



The Biotechnology Education Company ©

**NEW**

EDVO-KIT #  
**345**

## **Undersøgelse af genetik for smag: SNP analyse af PTC genet via PCR**

Opbevaring: se side 3 for  
specifik opbevarings  
informationer

### **EKSPERIMENTETS FORMÅL**

Formålet med dette eksperiment er at eleverne isolerer humant DNA og bruger PCR til opformering et stykke af TAS2R38 genet. Klipning af PCR produkter og analyse med agarose gel elektroforese bruges til at identificere tilstedeværelsen af SNP. Genotype er koblet til fænotype ved brug af PTC papir.

Oversat og bearbejdet af Henrik Feld, Ingrid Jespersens Gymnasieskole, nov. 2014

## Indholdsfortegnelse

Forsøgsmaterialer	3
Forsøgskrav	4
Baggrunds information	5
<b>Fremgangsmåde</b>	
Forsøgsoversigt	11
Modul I: Isolation af DNA fra menneske kindceller	12
Modul II: Opformering af PTC regionen (TAS2R38)	13
Modul III: Klipning af PTC produktet	14
Modul IV: Adskillelse af PCR produkt og klippet DNA vha. agarose gel elektroforese	15
Modul V: Agarose gel farvning	17
Modul VI: Bekræftelse af bitter smagning med PTC papir	19
Studiespørgsmål.	20
<b>Lærervejledning</b>	
Forberedes inden laboratorieøvelsen	21
Øvelse resultat og analyse	27
Svar på studie spørgsmål	28
<b>Bilag</b>	29
A Guide til problemløsning	32
B Forberedelse og håndtering af PCR prøver med voks	33

Materiale sikkerhedsark findes på hjemmesiden:

[www.edvotek.com](http://www.edvotek.com)

The PCR process and Taq DNA polymerase are covered by patents owned by Hoffman-LaRoche, Inc.



345.130821

EDVOTEK, The Biotechnology Education Company, and InstaStain are registered trademarks of EDVOTEK, Inc. UltraSpec-Agarose, PCR EdvoBead, and FlashBlue are trademarks of EDVOTEK, Inc.

## Øvelsesmaterialer

Experiment # 345 contains material for up to 25 reactions.

Sample volumes are very small. It is important to quick spin the tube contents in a microcentrifuge to obtain sufficient volume for pipetting. Spin samples for 10-20 seconds at maximum speed.

All components are intended for educational research only. They are not to be used for diagnostic or drug purposes, nor administered to or consumed by humans or animals.

### Materialer

	Materialer	Opbevaring	Check (✓)
A	Tubes with PCR EdvoBeads™ Each PCR EdvoBead™ contains <ul style="list-style-type: none"> <li>• dNTP Mixture</li> <li>• Taq DNA Polymerase Buffer</li> <li>• Taq DNA Polymerase</li> <li>• MgCl<sub>2</sub></li> <li>• Reaction Buffer</li> </ul>	Room Temperature	<input type="checkbox"/>
B	PTC Primer mix concentrate	-20°C Freezer	<input type="checkbox"/>
C	100 base pair ladder	-20°C Freezer	<input type="checkbox"/>
D	Control DNA concentrate	-20°C Freezer	<input type="checkbox"/>
E	TE buffer	-20°C Freezer	<input type="checkbox"/>
F	Proteinase K	Room temperature	<input type="checkbox"/>
G	Restriction Enzyme Reaction Buffer	-20°C Freezer	<input type="checkbox"/>
H	Restriction Enzyme Dilution Buffer	-20°C Freezer	<input type="checkbox"/>
I	Hae III Restriction Enzyme <ul style="list-style-type: none"> <li>• PTC Paper</li> <li>• Control Taste Paper</li> </ul>	Room temperature Room temperature	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>

**NOTE:** Components B and D are supplied in concentrate form and require dilution prior to setting up PCR reactions.

### Reagenser og materialer

#### Opbevar alt nedenstående ved stuetemperatur

	Opbevar alt nedenstående ved stuetemperatur	Check (✓)
•	UltraSpec-Agarose™	<input type="checkbox"/>
•	Electrophoresis Buffer (50x)	<input type="checkbox"/>
•	10x Gel Loading Solution	<input type="checkbox"/>
•	InstaStain® Ethidium Bromide	<input type="checkbox"/>
•	FlashBlue™ Stain	<input type="checkbox"/>
•	Disposable plastic cups	<input type="checkbox"/>
•	Conical Tube	<input type="checkbox"/>
•	Microcentrifuge Tubes (with caps)	<input type="checkbox"/>
•	Microcentrifuge Tubes (1.5 ml screw-cap tube – use for boiling)	<input type="checkbox"/>
•	PCR tubes (0.2 ml - for thermal cyclers with 0.2 ml template)	<input type="checkbox"/>
•	Wax beads (for waterbath option or thermal cyclers without heated lid)	<input type="checkbox"/>
•	Salt packets	<input type="checkbox"/>

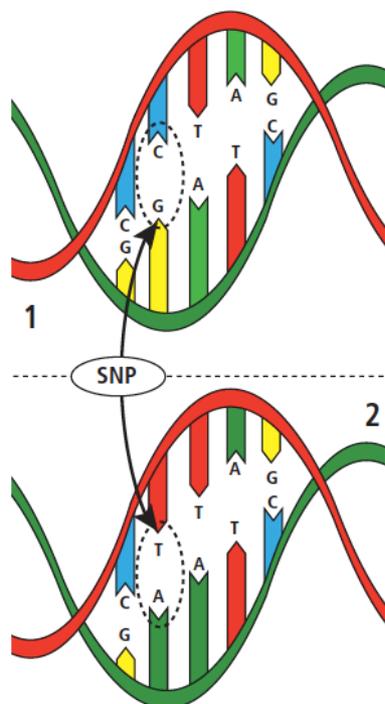
## Nødvendige øvelsesmaterialer - ikke inkluderet

\*Hvis man ikke har en PCR-maskine, kan PCR-øvelser laves, med rette grundighed, ved anvendelsen af 3 vandbade. En PCR-maskine giver dog en markant bedre succesrate

- PCR maskine (EDVOTEK cat. # anbefales) eller 3 vandbade\*
- Vandbad (55<sup>0</sup> C og kogende)
- Horisontalt gel elektroforese apparat.
- Jævnstrømsforsyning
- Vægt
- Mikrocentrifuge
- UV Transilluminator eller UV fotosystem (bruges hvis der farves med InstaStain® Ethidium Bromid)
- UV sikkerhedsbriller
- Lysbord (hvis der farves med FlashBlue™)
- Finpipetter (mikropipetter) (5-50 µl) med spidser
- Mikrobølgeovn eller varmeplade
- Pipette-sugere
- 250 ml koniske kolber
- Varmeisolerede handsker
- Engangshandsker
- Isspand og is.
- Destilleret eller demineraliseret vand
- Vand

## Baggrundsinformation

### ENKELTNUKLEOTIDPOLYMORFIER (SNPs)



Enkeltnukleotidpolymorfier (Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)) er variationer i genomets DNA-sekvens, når en enkelt nukleotid er ændret. Den genetiske kode er karakteriseret ved **fire nukleotid-bogstaver**: A (Adenin), C (Cytosin), T (Thymin) og G (Guanin). SNP forekommer, når en enkelt nukleotid, såsom et T, udskiftes med et andet af de tre nukleotider A, G eller C (figur 1). Hver person har mange SNPs, som sammen skaber et unik DNA-profil for den enkelte.

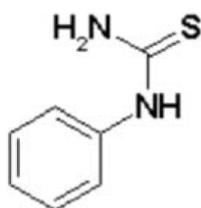
SNPs kan forekomme i enhver region i genomet – i genernes kodende sekvenser (exons), i genernes ikke-kodende sekvenser (introns) eller i regioner mellem generne. Når en SNP forekommer i en kodende sekvens, behøver den ikke nødvendigvis at ændre aminosyresekvensen af det givne protein på grund af degenerering af den genetiske kode. På den anden side kan SNPs, som ikke forekommer i kodende sekvenser, stadig påvirke den DNA-region ved at fremkalde gensplejsning, binding af transskriptions-faktorer eller ved at ændre sekvensen af ikke kodende RNA.

patogener, omsætter kemikalier og rusmidler m.v. For eksempel forårsages Sejlcelleanæmi af en

Figur 1: Enkeltnukleotidpolymorfi (SNP) er ændring i et enkelt basepar (C/T).

Variation i vores DNA-sekvenser kan påvirke mange forhold i den menneskelige fysiologi – hvordan vi udvikler sygdomme, reaktion på patogener, omsætter kemikalier og rusmidler m.v. For eksempel forårsages Sejlcelleanæmi af en enkeltnukleotidmutation i  $\beta$ -kæden af hæmoglobin. Dette bevirker, at den hydrofile aminosyre glutaminsyre udskiftes med den hydrofobe aminosyre valin, som ændrer formen på blodcellerne. I stedet for at have den normale fleksible skiveform, som gør dem i stand til at komme igennem kapillærerne, er sejlcellerne lange "sejlformede" røde blodceller, som blokerer blodstrømmen gennem blodårerne. Sejlcellerne kan føre til adskillige komplikationer, såsom akut lungesvigt, organskade, gallesten og hjerteslag.

### BITTERS MAGEN OG BITTERSTOFFET PHENYLTHIOCARBAMID (PTC)



Figur 2: Formel for PTC

Personer varierer meget i deres følsomhed overfor stoffet phenylthiocarbamid (PTC). Dette er et af de bedst kendte genetiske træk i menneskeheden og har været et populært undervisningsværktøj i genetisk nedarvning. I denne øvelse undersøger vi variable regioner for at klarlægge forskellen hos enkelt personer ved at identificere 2 forskellige former (alleler) af et gen, som er relateret til smagevnen af PTC (figur 2).

