

The Biotechnology Education Company®

EDVO-Kit  
**102**

Restriktions-  
enzym skæring  
af DNA

**Eksperimentets formål**  
Formålet med dette eksperiment er at udvikle  
en forståelse for brugen af restriktionsenzymmer  
til at skære DNA ved specifikke sekvenser.

EDVOTEK, Inc. • 1-800-EDVOTEK • [www.edvotek.com](http://www.edvotek.com)

## Elevvejledning

## Materialeliste:

### Ready-to-load™ DNA prøver til elektroforese

- A Plasmid DNA (uskåret)
- B Plasmid skåret med Bgl I
- C Plasmid skåret med Eco RI
- D Lambda DNA (uskåret)
- E Lambda DNA skåret med Eco RI
- F Lambda DNA skåret med Bgl I

### Medfølgende reagenser og tilbehør

- UltraSpec-Agarose™ pulver
- Koncentreret elektroforese buffer
- FlashBlue™ DNA farve
- InstaStain® Blue cardGel loading opløsning
- 1 mL pipette
- Mikrospids-overførselspipetter

### Egne materialer

- Horisontal gel elektroforeseapparat
- Strømforsyning (70V)
- Automatpipetter med spidser
- Vægt
- Mikrobølgeovn eller anden varmer
- 250 mL og 1 L flasker eller kolber
- Varmebestandige handsker
- Sikkerhedsbriller og engangshandsker
- Små plastikbakker (til gel farvning)
- Lyskilde til at se Dna
- Demineraliseret vand

Baggrundsinformation

Restriktions-enzym	Organisme
Bgl I	Bacillus globigii
Bam HI	Bacillus amyloliquefaciens H
Eco RI	Escherichia coli, strain RY 13
Eco RII	Escherichia coli, strain R 245
Hae III	Haemophilus aegyptius
Hind III	Haemophilus influenzae R <sub>17</sub>

Opdagelsen af restriktionsenzymers startede en ny æra af molekylær genetik. Disse enzymer skærer DNA molekyler på en meget specifik og reproducerbar måde. Dette har ført til udvikling af molekylær kloning og kortlægning af gener.

Restriktionsenzymers er endonukleaser som katalyserer fosfoester bindinger i DNA strengene. De kræver Mg<sup>++</sup> for at aktiveres, og de danner en 5-ende (5') fosfat og en 3-ende (3') hydroxyl-gruppe i skæringspunktet. Den helt specielle egenskab ved restriktionsenzymers er, at de kun skærer i meget specifikke basesekvenser. Restriktionsenzymers fås fra mange forskellige arter af bakterier (inklusive blå-grøn alger = cyanobakterier). Man har indtil nu fundet og

katalogiseret 3.000 forskellige restriktionsenzymers.

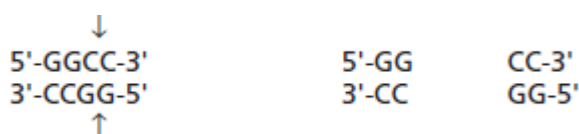
Restriktionsenzymers får navn fra de organismer, fra hvilke de er isoleret. Dette gøres ved at bruge første bogstav af slægten efterfulgt af de første to bogstaver af arten. Det kan være, at det kun er enkelte varianter (eng.: strain) eller under-varianter af arten, der producerer restriktionsenzymet. Variantens navn følger derfor nogle gange bogstaverne i navnet. Til slut kan et romertal blive brugt til at identificere en ud af flere mulige restriktionsenzymers, der bliver lavet af en bestemt variant eller at under-variant af samme variant.

