Ohjaajan ohje:

Katkaisuentsyymien toiminnan tutkiminen

Työn tavoite Työn tavoitteena on tutustua geenitekniikan perusmenetelmien käyttöön käytännössä. Työssä pilkotaan DNA:ta eri katkaisuentsyymien avulla ja selvitetään pilkottujen DNA-fragmenttien kokoa agaroosigeelielektroforeesissa. Työssä pyritään ymmärtämään, mihin katkaisuentsyymien sekä elektroforeesin toiminta perustuu. Työn tavoitteena on myös kontrolllinäytteen merkityksen ymmärtäminen.

Kohderyhmä: Lukio.

Opetussuunnitelman sisällöt Biologian sovellukset (BI5).

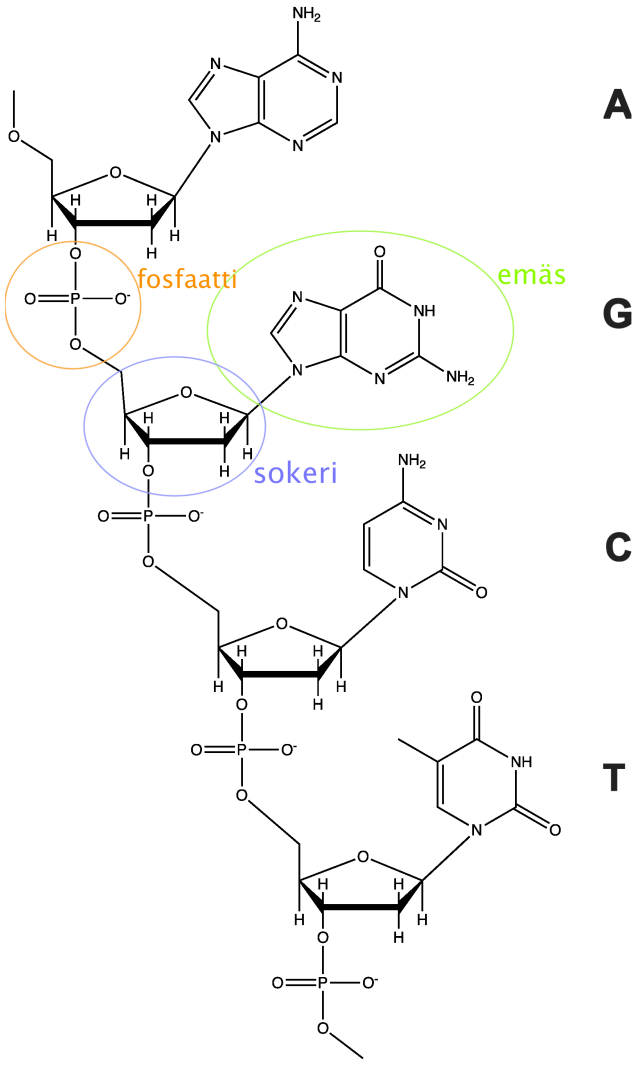
Työn kesto 120-180 min.

Taustaa

Kaikkien elävien eliöiden perimä koostuu DNA:sta eli deoksiribonukleiinihaposta. DNA koostuu kahdesta toisiinsa liittyvästä ketjusta eli juosteesta. DNA-juosteen rakenteessa on kolme tärkeää osaa: sokeri-, fosfaatti- ja emäsosa. Emäksiä on neljä erilaista: adeniini (A), guaniini (G), sytosiini (C) ja tymiini (T). Näiden neljän emäksen avulla solun perimään on kirjattu tieto siitä, miten sen pitää toimia eri tilanteissa.