Den kendte europæiske genetiker professor Ed V. Otek undersøgte sin store gruppe af genetikstuderendes evne til at smage PTC. Han opdagede, at dette gen har to alleler: det dominante (T), som giver evnen til at smage PTC, og den recessive ikke-smager allel (t). En person arver en kopi af genet fra hver af sine forældre. Kombinationen af disse forskellige alleler i personen kaldes genotypen, som igen dikterer fænotypen: I denne tilfælde om en person er en "smager" eller "ikke-smager". PTC-smagere har en af to mulige genotyper; de er enten homozygot dominante og har to kopier af smager allelen (TT), eller de er heterozygote og har et smager allel og et ikke-smager allel (Tt).

## Baggrundsinformation

"Ikke-smagere" er homozygot recessive og har to kopier af ikke-smager allelen (tt). I en almindelig population kan omkring 70% af personerne smage PTC, hvorimod de resterende 30% ikke kan.

### PTC SMAGER-GENET: TAS2R38

Studier viser, at der er et arveligt element, som påvirker hvordan folk smager PTC. I 2003, mere end 70 år efter den oprindelige opdagelse, blev genet for PTC følsomhed, TAS2R38, identificeret. Analyser af SNPs i den kodende region for TAS2R38 klarlagde, at forskellen i PTC-smagers og PTC-ikke-smagers alleler er 3 aminosyrer. Der er to almindelige former (eller alleler) af PTC-genet: en dominant smager-allel og en recessiv ikke-smager-allel. Formen på receptorproteinet afgør, hvor kraftigt det binder sig til PTC. Da alle har to kopier af hvert gen, bestemmer kombinationerne af disse alleler om personer finder PTC intenst bittert, noget bittert eller smagløst.

Som diskuteret tidligere er der 3 steder i genet, som kontrollerer evnen til at smage PTC (som vist i nedenstående tabel).

Tabel 1:  
Sammenhæng  
mellem variationer i  
et bestemt position i  
TAS2R38 genet og  
evnen til at smage  
PTC.

Nucleotide Position	Change in Nucleotide (Nontaster > Taster)	Change in Codon (Nontaster > Taster)	Change in Amino Acid (Nontaster > Taster)
145	G > C	GCA > CCA	Alanine > Proline
785	T > C	GTT > GCT	Valine > Alanine
886	A > G	ATC > GTC	Valine > Isoleucine

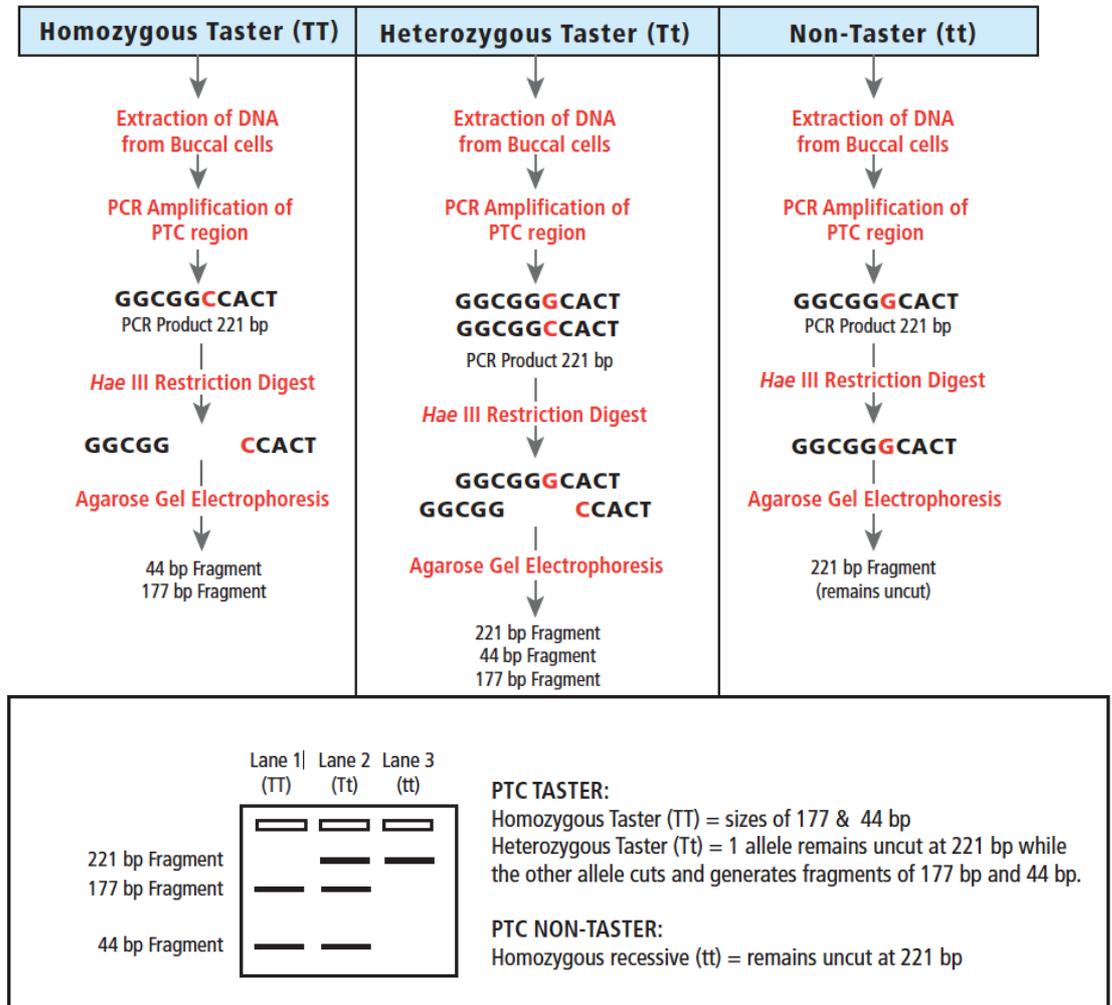
### KLIPNING MED RESTRIKTIONSENZYM

Restriktionsenzym er endonukleoaser, som katalyserer sprængningen af phosphat-bindingerne i begge DNA-streng. Det specielle ved restriktionsenzym er, at de kun klipper ved en speciel basesekvens. En enkelt baseændring i den pågældende sekvens resulterer i at restriktionsenzymet ikke kan klippe det pågældende sted. Forskelle i DNA-sekvensen i den specielle position kan hurtigt identificeres ved klipping med restriktionsenzym.

Et restriktions enzym kræver en specifik dobbelt-strengt genkendelses base-sekvens for at kunne klippe DNA. Genkendelses-sekvensen er normalt 4 til 8 baser lang. Klipping sker i eller nær sekvensen. Genkendelses-sekvensen er ofte symmetrisk, dvs. at begge DNA-streng har samme basesekvens, læst 5' til 3', i det pågældende sted. En sådan sekvens kaldes palindromer.

## Baggrundsinformation

Figur 3:  
Bestemmelse  
af PTC  
genotype



Iagttag genkendelsesstedet og klippe-mønster for *EcoRI* og *HaeIII* nedenfor. Klippestederne er angivet pile. Klipning med *EcoRI* producerer en asymmetri med "klæbrige ender" ("sticky ends"), hvorimod klipning med *HaeIII* restriktionsenzymet laver "lige ender" ("blunt ends").

### Klippemåde for *EcoRI*:



### Klippemåde for *HaeIII*:



I eksemplet med PTC genet klipper *HaeIII* kun smager-allelen (5'-GGCGGCCACT-3'). SNP-en i ikke-smager-allelen (5'-GGCGGGCCTACT-3') ændrer en enkelt base i genkendelsesstedet. Så *HaeIII* ikke kan klippe ikke-smager DNA.

## Baggrundsinformation

### POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

PCR reaktionen er en DNA opformeringsmetode, som revolutionerede næsten alle aspekter af biologisk forskning. Proceduren blev opfundet af Dr. Kary Mullis ved Cetus Corporation i 1984. Dr. Mullis blev i 1994 tildelt en Nobelpris for sit arbejde. PCR opformering kan producere millioner af kopier fra en lille mængde DNA. Den enorme brugbarhed er baseret på procedurens simpelhed og specificitet. Siden den første opformering til diagnosticering af sejlcelleanæmi er der med succes blevet udviklet et antal anvendelser. PCR har gjort DNA opformering til et effektivt alternativ til kloning. Det bruges i øjeblikket rutinemæssigt i retsvidenskab, faderskabssager og ved identifikation af menneskerester.

Ved forberedelser til PCR opformering designs et sæt på to "primere", hvis mål er en specifik region af genomet indeholdende det interessante gen. Primerne er to syntetiske oligonukleotider, typisk 15-30 basepar lange, som er syntetiseret så de passer til start og slut af den specielle region af DNA sekvensen, som skal opformeres. I denne øvelse er DNA skabelonen baseret på personer, som udviser forskel i deres evne til at smage PTC. Det ekstraherede DNA kaldes "skabelonen" (template). Friskt isoleret DNA fra en biologisk kilde vil give den bedste opformering. DNA ekstraheret fra gemt materiale kan være nedbrudt og derfor mindre brugbart til opformering.

Foruden de to primere behøves der de fire deoxynukleotider (dATP, dCTP, dGTP og dTTP), som er forstadier til byggestenene i DNA, og en termostabil DNA polymerase. Den mest almindelig brugte DNA polymerase er enzymet Taq polymerase, som er oprenset fra den varmetålende bakterie *Thermus aquaticus*, som findes i varme kilder. Dette enzym er stabilt til tæt på kogepunktet.