Et restriktionsenzym kræver en specifik genkendelig dobbeltstretet sekvens af nucleotider til at skære DNA. Disse genkendelsessteder er almindeligvis 4 til 8 basepar lange. Skæringer sker inde i eller nær det genkendte område. Man viser skæringsstederne med pile. Genkendelsessekvensen er oftest symmetrisk, dvs. at begge DNA strenge i sitet har samme basesekvens, når de læses i retningen 5' til 3'. Sådanne sekvenser kaldes palindromer. Se f.eks. på skæringsmønstret for *Eco* RI:

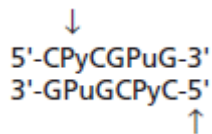


Som vist ovenfor, skærer *Eco* RI skævt. Enderne af DNA fragmenterne kaldes "sticky ends" eller klæbrige ender, fordi de enkeltstrengede regioner er komplementære.

Nogle restriktionsenzymers, sådan som *Hae* III, skærer lige over og laver derfor "stumpe" ender.



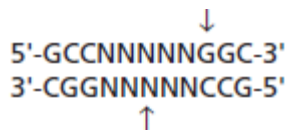
Nogle genkendelsessekvenser indeholder variable basepositioner. F.eks. vil *Ava* I genkende:



Py = pyrimidin = C eller T, og  
Pu = purine = G eller A

Husk at A parres med T og G parres med C. Heraf følger så, at der er 4 mulige sekvenser, som *Ava* I kan genkende.

Der er nogle genkendelsessekvenser, der kan være delt af et bestemt antal totalt variable baser. F.eks. vil *Bgl* I genkende:

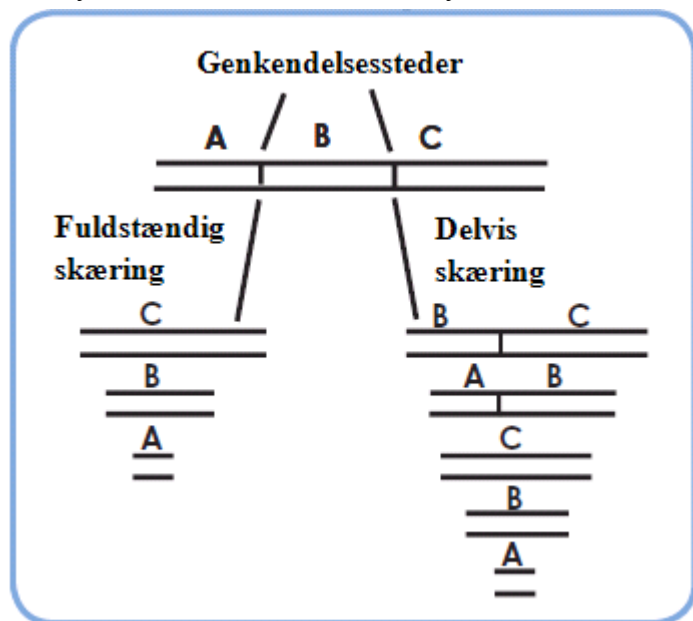


N = A, G, C eller T

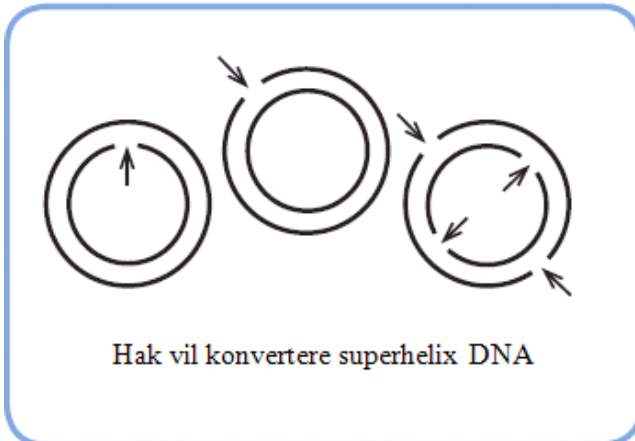
Der er derfor 625 mulige sekvenser, som *Bgl* I kan skære. De eneste baser, som enzymet med sikkerhed genkender, er de seks G-C basepar i enderne, som former et palindrom. I tilfældet *Bgl* I skal disse to "sande" genkendelsessteder være adskilt af præcis 5 basepar DNA, ellers kan enzymet ikke reagere med DNA og klippe det. Sådanne sekvenser kaldes "hyphenated sites" ("sekvenser med bindestreg").