Tässä työssä DNA:ta pilkotaan pienemmiksi palasiksi katkaisu- eli restriktioentsyymien avulla. Ne ovat entsyymejä, jotka katkaisevat DNA:ta juuri tietyn emässekvenssin kohdalta. Esimerkiksi EcoRI-entsyymi etsii DNA-sekvenssiä 5’GAATTC3’ ja katkaisee DNA:n ensimmäisen G-emäksen jälkeen:

G|AATTC
CTTAA|G



Kuva 1: DNA-juosteen rakenne

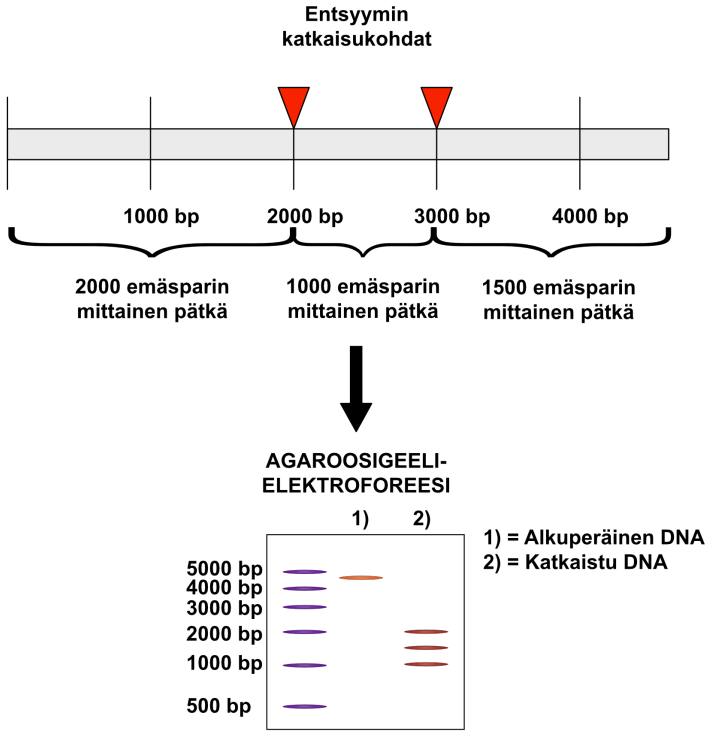
Työssä käytetään lambda-bakteriofagin (λ) DNA:ta. Kyseessä on bakteereita infektoiva virus eli bakteriofagi, jonka perimä koostuu 48 000 emäsparin mittaisesta DNA-ketjusta. DNA

Tämä teos on lisensoitu Creative Commons Nimeä-JaaSamoin 4.0 Kansainvälinen –lisenssillä. Salla Merenheimo, Justus Mutanen & Anu Wicklund / BioPop-tiedeluokka 2019

koodaa yhteensä 29 eri proteiinia, joita virus tarvitsee rakenteensa ylläpitämiseen, bakteerien infektoimiseen ja hajottamiseen ja DNA:n monistamiseen.

Tässä työssä bakteriofagin DNA:ta pilkotaan yhteensä kolmen eri katkaisuentsyymin avulla. Työssä käytettävät entsyymit ovat nimeltään BamHI, EcoRI ja PstI. **Tehtävänäsi on selvittää, kuinka moneen ja minkä pituisiin osiin kukin katkaisuentsyymi katkaiseen DNA:n.**

Lambda-bakteriofagin DNA on suoraketjuinen DNA-molekyyli, jonka kukin katkaisuentsyymi kykenee katkaisemaan yhdestä tai useammasta kohdasta. Tuloksena saadaan eri pituisia DNA-pätkiä. Kuvassa 2 on esitetty, mitä tapahtuu, kun noin 4500 emäsparin mittainen, suoraketjuinen DNA-pätkä katkaistaan entsyymillä, joka leikkaa DNA:ta kahdesta kohdasta. Kun alkuperäinen DNA ajetaan agaroosigeelielektroforeesissa, saadaan näkyviin yksi juova, jonka pituus on noin 4500 emäsparia. Kun katkaistu DNA ajetaan agaroosigeelielektroforeesissa, saadaan kolme juovaa, joiden pituudet ovat 1000, 1500 ja 2000 emäsparia.



Kuva 2. Työn periaate. Työssä katkaistaan entsyymeillä suoraketjuista DNA:ta. Syntyvien palojen määrästä ja koosta voidaan päätellä, kuinka monesta kohdasta entsyymi katkaisee DNA:n.