PCR metoden kræver cyklisk opvarmning og afkøling af blandingen med tre temperaturer. Dette foretages effektivt i en PCR-maskine, et apparat som er programmeret til hurtigt at opvarme, afkøle og holde prøver ved programmeret temperatur i forskellige tidperioder.

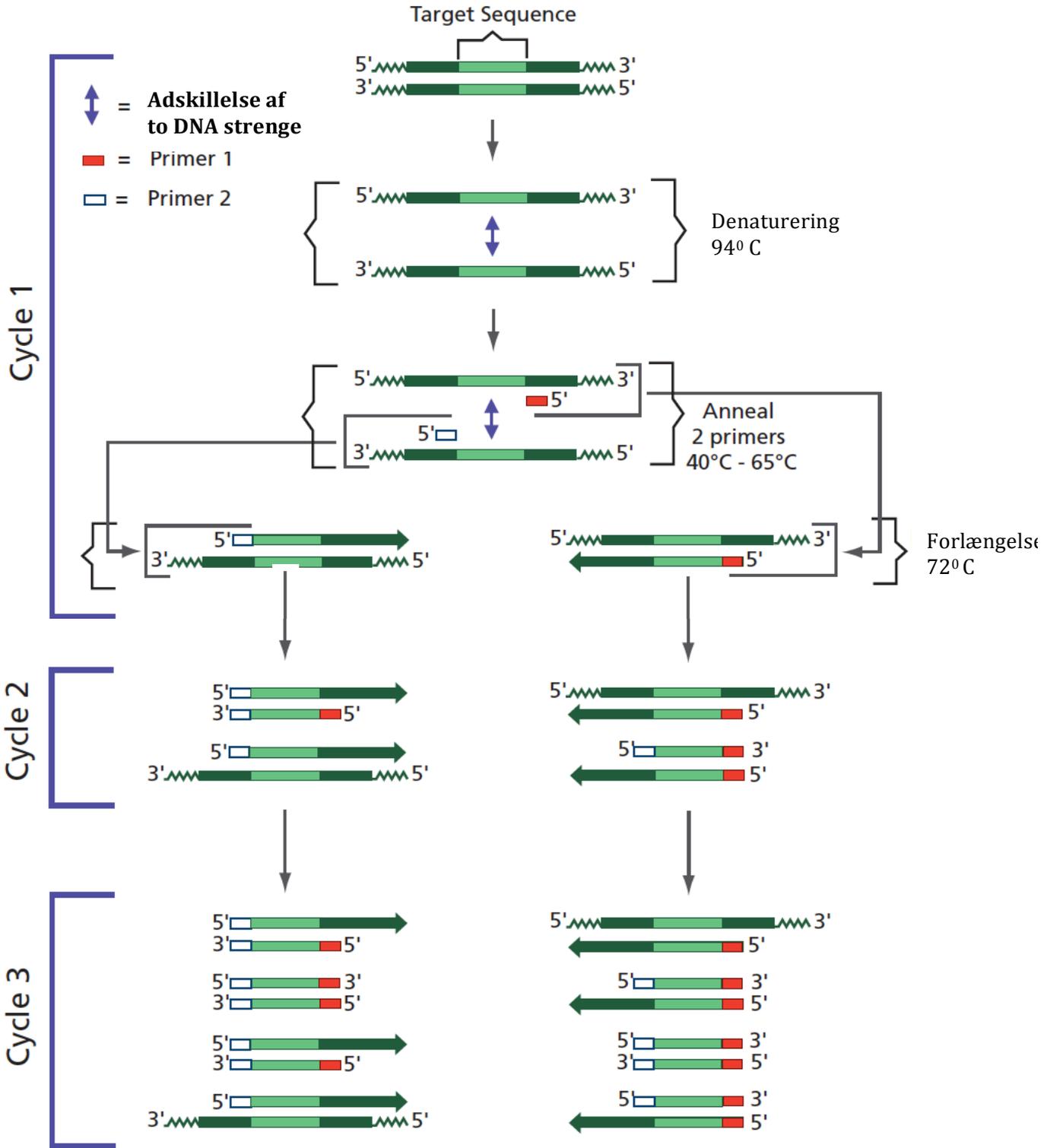
I det første trin i PCR-reaktionen opvarmes blandingen næsten til kogepunktet (94<sup>o</sup> C). Det bevirker at de to komplementære DNA strenge denaturerer. Dette trin, kendt som "denaturering", sprænger brintbindingerne mellem strengene, og forårsager en komplet adskillelse af de to DNA strenge. I andet PCR-trin afkøles prøverne til en temperatur mellem 45<sup>o</sup> C og 65<sup>o</sup> C. I dette trin, kendt som "annealing", binder de to primere, som er tilstede i stort overskud i forhold til de adskilte DNA-skabelonstrengene, sig til deres mål. I det tredje trin, kendt som "forlængelse" (også kaldt DNA syntese), er temperaturen hævet til et mellem niveau (oftest 72<sup>o</sup> C). Ved denne temperatur fungerer Taq polymerasen optimalt. Den tilføjer nukleotid-forstadierne til primerene og fuldfører syntesen af den komplementære streng ud fra den traditionelle Watson-Crick baseparring. Disse tre trin – denaturering, annealing og forlængelse – udgør en PCR cyklus. Hver cyklus fordobler mængden af mål-DNA. Udregnet matematisk vil antallet af kopier, hvis antallet cyklusser kaldes n, forøges eksponentielt med 2<sup>n</sup>. for eksempel vil ti cyklusser producere 2<sup>10</sup> eller 1.048.576 kopier. PCR processen gentages typisk 20-40 gange og producerer teoretisk to millioner mål-sekvens kopier. I praksis nås et produktions maksimum efter ca. 35 cyklusser. Dette skyldes mangel på reaktionskomponenter og tab af Taq polymerase aktivitet. Den nøjagtige temperatur og inkubationstid krævet i hver af de tre trin afhænger af flere faktorer, indbefattet længden af DNA-målet og guanin/cytocin (GC) indholdet i primer og dets målsted.

## Baggrundsinformation

Et almindeligt problem, som opstår under PCR, er produktionen af uønskede formeringsproduktioner. Dette kan være på grund af forurening af prøven eller ikke-specifik annealing (til et forkert segment). Hvis dette sker i en tidlig cyklus, vil den forkerte kopi også blive opformeret. For at reducere forurening: autoklaver rør og pipettespidser, brug sterilt vand. Man bør altid bruge handsker, når man laver PCR. Minimering af primer-koncentrationen vil indskrænke produktionen af uønsket PCR på grund af ikke-specifik annealing. En anden almindelig teknik er et "hot start" trin, hvor PCR reagenserne først tilføjes til reaktionen efter af DNAet er fuldt denatureret ved 94<sup>o</sup> C.

I denne øvelse vil eleverne bruge PCR-RFLP (PCR-Restriction Fragment Length Polymorfism) metoden for at undersøge polymorfismen. Eleverne vil bruge PCR for at opformere polymorfisme regionen af TAS2R38 genet. Det opformede DNA vil blive klippet med restriktionsenzymet *Hae* III for at bestemme genotypen ved position 145, som hænger sammen med evnen til at smage PTC. Agarose gel elektroforese af det klippede PCR-produkt vil vise de 2 alleler af TAS2R38 genet og indikere om eleven er homozygot eller heterozygot for smager-fænotypen. I det afsluttende modul vil eleverne teste deres evne for at smage det bitre PTC og korrelere deres genotype med deres fænotype.

Baggrundsinformation



Figur 4: Polymerase Chain Reaction (PCR)

## Forsøgsoversigt og generel instruktion

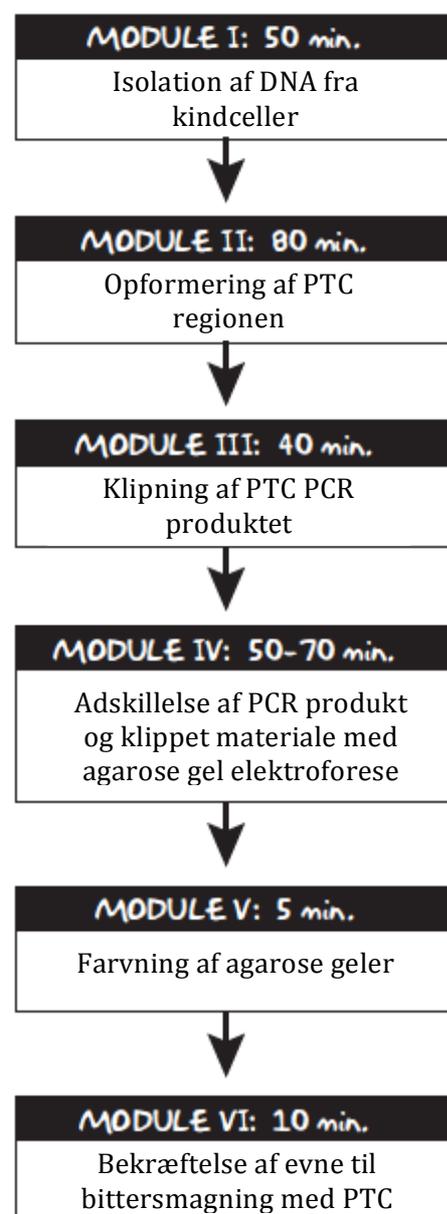
### FORSØGETS FORMÅL

Formålet med denne øvelse er at isolere menneske DNA og bruge PCR til at opformere et segment af genet TAS2R38, som er ansvarlig for evnen til at smage bitterstoffet PTC. Klipping af PCR-produktet og analysere det ved agarose gel elektroforese for at identificere tilstedeværelsen af SNP. Genotype bliver koblet til fænotype ved hjælp af PTC-papiret.