Generelt kan man sige, at jo længere en DNA streng man har, jo større er sandsynligheden for, at en given sekvens vil optræde. Derfor vil humant kromosomt DNA, som indeholder tre billioner basepar, have flere genkendelsessekvenser end et plasmid DNA, der kun indeholder nogle tusind basepar. Desværre er store DNA stykker svære at isolere intakt. Derfor arbejder man oftest med afskårne stykker på 50.000 til 100.000 basepar.

Plasmider og meget virus DNA er cirkulære molekyler. Hvis et cirkulært molekyle indeholder en enkelt genkendelsessekvens til et restriktionsenzym, så vil det åbne op og forme et lineært molekyle, når det bliver klippet. Omvendt vil et lineært stykke DNA, der klippes et enkelt sted, danne to fragmenter. Hvis et DNA molekyle indeholder flere genkendelsessekvenser, så er det muligt, at nogle steder er skåret og andre ikke er. De ukomplet skårede fragmenter kaldes "partialer". Partialerne kan opstå, hvis der er brugt en for lille mængde enzym, eller hvis reaktioner er stoppet for tidligt. Reaktioner, der indeholder partialer, vil også indeholde fuldstændig klippede stykker.



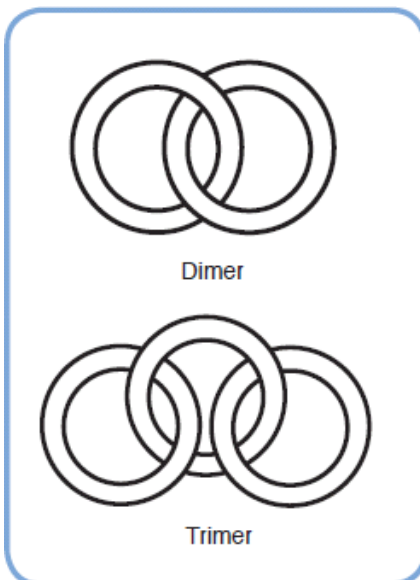
Agarose gel elektroforese er en meget effektiv separationsmetode til at analysere DNA fragmenter, der er dannet vha. restriktionsenzym. Agarosegelen indeholder mikroskopiske porer, der virker som en molekyle-si. Prøver af DNA bliver sprøjtet ned i små brønde, der er dannet under støbning af gelen. Siden DNA har en stærk negativ ladning ved neutral pH, vil det vandre gennem gelen mod den positive elektrode under elektroforesen. DNA molekyler bliver separeret i gelen afhængig af størrelse og facon. Små lineære stykker vandrer hurtigst. Hvis størrelsen af to fragmenter er ens, vil de vandre sammen i gelen. Hvis DNA er skåret mange gange, vil de mange forskellige fragmenter danne et udtværet mønster efter elektroforese.



Cirkulært DNA så som plasmider er ”supercoiled” (tvundet). Tvundet DNA har en mere kompakt og snoet facon (ligesom en snoet elastik) end ikke-tvundet (lineær, ”hakkede” og relaterede cirkler).

Når tvundet DNA bliver klippet en gang af et restriktionsenzym, vil det folde sig ud til lineær form. Hvis tvundet DNA bliver hakket (en fosfatbinding bliver klippet et sted i molekylet, men kun i den ene streng), så vil DNA’et folde

sig ud og blive cirkulært. Under de elektroforese betingelser, der bliver brugt i dette eksperiment, vil tvundet DNA vandre hurtigere end dets lineære form, og det lineære DNA vil vandre hurtigere end det hakkede.



Under replikation kan flere plasmid molekyler forme kædebundne strukturer. Disse kaldes ”catenanes”. Disse kan bestå af to plasmidmolekyler (dimer), tre molekyler (trimer) osv. De kædebundne plasmider vandrer langsommere gennem gelen end de hakkede. Dimerer vandrer hurtigere end trimerer, som vandrer hurtigere end tetramerer, osv. Kædebundne plasmider giver det samme mønster ved restriktionsenzym skæring og elektroforese, som deres ubundne former gør.

