senere, vil det være en fordel å skrive labjournalen grundigere underveis. Det at dette ikke ble gjort underveis kan være med på å regnes som en feilkilde.

Resultatene på ACTN3 var også svært svake, som kan skyldes søl under pipettering fra rør til geleen før elektroforesen.

Diskusjon

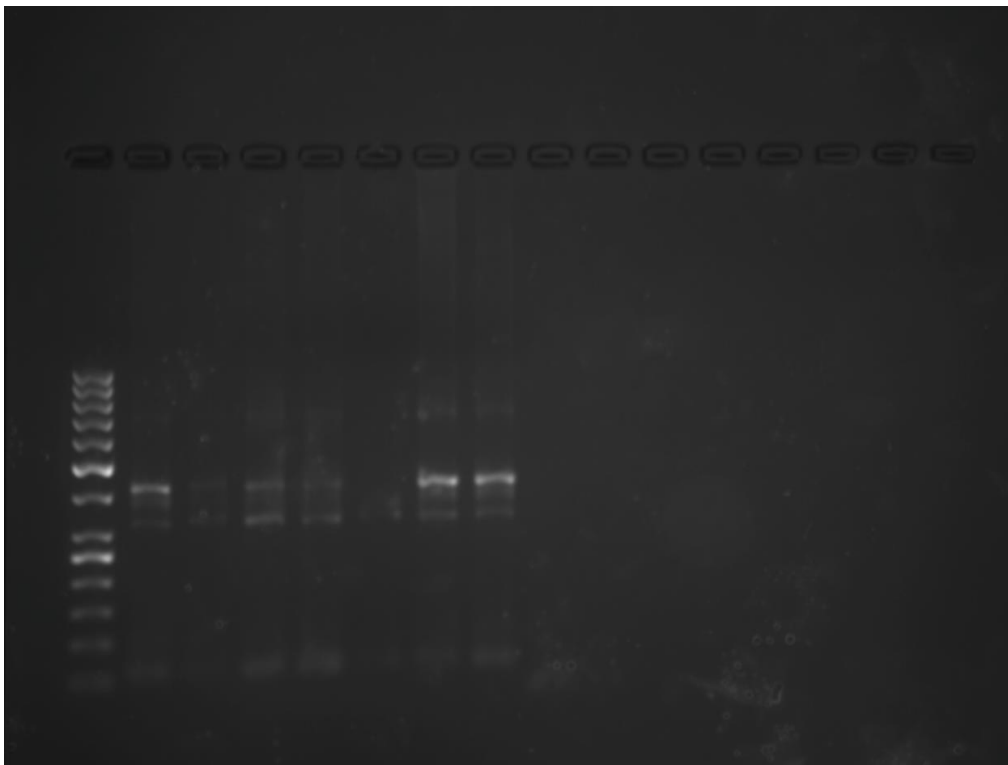
Basert på det Schadock et al. (2015) skriver i sin artikkel er det ikke tilstrekkelig med forskning gjort på større kohorter. Dette bidrar til det er vanskelig å si med sikkerhet at funnene gjort i forbindelse med denne testen er til å stole på. Det som man ser i studien til både Schadock et al. (2015) og Yang et al. (2003) er at det i flere tilfeller har blitt oppdaget høyere forekomst av R/R genotype blant personer som bedriver en eksplosiv idrett. Derimot er det oppdaget en høyere forekomst av X/X genotype blant personer som bedriver og er gode i utholdenhetsidretter. Det at man har gjort funn av X/X genotype trenger likevel ikke være ensbetydende med at en utholdenhetsidrett vil være det som passer personen/utøveren best. Likevel har Schadock et al. (2015) gjort det mer tilgjengelig for testing på større folkemengder, siden den nye testmetoden er mer prisvennlig, og tar mindre tid enn tidligere testing.

Basert på det som er nevnt ovenfor vil det derfor ikke kunne sies med sikkerhet at de resultatene vi fikk av denne testen vil være det som er riktig for oss.

Litteraturliste

- Bouchard, C., Rankinen, T., & Timmons, J. A. (2011). Genomics and Genetics in the Biology of Adaptation to Exercise. *Comprehensive Physiology*, 1(3), 1603–1648.
<https://doi.org/10.1002/cphy.c100059>
- Hughes, D. C., Ellefsen, S., & Baar, K. (2018). Adaptations to Endurance and Strength Training. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 8(6).
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a029769>
- Schadock, I., Schneider, A., Silva, E. D., Buchweitz, M. R. D., Correa, M. N., Pesquero, J. B., Paredes-Gamero, E. J., Araujo, R. C., & Barros, C. C. (2015). Simple Method to Genotype the ACTN3 r577x Polymorphism. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 19(5), 253–257.
<https://doi.org/10.1089/gtmb.2014.0299>
- Yang, N., MacArthur, D. G., Gulbin, J. P., Hahn, A. G., Beggs, A. H., Easteal, S. & North, K. (2003). ACTN3 Genotype is Associated with Human Elite Athletic Performance. *American Journal of Human Genetics*, 73(3), 627-631. <https://doi.org/10.1086/377590>

Vedlegg



Figur 1: Resultatene av DNA-ekstraksjon og analyse