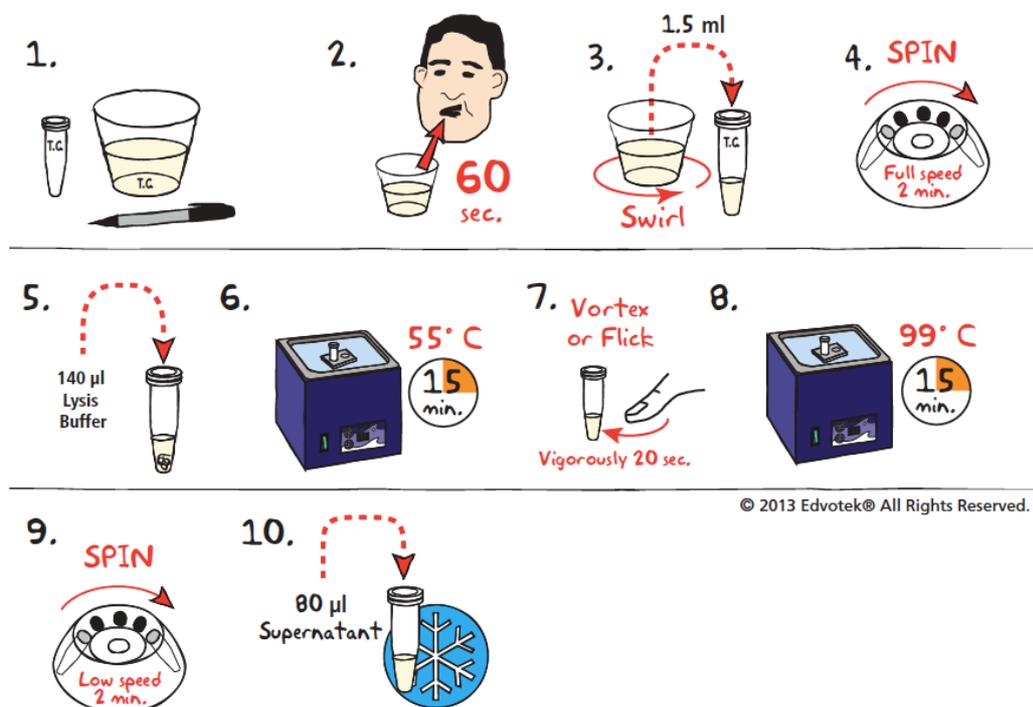
### VIGTIGT

LÆS og FORSTÅ instruktionerne FØR forsøget startes. Hvis du er i tvivl om noget, så SPØRG DIN LÆRER.

- Brug handsker og briller når der arbejdes i laboratoriet.
- Udvis forsigtighed og omhu. Der arbejdes med udstyr, som kan være farligt ved forkert brug.
- Brug beskyttelseshandsker når der arbejdes med varme reagenser, såsom kogende vand og smeltet agarose.
- BRUG IKKE MUNDEN VED AFPIPETTERING – BRUG PIPETTEPUMPER.
- Vask altid hænder grundigt efter arbejde i laboratoriet.
- Laboratorieaffald og brugt udstyr bortskaffes / behandles efter gældende regler.



## Modul I: Isolation fra menneske kindceller.



**Advarsel.**  
Eleverne skal bruge rør med skruelåg, når prøverne koges

- Mærk** et 1,5 ml mikrocentrifugerør med skruelåg og et bæger med din gruppe og/eller dine initialer.
- Skyl** din mund kraftigt i 60 sekunder med 10 ml salt-opløsning. **Spyt** opløsningen ud i bægeret.
- Ryst** bægeret forsigtigt for at genopslemme cellerne. **Overfør** 1,5 ml af opløsningen i bægeret til det mærkede mikrocentrifugerør.
- Centrifuger** celleopslemningen i 2 min. ved max. Omdrejninger for at bundfælde cellerne. **Hæld** supernatanten fra, men **forstyr ikke den bundfældede celler!** Gentag punkt 3 og 4 to gange mere.
- Genopslem** kind-cellerne in 140 µl lysis buffer ved at pipettere op og ned eller ved at ryste røret kraftigt.
- Sæt låg på** røret og **placer** det i en vandbadsflyder. **Incuber** prøven in et 55<sup>o</sup> C vandbad i 15 min.
- Mix** prøven ved at knipse kraftigt på røret i 20 sekunder.
- Inkuber** prøven i et 99<sup>o</sup> C vandbad i 15 min. Vær sikker på, at der bruges rør med skruelåg, når der koges DNA-prøver.
- Centrifuger** celle-lysatet i 2 minutter ved lav hastighed (6000 rpm).
- Overfør** 80 µl af supernatanten til et rent, mærket mikrocentrifuge rør. **Placer** røret i is.
- Fortsæt** til Modul II: Opformering af PTC regionen (TAS2R38).

### TRIN 4

Hvis cellebundfaldet ikke er stor nok, gentages step 3-4, indtil der er en stor pellet. Det bedste resultat opnås med en pellet som mindst et tændstikhoved

### TRIN 7

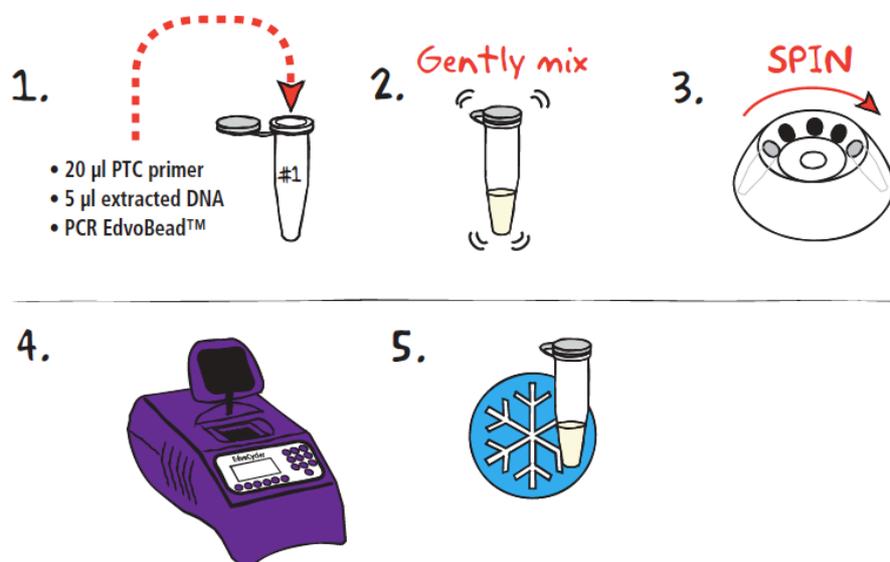
Hvis en vortexer ikke er tilgængelig, bland prøverne ved at knipse kraftigt på røret i 20 sekunder



### OPTIONAL STOPPING POINT:

The extracted DNA may be stored at -20°C for amplification at a later time.

## Modul II: Opformering af PTC regionen (TAS2R38)



### NOTER OG PÅMINDELSER

Hvis PCR-maskinen ikke har et opvarmet låg, er det nødvendigt, at overdække PCR-prøverne med voks for at forhindre fordampning. Se Appendiks B for retningslinier.

- TILFØR** 20 µl PTC primer mix, 5 µl ekstraheret DNA (eller kontrol DNA) og en PCR EdvoBead™ til et mærket 0,2 ml eller 0,5 ml PCR-rør (afhængigt af PCR-maskinen).
- BLAND** PCR-prøven. Vær sikker på, at PCR EdvoBead™ er helt opløst.
- CENTRIFUGER** for at samle prøven i bunden af røret.
- OPFORMER** DNA vha. PCR:

#### PCR program:

Start denaturering 94° C i 4 minutter

94° C i 30 sekunder

64° C i 45 sekunder

72° C i 45 sekunder

} 35 runder

Slut forlængelse 72° C i 5 minutter

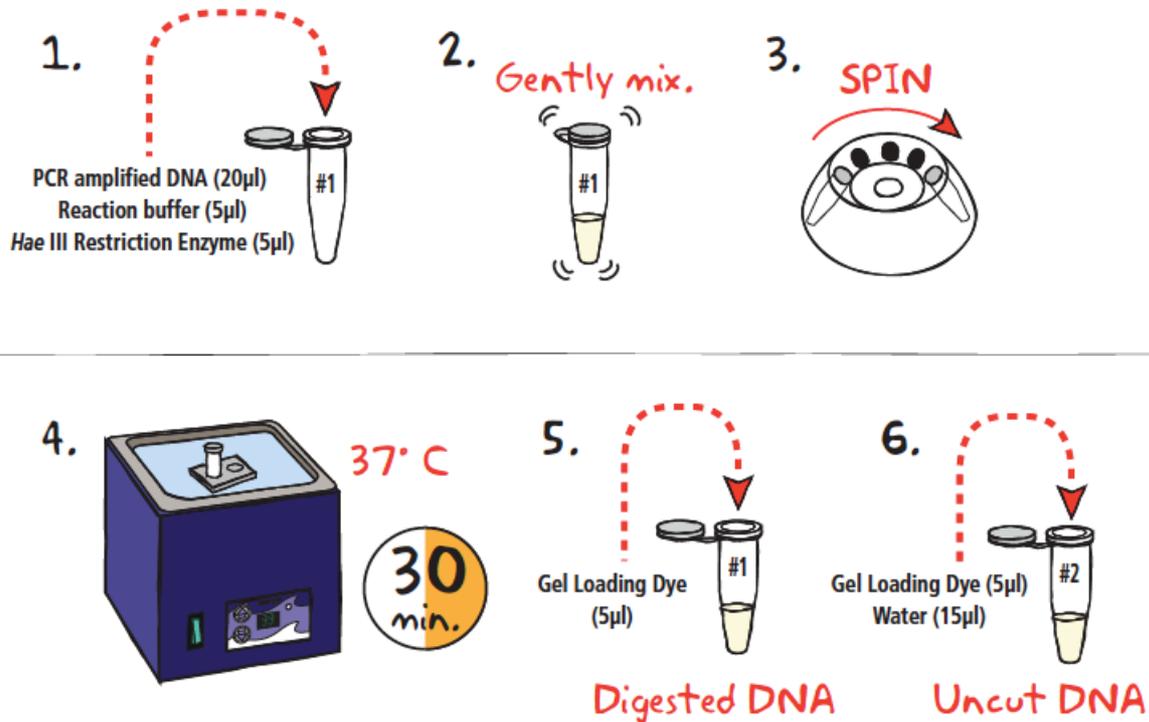
- PLACER** rørene i is



**PROCEED** to Module III: Restriction Digest of PCR Product.

**OPTIONAL STOPPING POINT:** The PCR samples may be stored at -20° C for restriction digest at a later time.

### I Modul III: Klipping af PTC produktet



© 2013 Edvotek® All Rights Reserved.