I dette eksperiment analyseres restriktionsenzym skæringsprodukter ved agarose gel elektroforese. Det tvundne DNA indeholder ca 4.500 basepar og har et genkendelsessted for *Bgl* I og to for *Eco* RI. Det andet DNA er isoleret fra *E.coli* bakteriofag lambda, som er et lineært molekyle, der indeholder 49.000 base par. Lambda DNA indeholder 5 genkendelsessteder

for *Eco* RI og 29 for *Bgl* I. Restriktionsenzymernes skæring viser, at et specifikt restriktionsenzym vil give forskellige mønstre, når de angriber forskellige stykker DNA. F.eks. vil *Bgl* I give 1 fragment, når det skærer plasmid Dna, mens det vil give et helt anderledes mønster, når det skærer lambda DNA.

## Oversigt over eksperimentet og generelle instruktioner

### Eksperimentets formål:

Formålet med dette eksperiment er at udvikle en forståelse for brugen af restriktionszymer til at skære DNA ved specifikke sekvenser.

### Laboratoriesikkerhed

1. Handsker og briller bør altid bruges som god laboratoriepraksis.
2. Vær forsigtig ved behandling af materiale i forbindelse med opvarmning eller smeltning af reagenser.
3. Brug aldrig munden til at pipettere - brug pipettepumper.
4. Vær forsigtig, når der bruges elektrisk udstyr i laboratoriet.
5. Vask altid hænder omhyggeligt med vand og sæbe efter at have arbejdet med reagenser og biologisk materiale i laboratoriet.



### Laboratoriejournaler

Skriv følgende i din journal:

#### Før eksperimentet startes:

- Skriv en hypotese, der afspejler eksperimentet.
- Forudse eksperimentets udfald.