Työssä DNA:ta erotellaan koon mukaan agaroosigeelielektroforeesin avulla. Siinä sähköisesti varautuneita aineita erotellaan sähkökentän avulla. Aineet kulkeutuvat sähkökentässä kohti vastakkaismerkkistä varausta. Esimerkiksi negatiivisesti varautunut DNA-molekyyli kulkeutuu kohti laitteiston positiivista elektrodia.

Elektroforeesilaitteisto muistuttaa rakenteeltaan elektrolyysikennoa. Laitteistoon kuuluu virtalähde, elektrodit, ajoastia sekä tutkittavat näytteet. Yleensä näytteitä ajetaan geelimäisessä väliaineessa, jotta ne erottautuisivat paremmin. Tässä työssä hyödynnetään agaroosigeeliä, joten kyseessä on agaroosigeelielektroforeesi (AGE).

Geelielektroforeesissa näytteiden ajautumisnopeuteen vaikuttavat sekä molekyylien koko että sähkövaraus. Isommat molekyylit ajautuvat hitaammin kuin pienemmät, sillä geeli vastustaa enemmän suurempien molekyylien kulkua. Geelin verkkomaisen rakenteen vuoksi geelielektroforeesissa suuret DNA-pätkät ajautuvat hitaimmin ja pienimmät nopeimmin. Näin erikokoisia DNA-pätkiä voidaan erotella toisistaan.

Tämä teos on lisensoitu Creative Commons Nimeä-JaaSamoin 4.0 Kansainvälinen –lisenssillä. Salla Merenheimo, Justus Mutanen & Anu Wicklund / BioPop-tiedeluokka 2019

Pohdittavaksi ennen työtä

1. Mikä on katkaisuentsyymi ja missä niitä hyödynnetään?

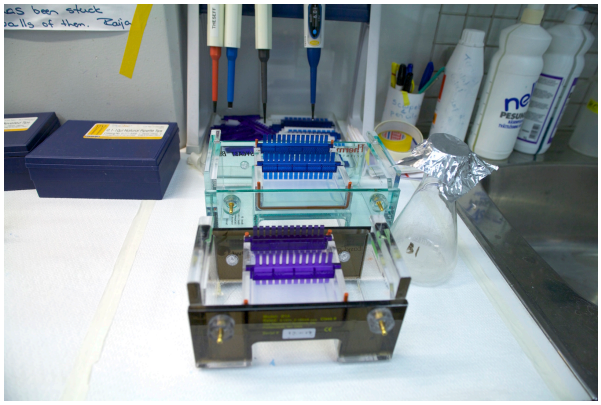
   Katkaisu- eli restriktioentsyymit ovat entsyymejä, jotka katkaisevat DNA-kaksoisjuosteen. Kullakin katkaisuentsyymillä on spesifi katkaisukohta eli emäsjärjestys, jonka se tunnistaa ja katkaisee. Katkaisuentsyymejä käytetään laajasti geenitekniikassa: niiden avulla voidaan irrottaa haluttuja geenejä esimerkiksi geenisiirtoa varten.

2. Kuinka monta juovaa näet geelillä, jos entsyymi katkaisee lambda-bakteriofagin DNA:n kolmesta eri kohdasta?

   Jos katkaisukohtia on kolme, muodostuu neljä DNA-palaa. Jos kaikki palat ovat eri kokoisia, ne näkyvät geelillä erillisinä juovina.

Työssä tarvittavat välineet

- Bio-Radin reagenssisarja: *Restriction Digestion and Analysis of Lambda DNA Kit.*
  - DNA-kokomarkkeri **(M+DYE)**
  - **BamHI**-entsyymiä
  - **PstI**-entsyymiä
  - **EcoRI**-entsyymiä
  - Katkaisupuskuriliuosta (**2x**-puskuriliuos)
  - **λ**- eli lambda-bakteriofagin DNA:ta (0,2 *µ*g/*µ*l)
  - DNA-väriainetta sisältävä latauspuskuriliuos (**6xLD** -liuos)
- Elektroforeesipuskuri (0,25 x TAE)
- Valmis agaroosigeeli (1 %)
- Mikropipettejä ja kärkiä
- Mikroputkia
- Mikroputkitelinteitä
- Permanent-tusseja
- Sentrifugi
- Lämminvesihaude (ja lämpömittari)
- Agaroosielektroforeesilaitteisto ja virtalähde (kuvassa)
- UV-lamppu
- Geelinkuvauslaite
- Suojavarusteet: suojatakit ja -hanskat



Kuva 3 Kaupallinen geelielektroforeesilaitteisto.