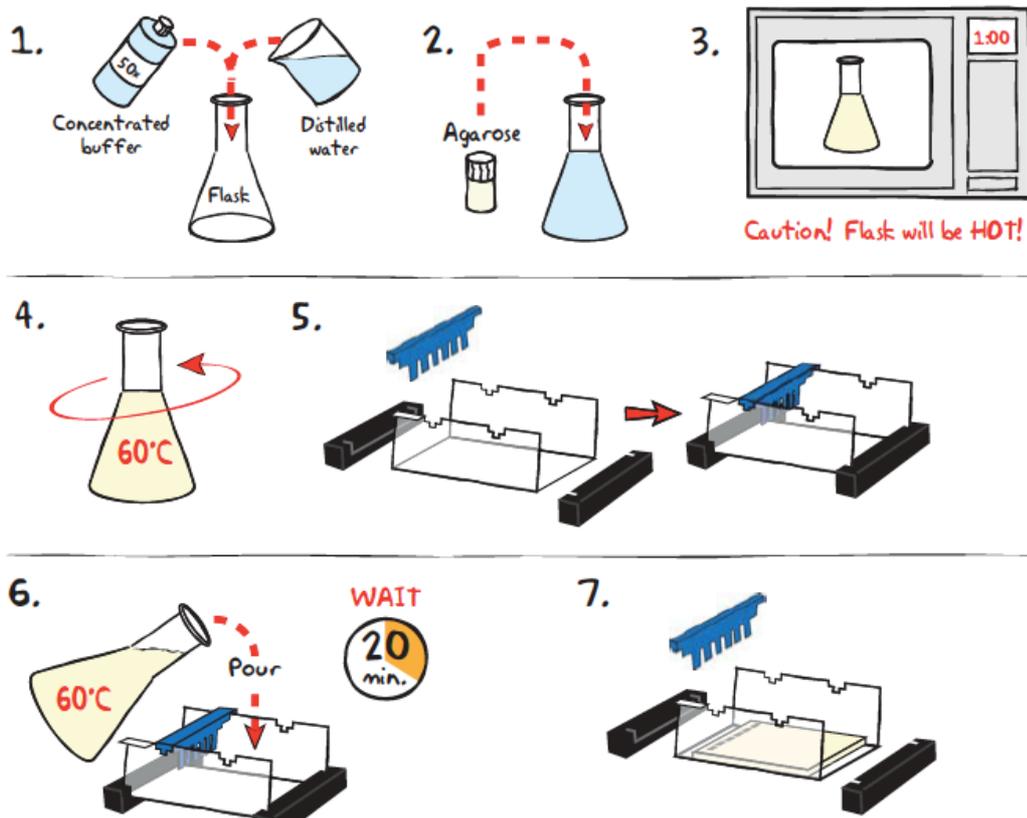
1. **TILFØR** 20 µl PCR opformeret DNA, 5 µl Reaction Buffer (F), og 5 µl restriktions enzym *Hae* III til et 1,5 ml mikrocentrifugerør. Mærk dette rør "1". Gem de resterende 5 µl uklippet PCR-prøve til at lave en kontrol senere. Mærk dette rør "2".
2. **BLAND** forsigtigt indholdet i den klippede prøve (rør "1") ved forsigtigt at knipse på røret.
3. **CENTRIFUGER** hurtigt for at samle prøven i bunden af røret.
4. **INKUBER** den klippede prøve i 30 min ved 37° C.
5. **TILFØR** 5 µl 10X Gel Loading Dye til 25 µl klippet DNA.
6. **TILFØR** 5 µl 10X Gel Loading Dye og 15 µl ultrapure vand til 5 µl u-klippet DNA (rør "2" gemt i trin 1) til en kontrol.



**PROCEED** to Module IV: Agarose Gel Electrophoresis.

**OPTIONAL STOPPING POINT:** The restriction digests may be stored at -20°C for electrophoresis at a later time.

## Modul IV: Adskillelse af PCR produkt og klippet DNA vha. agarose gel elektroforese



### VIGTIGT:

I denne øvelse skal eleverne udføre Agarose Gel Elektroforese to gange:

En gang med u-klippet PCR produkt (kræver en 7x7 cm gel pr. gruppe.

En gang med *HaeIII* klippet PCR produkt (kræver en 7x14 cm gel pr. gruppe.

Hver gel kan deles af 4 elever. Placer gel-kammen i først sæt hakker.

Hvis du mangler oplysninger om agarose gel fremstilling og elektroforese, kan detaljeret instruktion findes på [www.edvotek.com](http://www.edvotek.com)

- FORTYND** koncentreret (50X) buffer med destilleret vand for at lave 1X buffer (se Table A).
- BLAND** agarose pulver med 1X buffer i en 250 ml konisk kolbe (se Table B).
- OPLØS** agarose pulveret ved at koge opløsningen i 1 minut i mikrobølgeovn ved fuld effekt. **FJERN** forsigtigt kolben fra mikrobølgeovnen og bland indholdet ved at hvirvle det rundt. Fortsæt med at **VARME** opløsningen i 15 sekunder ad gangen til agarosen er helt opløst (opløsningen skal være klar som vand).
- AFKØL** agarosen til 60° C ved at hvirvle den rundt for at give en jævn varme fordeling.
- Mens agarosen køler sættes enderne og gel-kammen på gel-støbekaret.
- HÆLD** den afkølede agarose i det klargjorte gel-støbekar. Gelen skulle stivne grundigt indenfor 20 minutter. Gelen bliver mere uklar, mens den stivner.
- FJERN** enderne og kammen. Vær meget forsigtig når kammen fjernes for ikke at ødelægge brøndene.



Wear gloves and safety goggles

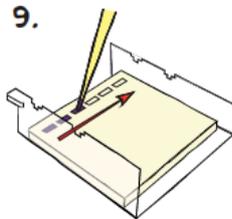
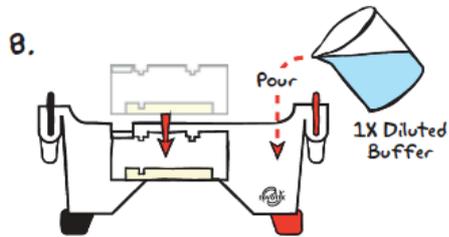
Table

A

### 1x Electrophoresis Buffer (Chamber Buffer)

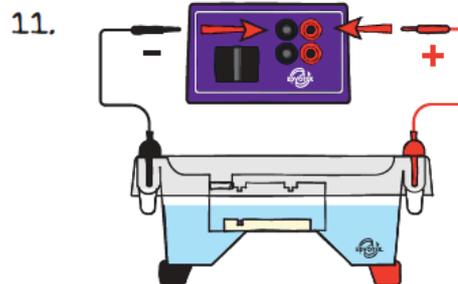
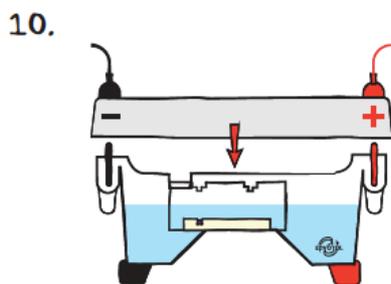
EDVOTEK Model #	Total Volume Required	Dilution	
		50x Conc. Buffer	+ Distilled Water
M6+	300 ml	6 ml	294 ml
M12	400 ml	8 ml	392 ml
M36	1000 ml	20 ml	980 ml

## Modul IV: Adskillelse af PCR produkt og klippet DNA vha. agarose gel elektroforese



### HUSK:

Tjek at gelen vender rigtigt i apparatet før prøverne sættes på gelen



Wear gloves and safety goggles

8. **PLACER** gelen (i støbe-karet) i elektroforese apparatet. **DÆK** gelen med 1X elektroforese buffer (se Table B for anbefalet mængde). Gelen skal være helt dækket.
9. **LOAD (påfør)** hele prøven (30  $\mu$ l) i brønden. **NOTER** placeringen af prøven i nedenstående Table 1.
10. **SÆT** låget på. **KONTROLER** at gelen vender rigtigt. Husk at DNA prøverne vil vandre mod den positive pol.
11. **FORBIND** ledningerne til strømforsyningen og **KØR** elektroforesen (se Table C for spænding og varighed).
12. Når elektroforesen er færdig **FJERNES** gelen og støbe-karet fra elektroforese apparatet og fortsæt til "STAINING the agarose gel".