#### Under eksperimentet

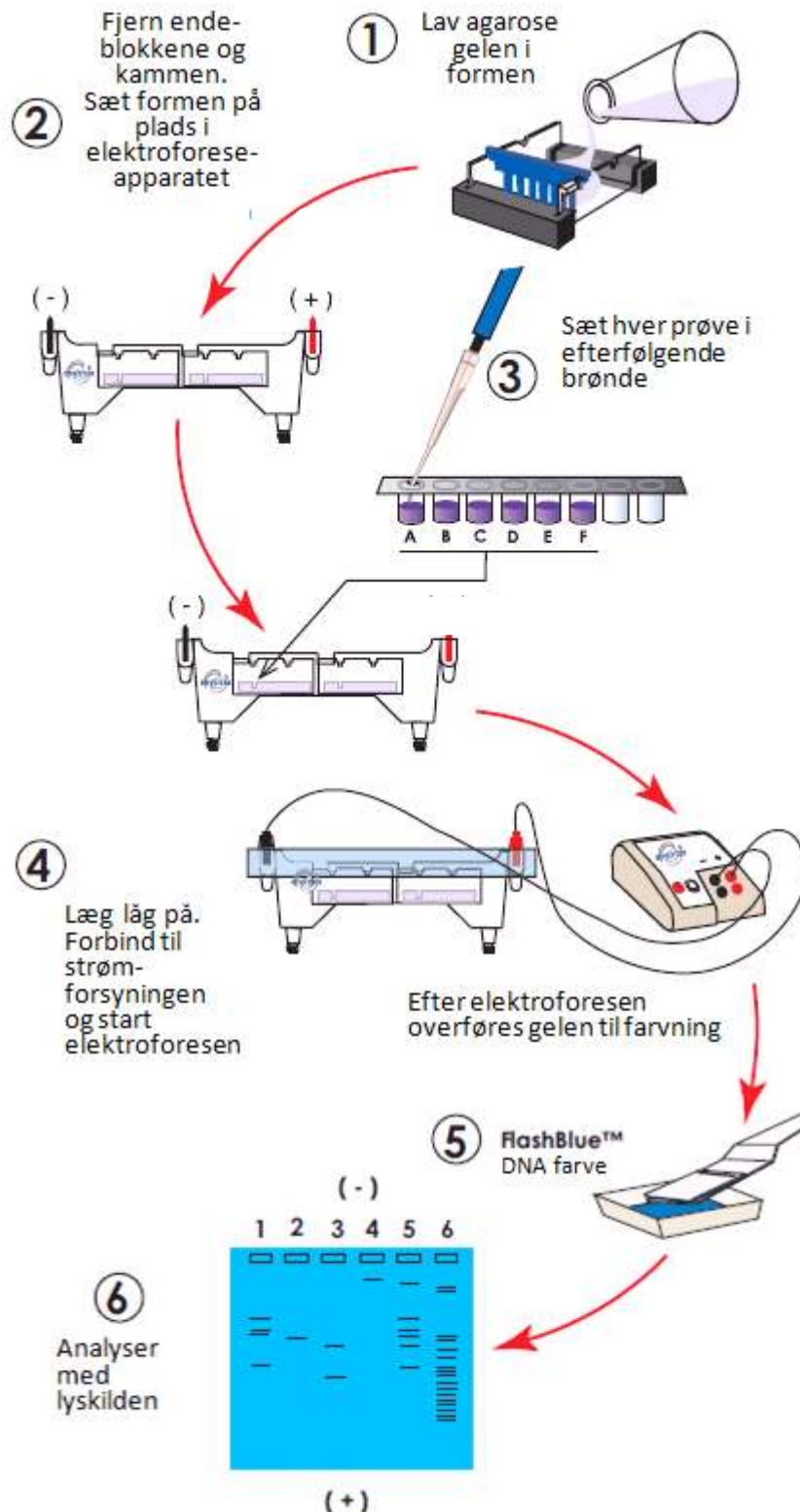
- Beskriv, tegn eller fotografér dine observationer og resultater.

#### Efter eksperimentet

- Formuler en forklaring på resultaterne.
- Bestem, hvad der kunne ændres i eksperimentet, hvis det skulle gentages.
- Skriv en hypotese, der ville reflektere denne ændring.

Kopiering af dette dokument samt anvendelse af de medfølgende reagenser er kun tilladt i klasseværelser/laboratorier. Dette dokument eller nogen som helst del deraf må ikke blive reproduceret eller distribueret med noget andet formål uden efter skriftlig aftale med EDVOTEL, Inc.

## Oversigt over eksperimentet: Flow Chart



Gel mønstret vil variere afhængig af eksperimentet

## Agarose gel elektroforese

### Forbered gelen

1. Lav en agarose-gel efter forskrifterne nedenfor.

- Agarose-gel koncentration: 0,8%
- Anbefalet gelstørrelse: 7 x 7 cm eller 7 x 14 cm (2 geler)
- Nødvendige antal brønde: 6
- Placering af kammene: Første sæt hak (7 x 7 cm)  
Første og tredje sæt hak (7 x 14 cm)



Bær  
handsker og briller

### Sæt prøverne på

2. Sæt DNA prøverne fra tuberne A - F i brøndene i ordnet rækkefølge.

- Fyld brøndene med 35 - 38  $\mu$ L, hvis farvestoffet er FlashBlue<sup>TM</sup> eller InstaStain<sup>®</sup>Blue.
- Fyld brøndene med 18 - 20  $\mu$ L, hvis farvestoffet er InstaStain<sup>®</sup>Ethidium Bromide.