Esivalmisteluissa tarvittavat välineet

- agaroosijauhe
- tarkka vaaka agaroosin punnitsemista varten
- 50xTAE-puskuriliuosta (kantaliuos)
- tislattua vettä

Tämä teos on lisensoitu Creative Commons Nimeä-JaaSamoin 4.0 Kansainvälinen –lisenssillä. Salla Merenheimo, Justus Mutanen & Anu Wicklund / BioPop-tiedeluokka 2019

- mittalasi
- lasipulloja
- erlenmeyer-pullo
- mikroaaltouuni
- geelikelkka ja -kampa
- maalarinteippiä ja permenent-tusseja

Esivalmistelut

1. Valmista geeliä varten 1 x TAE -puskuria sekoittamalla 10 ml 50 x TAE -kantaliuosta ja 490 ml tislattua vettä.
2. Valmista 1% agaroosigeeli: punnitse 1 g agaroosia erlenmayerin pohjalle. Lisää joukkoon 100 ml 1 x TAE -puskuria. Sekoita kevyesti. Kuumenna seosta varovasti mikroaaltouunissa välillä sekoitellen, kunnes seos on kirkasta. Seos ei saa kiehua. Anna seoksen hieman jäähtyä ja kaada jäähtynyt neste kelkkaan. Aseta kammat paikoilleen ja anna geelin jähmettyä. Säilytä geeli kelkassaan jääkaapissa märkään käsipaperiin käärittynä.
3. Valmista 0,25 x TAE -elektroforeesipuskuria sekoittamalla 250 ml 1 x TAE -puskuria ja 750 ml tislattua vettä.
4. BioRadin reagenssisarjan reagenssien esivalmistelut:
   - Valmista DNA-kokomarkkeri **(M+DYE)** sekoittamalla mikroputkeen 10 µl DNA-ladderia ja 2 µl 6x LD-latauspuskuria. Sentrifugoi.
   - Valmista **2x katkaisupuskuriliuos** sekoittamalla mikroputkeen 100 µl 10 x FD-buffer -kantaliuosta ja 400 µl tislattua vettä. Sentrifugoi.
   - Laimenna **lambda-bakteriofagin DNA**:ta sekoittamalla mikroputkeen 80 µl DNA:ta ja 40 µl tislattua vettä. Sentrifugoi.
   - Entsyymejä käytetään sellaisenaan.
   - 6x LD -latauspuskuria käytetään sellaisenaan.
5. Laita lämminvesihaude lämpenemään 37 °C asteeseen.

Työturvallisuus

- Käytä koko työn ajan suojatakkia ja suojahanskoja.
- Käytä agaroosielektroforeesin virtalähdettä vain ohjaajan avustuksella.
- Käytä UV-lamppua ja geelinkuvauslaitetta vain ohjaajan avustuksella.

Työohje

Työohje perustuu Bio-Radin reagenssisarjaan: *Restriction Digestion and Analysis of Lambda DNA Kit.*

Tutustu ohjaajan opastuksella mikropipetin käyttämiseen ennen työn aloittamista!