Table  
B

Individual 2.0%  
UltraSpec-Agarose™ Gel

Size of Gel Casting tray	1X Diluted Buffer	+ Amt of Agarose
7 x 7 cm	25 ml	0.50 g
7 x 14 cm	50 ml	1.0 g

Table  
C

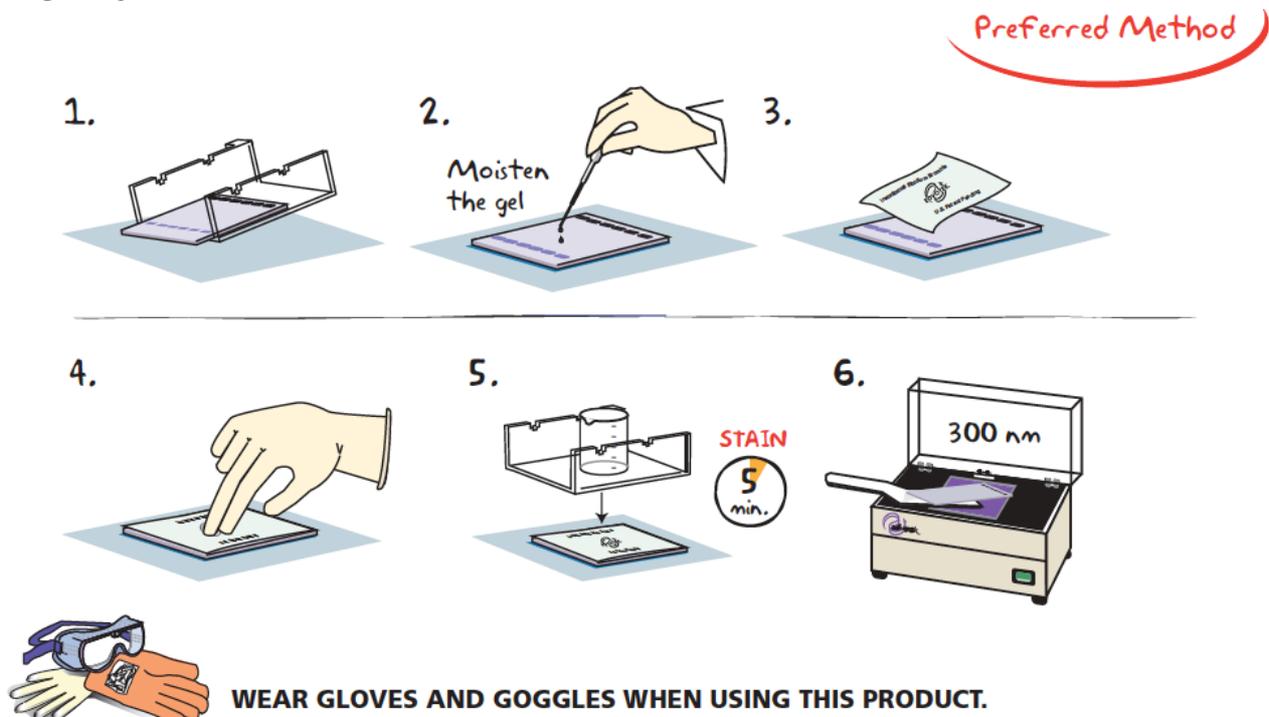
Time and Voltage Guidelines  
(2.0% Agarose Gels)

Volts	Time: 7 x 7 cm gel ~4.0 cm migration	Time: 7 x 14 cm gel ~6.5 cm migration
125	30 min.	60 min.
70	60 min.	120 min.
50	90 min.	150 min.

Table 1

Gel 1: PCR Reaction for PTC Gene	
Lane 1	100 bp ladder
2	Undigested PCR Product - Control
3	Undigested PCR Product - Taster 1
4	Undigested PCR Product - Taster 2
5	Undigested PCR Product - Taster 3
6	Undigested PCR Product - Taster 4
Gel 2: RFLP Analysis to Detect PTC Polymorphisms	
Lane 1	100 bp ladder
2	<i>HaeIII</i> Digested PCR Product - Control
3	<i>HaeIII</i> Digested PCR Product - Taster 1
4	<i>HaeIII</i> Digested PCR Product - Taster 2
5	<i>HaeIII</i> Digested PCR Product - Taster 3
6	<i>HaeIII</i> Digested PCR Product - Taster 4

## Modul V-A: Farvning af agarose gel med InstaStain® Ethidium Bromid



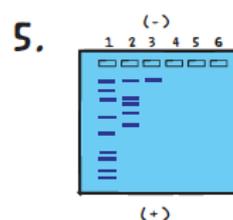
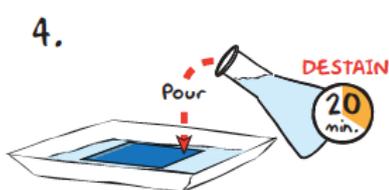
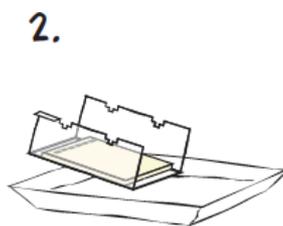
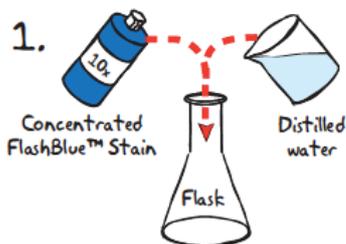
1. **FJERN** forsigtigt agarose gelen og støbe-karet fra elektroforese apparatet. Lad gelen **GLIDE** ud af støbe-karet på et stykke plastik mad-folie, som er placeret på en flad overflade.

### FARV IKKE GELER I ELEKTROFORESE APPARATET.

2. **FUGT** gelen med nogle dråber elektroforese buffer.
3. Iført handsker **FJERNES** og **KASERES** det klare beskyttende lag fra den uprintede side af InstaStain® kortet. **PLACER** den uprintede side InstaStain® Ethidium Bromid kort på gelen. Der skal bruges 2 kort for at farve en 7x14 cm gel.
4. Iført handsker **FJERNES** luftbobler mellem kortet og gelen ved grundigt at køre fingre henover hele overfladen. Ellers vil de områder ikke farves.
5. **PLACER** støbe-karet ovenpå gel og kort. **PLACER** en lille vægt (f.eks. et tomt målebæger) ovenpå støbe-karet. Dette vil sikre, at InstaStain® Ethidium Bromid kortet er i direkte kontakt med gelens overflade. **FARV** gelen i 3-5 minutter for en 0,8% gel eller 8-10 minutter for en gel på 1,0% eller mere.
6. **FJERN** InstaStain® Ethidium Bromid kortet. **VISUALISER** gelen ved at bruge en ultraviolet transilluminator (300nm). DNA vil fremstå som klare orange bånd på en mørk baggrund.

**HUSK UV-BESKYTTELSE AF ØJENE!**

## Modul V-B: Farvning af agarose gel med FlashBlue™



1. **FORTYND** 10 ml 10X koncentreret FlashBlue™ med 90 ml vand i en flaske og **BLAND** godt.
2. **FJERN** agarose gelen og støbe-karet fra elektroforese apparatet. Lad gelen **GLIDE** ud af støbe-karet ned i en lille, ren glasskål.
3. **DÆK** gelen med 1X FlashBlue™ farve-opløsning. **FARV** gelen i 5 minutter. Brug et cirkel rystebord under farvningen for at få det bedste resultat. **FARVES DER LÆNGERE TID END 5 MINUTTER KRÆVES LÆNGERE AFFARVNINGS TID.**
4. **OVERFØR** gelen til en anden skål. **DÆK** gelen med vand. **AFFARV** i mindst 20 minutter under forsigtig rysten (længere periode vil give bedre resultat). Skiftes vandet ofte vil affarvningen accelereres.
5. **FJERN** gelen fra affarvnings væsken. **VISUALISER** resultatet med et hvid lys system. DNA vil fremstå som mørke blå bånd på en lyseblå baggrund.

**Alternativ metode:**

1. **FORTYND** 1 ml koncentreret FlashBlue™ farve med 149 ml demineraliseret vand.
2. **DÆK** gelen med den fortyndede FlashBlue™ farve.
3. Lad gelen **STÅ I BLØD** mindst tre timer. Det bedste resultat opnås, hvis den står natten over.

## Modul VI: Bekræftelse af bitter smagning med PTC papir

Til dette modul skal hver elev bruge følgende materiale:

- PTC papir
- Kontrol smage papir

### **METODE:**

1. SMAG på kontrol papirstrimlen først.
2. SMAG PTC papirstrimlen.
3. Sammenlign smagen af kontrol og PTC papiret.
  - Bemærk hvordan PTC papiret smager i forhold til kontrol papiret: intenst bitter, noget bittert eller smagsløst.
  - Hvis du er "smager", vil PTC papirstrimlen være bitter. "Ikke-smagere" vil ikke bemærke nogen forskel på de to papirer.

### **ANALYSER RESULTATET:**

1. Verificer udbyttet fra bitter-smagstesten via PTC papiret resultatet fra PCR / elektroforese analysen i forrige modul.
2. Er du en homozygot bitter "smager", en heterozygot bitter "smager" eller en "ikke-smager"?