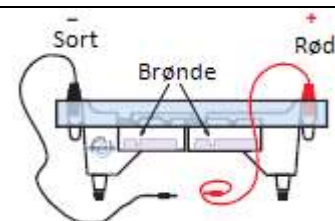
Lane	Tube	
1	A	Plasmid DNA (uskåret)
2	B	Plasmid DNA skåret med <i>Bgl</i> I
3	C	Plasmid DNA skåret med <i>Eco</i> RI
4	D	Lambda DNA (uskåret)
5	E	Lambda DNA skåret med <i>Eco</i> RI
6	F	Lambda DNA skåret med <i>Bgl</i> I

### Kør gelen

3. Efter at DNA prøverne er sat på, sæt låg på og sæt apparatet til en strømforsyning ved den ønskede spænding (appendix B, tabel C1).
4. Kontroller, at strømmen løber, som den skal. Der skal komme bobler ved de to platinelektroder, og det blå farvestof skal bevæge sig. Fortsæt så længe som anvist af læreren.
5. Når elektroforesen er fuldført, fortsæt med DNA farvning.
6. Tegn eller fotografer resultatet. Alternativt kan man lægge gennemsigtigt film over gelen og tegne med en permanent pen. Husk gelens omkreds og brøndene foruden DNA-båndenes mønster.

#### HUSK:

Under elektroforesen vil DNA vandre gennem gelen mod den positive elektrode. Kontroller, at gelen er orienteret rigtigt i elektroforesekammeret, før prøverne sættes på gelen.







Farvning og visualisering af DNA  
med FlashBlue™ farvning

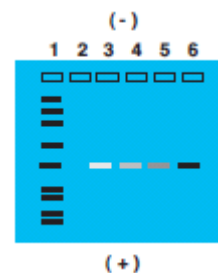
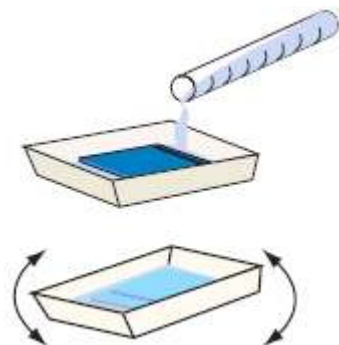
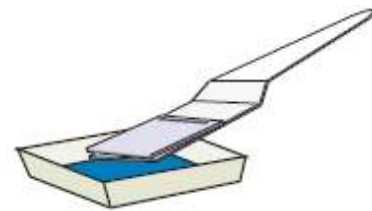


Bær  
handsker og briller

Din lærer har fortyndet 10x FlashBlue™ farve (appendix E)

**Farvning og affarvning**

1. Fjern agarosegelen fra formen og læg den i en lille, ren vejebakke eller låg fra pipettespidser. Hæld ca. 75 mL 1x FlashBlue™ farve over. Tilsæt evt. mere farve, indtil gelen er dækket.
2. Farv gelen i 5 minutter.  
Note: Hvis man farver længere end 5 minutter, vil det forlænge affarvningstiden. Hvis man skifter demineraliseret vand hyppigt, sker processen hurtigere.
3. Overfør gelen til en anden bakke og fyld den med 250 - 300 mL demineraliseret vand.
4. Ryst bakken forsigtigt med få minutters mellemrum. Alternativt kan man placere bakken på en rystende platform.
5. Fortsæt affarvningen i 20 minutter.  
Mørke blå bånd bliver synlige mod en lyseblå baggrund. Yderligere farvning kan eventuelt give et bedre resultat.
6. Fjern gelen forsigtigt fra bakken og undersøg den på en lyskilde. For at optimere synligheden bruges filtret, der følger med EDVOTEK sættet.



**Opbevaring og bortskaffelse**

- Geler farvet med FlashBlue™ farve kan gemmes i køleskabet i nogle uger. Læg gelen i en forsejlet plasticpose med lidt demineraliseret vand.
- Farvede geler kan smides i skraldespanden. FlashBlue™ farve og affarvningsvandet kan hældes i vasken.

## Spørgsmål

1. Mod hvilken elektrode vandrer DNA og hvorfor?
2. Hvorfor var opdagelsen af restriktionszymer så vigtig?
3. Hvordan navngiver man restriktionszymer?
4. Forklar kort funktionen af restriktionszymer.