Tämä teos on lisensoitu Creative Commons Nimeä-JaaSamoin 4.0 Kansainvälinen –lisenssillä. Salla Merenheimo, Justus Mutanen & Anu Wicklund / BioPop-tiedeluokka 2019

1. Ota esille entsyymit, DNA, katkaisupuskuriliuos ja latauspuskuriliuos. Pidä näitä liuoksia jäähauteessa koko työn ajan.
2. Ohjaaja kertoo, tekeekö ryhmäsi L-, P-, E- vai B-reaktion. Nimeä mikroputki ohjaajan ohjeistaman reaktion mukaan seuraavasti:
    a. L-reaktio = L (Lambda-bakteriofagin DNA)
    b. P-reaktio = P (PstI-entsyymin katkaisu)
    c. E-reaktio = E (EcoRI-entsyymin katkaisu)
    d. B-reaktio = B (BamHI-entsyymin katkaisu)
3. Pipetoi mikroputkeen seuraavan taulukon mukaisesti aineita (kukin ryhmä tekee vain yhden reaktion):

Mikro-putki	λ-DNA	**2x**-katkaisu-puskuriliuos	**PstI**	**EcoRI**	**BamHI**	Yhteensä
L	4 µl	6 µl	–	–	–	10 µl
P	4 µl	5 µl	1 µl	–	–	10 µl
E	4 µl	5 µl	–	1 µl	–	10 µl
B	4 µl	5 µl	–	–	1 µl	10 µl

4. Pipetoi aineet mikroputken pohjalle. Sekoita sisältöä napauttamalla ja sentrifugoi neste pohjalle.
5. Pidä mikroputkia +37 °C vesihauteessa 10–30 minuuttia. Kasatkaa tällä välin elektroforeesilaitteisto.
6. Lisää 2 µl **6xLD** -latauspuskuriliuosta jokaiseen mikroputkeen. Sekoita sisältöä napauttamalla ja sentrifugoi neste pohjalle.
7. Pipetoi reaktioseoksia agaroosigeelin kuoppaan (vain yhtä reaktiota yhteen kuoppaan) seuraavalla tavalla:
    a. Kuoppa 1 = DNA-kokomarkkeri **M+DYE** (ohjaaja pipetoi) (5 µl)
    b. Kuoppa 2 = L-reaktio (10 µl)
    c. Kuoppa 3 = P-reaktio (10 µl)
    d. Kuoppa 4 = E-reaktio (10 µl)
    e. Kuoppa 5 = B-reaktio (10 µl)
8. Aja geeliä 200 V jännitteellä 20–30 minuutin ajan tai 100 V 30–45 minuutin ajan. Tarkkaile näytteiden ajautumista ajon aikana.
9. Nosta geeli pois ajokammiosta ja tarkastele sitä UV-lampun avulla. Väriaine tarttuu DNA:han ja hohtaa sinisenä UV-valossa.
10. Kuvaa geeli UV-valossa geelinkuvauslaitteella (ohjaajan avustuksella).
11. Tutki tuloksia geeliltä. Kuinka monta pätkää katkaisusta tuli? Kuinka monesta kohtaa kukin entsyymi katkaisee DNA:n? Minkä kokoisia pätkät ovat?

Pohdittavaksi työn jälkeen

1. Miksi työssä tehtiin L-reaktio, johon ei lisätty entsyymiä?

    L-reaktio toimi työssä kontrollinäytteenä. Sen avulla varmistettiin, että lambda-bakteriofagin DNA oli ehjä ennen katkaisuentsyymien lisäämistä.

Tämä teos on lisensoitu Creative Commons Nimeä-JaaSamoin 4.0 Kansainvälinen –lisenssillä. Salla Merenheimo, Justus Mutanen & Anu Wicklund / BioPop-tiedeluokka 2019