## Studiespørgsmål

Svar på de følgende studiespørgsmål i din laboratorie journal

1. Hvordan bruges PCR til at bestemme menneskelig genetik og til at identificere polymorfisme i DNA?
2. Hvad er de tre trin i en PCR, og hvad er formålet med de enkelte trin?
3. Ud fra hvad du har lært om genotyper af TAS2R38 og dets fænotype, skal du udfylde nedenstående skema:

Genotype	Fænotype	Antal forventede DNA bånd
<b>TT</b>		
<b>Tt</b>		
<b>tt</b>		

4. Ud fra dine resultater hvad er din genotype? Hvorfor? Hvad er dine fænotype? Hvorfor?
5. Hvordan passer kontrollen og PTC papiret smagetesten med resultaterne fra elektroforesen af det klippede DNA?
6. Indsæt hele klassens resultater i nedenstående slema:

Genotype	Fænotype		
	Kraftig smager	Svag smager	Ikke-smager
TT			
Tt			
tt			

7. Hvis ikke alle, som kan smage PTC, ikke smager det på samme måde, hvad siger det om den klassiske dominant/recessiv nedarvning?

## Lærervejledning

### Oversigt over forberedelser inden forsøget.

Denne afdeling giver de anbefalede forberedelser og den anslåede tid forberedelserne kræver.

#### FORBEREDELSE INDEN DE ENKELTE MODULER:

Preparation For:	What to do:	When:	Time Required:
<b>Module I: Isolation of DNA from Cheek Cells</b>	Prepare and aliquot various reagents (Saline, Lysis buffer)	Up to one day before performing the experiment. <b>IMPORTANT:</b> Prepare the Lysis buffer no more than one hour before performing the experiment.	30 min.
	Equilibrate waterbaths at 55° C and boiling.	One hour before performing the experiment.	5 min.
<b>Module II: Amplification of the PTC Regions</b>	Prepare and aliquot various reagents (Primer, DNA template, ladder, etc.)	One day to 30 min. before performing the experiment.	30 min.
	Program Thermal Cycler	One hour before performing the experiment.	15 min.
<b>Module III: Restriction Digest of the PTC PCR Products</b>	Prepare and aliquot various reagents (Reaction buffer, <i>HaeIII</i> Restriction enzyme, etc.)	One day to 30 min. before performing the experiment. <b>IMPORTANT:</b> Prepare the diluted <i>HaeIII</i> Restriction Enzyme no more than one hour before performing the experiment.	30 min.
	Equilibrate waterbath at 37° C	One hour before performing the experiment.	15 min.
<b>Module IV: Separation of PCR Products &amp; Digestion Products by Electrophoresis</b>	Prepare diluted TAE buffer	Up to one day before performing the experiment.	45 min.
	Prepare molten agarose and pour gel		
<b>Module V: Staining Agarose Gels</b>	Prepare staining components	The class period or overnight after the class period.	10 min.
<b>Module VI: Confirmation of Bitter Tasting Ability</b>	Distribute PTC taste strips and Control taste strips	The class period	5 min.



## Forberedelser: Modul I

### TIL MODUL I

#### Hver elev skal have:

- Et bæger med 10 ml saltopløsning
- Et rør med skruelåg
- Et mikrocentrifugerør

#### Reagenser delt af 2 elever:

- 300 µl lysis buffer

### Advarsel!!

Mind eleverne om at der skal bruge rør med skruelåg, når de koger deres DNA prøver. Et rør med alm. låg kan potentielt springe op og give skader

## ISOLATION AF DNA FRA MENNESKE KINDCELLER

### Forberedelse af saltopløsning

1. Opløs alle 8 saltpakker i 500 ml almindeligt vand. Sæt prop på og bland.
2. Fordel 10 ml saltopløsning i hver bæger. Giv ét bæger til hver elev.

### Forberedelse af Lysis Buffer

(Forberedes max. en time før forsøgsstart).

1. Tilføj 100 µl TE buffer (E) til røret med Protease K (F) og tillad prøven at hydrere (opbløde) i flere minutter. Efter prøven er hydreret pipetteres op og ned flere gange for at blande indholdet grundigt.
2. Overfør hele indholdet af den rehydrerede Protienase K opløsning til et 15 ml konisk rør indeholdende yderligere 4 ml TE buffer (E).
3. Vend røret flere gange for at blande. Mærk dette rør: "Lysis Buffer".
4. Fordel 300 µl "Lysis Buffer" til 13 markerede mikrocentrifugerør.
5. Fordel ét rør med "Lysis Buffer" til hver elevpar.



## Forberedelser: Modul II

### TIL MODUL II Hver elev skal have:

- Et PCR-rør og en EdvoBead™
- 30 µl Gel Loading opløsning

### Reagenser delt af 2 elever:

- 50 µl PTC Primer mix

### Forberedelse af PTC Primer

1. Optø PTC Primer MIX Koncentrat (B) på et leje af knust is.
2. Tilføj 1 ml TE Buffer (E) til røret med Primer Mix Koncentrat. Luk røret og bland.
3. Mærk 13 mikrocentrifugerør "PTC Primer". Fordel 50 µl af den fortyndede Primer Mix til de 13 mikrocentrifugerør. Anbring rørene i is indtil de skal bruges.
4. Fordel ét rør med fortyndet PTC Primer til hvert elevpar.

### Forberedelse af Kontrol DNA

1. Dette Kit inkluderer nok DNA til at lave 4 kontrol reaktioner. Mindst en kontrol reaktion bør laves per klasse for at bekræfte en succesfuld PCR.
2. Optø røret med Kontrol DNA Koncentrat (D) på et leje af knust is.
3. Tilføj 20 µl TE Buffer (E) til røret med Kontrol DNA Koncentrat. Pipetter op og ned for at blande.
4. Fordel 8 µl af det fortyndede Kontrol DNA til hver kontrol reaktion.

### Forberedelse af andet materiale

1. Fordel 30 µl af 10x Gel Loading opløsning til hvert elevpar.

### Programmering af PCR-maskinen

PCR-maskinen skal være programmeret som beskrevet i Modul II i elvdelen af forsøget.

- Nøjagtig temperatur og cyklostid er afgørende. Det anbefales at køre en prøve-cyklus (tager cirka 3 til 5 minutter) for at tjekke, at PCR-maskinen er korrekt programmeret.
- Ved PCR-maskiner, som ikke har et opvarmet låg, er det nødvendigt, at placere et låg af voks over PCR-reaktionerne i mikrocentrifugerørene for at forhindre fordampning. Se Appendix B for informationer.



## Forberedelser: Modul III

### TIL MODUL III

#### Reagenser delt af 2 elever:

- 12  $\mu$ l *HaeIII* Restriktionsenzym.
- 15  $\mu$ l Restriktions Enzym Reaktions Buffer.
- 20  $\mu$ l 10x Gel Loading opløsning

## MODUL III: KLIPNING AF PTC PRODUKTET

### Fortynding af *HaeIII* restriktionsenzym

1. Tilføj 150  $\mu$ l Restriktionsenzym Fortyndings Buffer (H) til røret med det koncentrerede *HaeIII* restriktionsenzym.
2. Bland røret i 30 sekunder (Vortex eller ved at knipse på bunden af røret) og placer det i is i 1 minut.
3. Fordel 12  $\mu$ l af *HaeIII* restriktionsenzym til 13 rør. Mærk rørene "*HaeIII*".
4. Anbring rørene i is til de skal bruges. Hvert rør deles af et elevpar.

### Fordel også følgende reagenser

1. Fordel 15  $\mu$ l Restriktions Enzym Reaktions Buffer (G) til hvert elevpar.
2. Fordel 20  $\mu$ l 10x Gel Loading opløsning til hvert elevpar.



## Forberedelser: Modul IV

### OBS:

Nøjagtig afpipettering er nødvendigt for at maksimere et succesfuldt forsøgsresultat.

EDVOTEKs 300 forsøgs-serie er designet til elever med et kendskab i brug af mikropipetter og agarose gel elektroforese.

Hvis eleverne er uøvede anbefales trænings-øvelser inden udførelsen af dette krævende forsøg.

### TIL MODUL IV

#### Hver elevgruppe skal have:

- 50x Koncentreret buffer.
- Demineraliseret vand
- UltraSpec-Agarose™
- Rør med 100 bp DNA-stige (65 µl per 2 geler. Hver gel deles af 4-5 elever).

### ADSKILLELSE AF PCR PRODUKT OG KLIPPET PRODUKT MED AGAROSE GEL ELEKTROFORESE

Dette forsøg kræver to 2,0% agarose geler per elevgruppe. Hver gruppe på 4-5 elever deler én 7 x 7 cm og én 7 x 14 cm gel.

- En 7 x 7 cm gel anbefales til adskillelse af uklippet PCR produkt
- En 7 x 14 cm gel anbefales til adskillelse af det *HaeIII* klippede PCR produkt.

Man kan vælge, at støbe gelerne på forhånd eller lade eleverne lave deres egen. Beregn ca. 30-40 minutter til denne procedure.

#### Individuel gel fremstilling:

Hver elevgruppe kan være ansvarlige for at støbe deres individuelle geler inden udførelse af forsøget. Se Modul III i elevdelen. Til dette skal eleverne bruge: 50x koncentreret buffer, demineraliseret vand og agarosepulver.

#### Fælles gel fremstilling:

For at spare tid kan man lave en større mængde, som deles af klassen. Se Appendix C.

#### Fremstilling af geler i forvejen:

Geler kan laves på forhånd og gemmes til senere. Størknede geler opbevares i buffer i køleskab i op til 2 uger.

Frys ikke geler, idet det vil ødelægge dem.

Geler, som pga. opbevaring er blevet flyttet fra støbekaret, bør fæstnes til støbekaret igen med et par dråber smeltet agarose inden de placeres i karet. Dette vil forhindre at gelerne i at glide rundt i karet og apparat.