2. Miksi katkaisuentsyymireaktio kestää +37 °C:ssa 30 minuuttia, mutta huoneenlämmössä yli 8 tuntia?

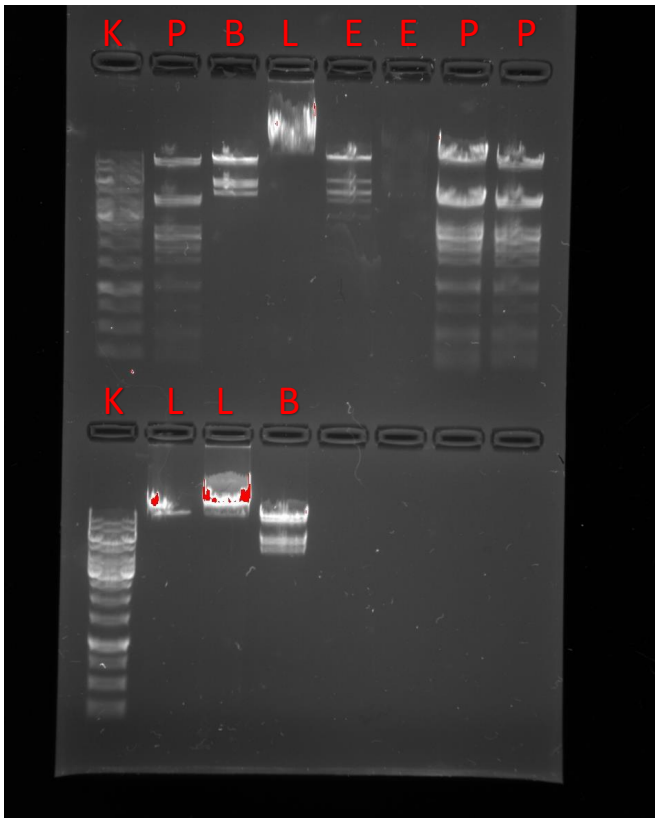
   Työssä käytettävien entsyymien optimilämpötila on 37 °C. Siten näiden entsyymien toiminta on tehokkainta 37 °C asteen lämpötilassa.

3. Mitä tapahtuu, jos näytteitä ajetaan geelielektroforeesissa 200 V jännitteellä kahden tunnin ajan?

   Jos näytteiden annetaan ajautua elektroforeesissa liian pitkään, DNA-palat kulkeutuvat koko geelin läpi ja päätyvät puskuriliuokseen. Jos näin pääsee tapahtumaan, geelikuvauksesta ei saada tuloksia ja näytteet on valmistettava uudestaan. Siksi näytteiden kulkeutumista on tarkkailtava geeliajon aikana.

4. Miten voisit koota katkaistuista DNA-palasista jälleen kokonaisen lambda-bakteriofagin DNA:n?

   Katkaistuja DNA-palasia voidaan liittää yhteen ligaasi- eli liittäjäentsyymien avulla. Katkaisuentsyymien tapaan myös kunkin liittäjäentsyymin toiminta on spesifiä ja kukin entsyymi tunnistaa DNA:sta tietyn emässekvenssin.



Kuva 4 Ajettu geeli geelinkuvauslaitteella kuvattuna. K = DNA-markkeri, L = lambda-faagin DNA, P = PstI-entsyymillä käsitelty DNA, B = BamHI-entsyymillä käsitelty DNA, E = EcoRI-entsyymillä käsitelty DNA. Kuva: Tomi Kiviluoma.

5. Katkaisuentsyymit voivat jättää DNA:han kohesiiviset päät (tarrapäät) tai tylpät päät. Mitä tällä tarkoitetaan?

   Kohesiivisissa päissä DNA-molekyylin katkaisukohdissa on muutaman emäksen pituiset yksijuosteiset osat. Tylpissä päissä katkaisuentsyymi on katkaissut juosteet täsmälleen samasta kohdasta, jolloin yksijuosteisia pätkiä ei synny.

6. Entsyymien katkaisukohdat ovat usein palindromisia. Mitä tällä tarkoitetaan?

   DNA:ssa palindromisuus tarkoittaa sitä, että koodaavan juosteen ja mallijuosteen emäsjärjestys on sama luettaessa DNA:ta 5’→ 3’ -suunnassa. Esimerkiksi katkaisukohta 5’ATCGAT3’ on palindrominen, sillä sen vastinjuoste 3’TAGCTA5’ on 5’→3’ suunnassa 5’ATCGAT3’.

Tämä teos on lisensoitu Creative Commons Nimeä-JaaSamoin 4.0 Kansainvälinen –lisenssillä. Salla Merenheimo, Justus Mutanen & Anu Wicklund / BioPop-tiedeluokka 2019