#### Yderligere materialer:

- Hver sæt af to 2,0% geler bør påsættes 100 basepar stigen og prøver fra 4-5 elever. Kontrol PCR reaktion kan også påsættes en af brøndene.
- Fordel 65 µl af 100 basepar stigen (C) i mærkede mikrocentrifugerør
- Uddel et rør med stigen per to 2,0% agarose geler, der deles af 4-5 elever, som beskrevet ovenfor.



## Forberedelser: Modul V

### TIL MODUL V

Hver elevgruppe skal have:

- 1 stk. InstaStain® per 7 x 7 cm gel.
- 2 stk. InstaStain® per 7 x 14 cm gel.



Preferred Method

### FARVNING MED INSTASTAIN® ETHIDIUM BROMID

Instastain® Ethidium Bromid giver følsomheden af ethidium bromid, men minimerer affaldsvæsken, når gelen affarves. En agarose gel farvet med Instastain® Ethidium Bromid er klar til visualisation på så lidt såm 3 minutter! Hvert Instastain® kort farver 49 cm<sup>2</sup> gel (7 x 7 cm). Man skal bruge 2 kort for at farve en 7 x 14 gel.

Brug en midt-område ultraviolettransilluminator for at visualisere geler farvet med Instastain® Ethidium Bromid. **SØRG FOR AT DER ER UV-BESKYTTELSE (EVT. UV-BRILLER)!**

- Standard DNA markører skulle være synlige efter farvning, selv hvis andre DNA prøver er svage eller manglende. Hvis båndene fremstår svage, så gentag farvningen med et nyt Instastain® kort i yderligere 3-5 minutter. Hvis markørerne ikke er synlige: se efter problemløsninger under elektroforesen.
- Ethidium bromid er klassificeret som mutagent. Brug handsker og briller, når dette stof bruges.
- Instastain® Ethidium Bromid kort og farvede geler bortskaffes efter gældende regler for kemisk affald.

### FARVNING MED FLASHBLUE™

Flashblue™ kan i dette forsøg bruges som et alternativ til ethidium bromid, men Flashblue™ er mindre følsomt end Instastain® Ethidium Bromid, og det tager længere tid at få et resultat.

Flashblue™ farve er optimeret til at forkorte den behøvede tid til farvning og affarvning. Agarose geler kan farves med fortyndet Flashblue™ i 5 minutter og affarves på kun 20 minutter. Det bedste resultat fås ved at lade gelen stå i væsken natten over. Dette tillader den farvede gel at komme i ligevægt med affarvningsvæsken, og giver mørkeblå DNA-bånd på en ensartet lyseblå baggrund. Et lysbord anbefales til tydeliggørelse af geler farvet med Flashblue™.

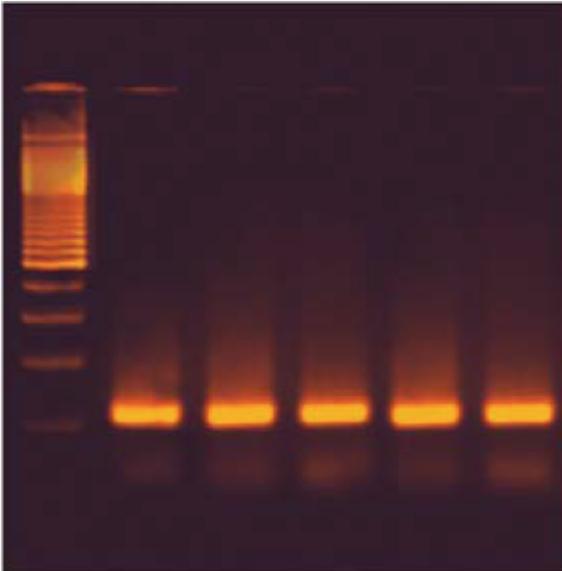
- Farvede geler kan opbevares i affarvningsvæske i flere uger i køleskab, selv båndene bliver svagere med tiden. Hvis dette sker: genfarv gelen.
- Affarvede geler kan bortskaffes som almindeligt affald. Affarvningsvæske kan hældes i vasken.

### FOTOGRAFERING AF RESULT (NØDVENDIG)

Når gelerne er farvet kan resultatet fotograferes. Der er mange forskellige fotosystemer tilgængelige, inklusiv digitale systemer koblet direkte til computere. Specifik vejledning afhænger af det brugte system.



## Forsøgsresultater og analyse

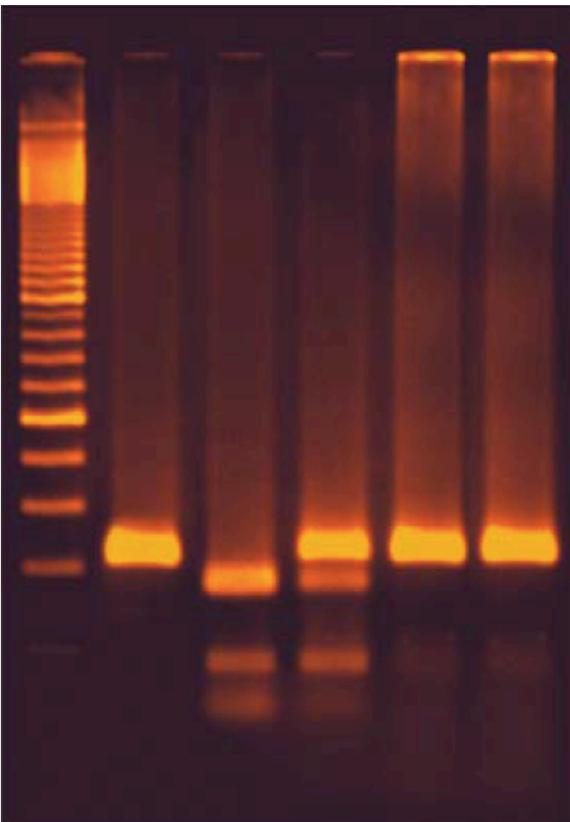


**Gel 1 – PCR reaktion for PTC genet**

**Bane**

1. 100 bp stige
2. Uklippet PCR produkt – Kontrol
3. Uklippet PCR produkt – Elev 1
4. Uklippet PCR produkt – Elev 2
5. Uklippet PCR produkt – Elev 3
6. Uklippet PCR produkt – Elev 4

Resultater af PCR produktet af den opformerede PTC region viser, at uden brug af restriktionsenzym vil DNA fra alle de undersøgte have identiske bånd, idet der ikke observeres nogen forskel i fragmenternes længde.



**Gel 2: RFLP analyse af PTC polyforfisme**

**Bane**

1. 100 bp stige
2. *HaeIII* klippet PCR produkt – Kontrol
3. *HaeIII* klippet PCR produkt – Elev 1
4. *HaeIII* klippet PCR produkt – Elev 2
5. *HaeIII* klippet PCR produkt – Elev 3
6. *HaeIII* klippet PCR produkt – Elev 4

- *HaeIII* klippet PCR produkt – Elev 1 viser, at elev 1 er en TT homozygot smager, idet *HaeIII* restriktionsenzymet klipper sekvensen, således at der er to bånd (et klart ved 177 bp og et svagere ved 44 bp).
- *HaeIII* klippet PCR produkt – Elev 2 viser, at denne elev er en Tt heterozygot smager: 3 bånd (ved 221 bp, 177 bp og 44 bp). Dette er fordi halvdelen af smagerens DNA har smager-allelen (som klippes) og den anden halvdel har ikke-smager-allelen (som ikke klippes).
- *HaeIII* klippet PCR produkt – Elev 3 og 4 viser, at de er ikke-smagere, fordi *HaeIII* restriktionsenzymet ikke kan klippe ikke-smager sekvensen. PCR produktet vil derfor forblive intakt med ét bånd ved 221 bp.

**Til besvarelse af  
studiespørgsmålene: se kittets  
indlægssedler**

## Appendices

- A EDVOTEK® Troubleshooting Guide
- B Preparation and Handling of PCR Samples With Wax
- C Bulk Preparation of Agarose Gels

Material Safety Data Sheets:

Now available for your convenient download on [www.edvotek.com](http://www.edvotek.com).

EDVO-TECH Service

**1.800.EDVOTEK**

(1.800.330.6035)



**Please Have the Following Info:**

- Experiment number and title
- Kit lot number on box or tube
- Literature version (in lower right corner)
- Approx. purchase date

Mon-Fri  
8am-5:30pm ET

FAX 202.370.1501 • [info@edvotek.com](mailto:info@edvotek.com) • [www.edvotek.com](http://www.edvotek.com)

Visit Us Online!

**[www.edvotek.com](http://www.edvotek.com)**

**Download**  
Edvotek kits  
with  
Protocols!

**Browse**  
our online  
catalog!

**Order**  
**Products**  
online!

**Receive**  
Technical  
Support!

EDVOTEK - The Biotechnology Education Company®  
1-800-EDVOTEK • [www.edvotek.com](http://www.edvotek.com)  
FAX: 202-370-1501 • email: [info@edvotek.com](mailto:info@edvotek.com)



345.130821

## EDVOTEK® Troubleshooting Guides

## DNA EXTRACTION

PROBLEM:	CAUSE:	ANSWER:
There is no cell pellet after centrifuging the cheek cell suspension.	Not enough cheek cells in suspension	Mouth must be vigorously rinsed for at least 60 sec to harvest loose cheek cells.
	Sample not centrifuged fast enough	Spin cells at maximum speed (17,000 x g) for 2 min. If your centrifuge does not reach this speed, spin at highest available speed for 4 min.
Poor DNA Extraction	Samples not mixed well enough during extraction	In addition to flicking the tube, vortex or pipet up and down to mix the sample.
	Proteinase K inactive because it was prepared too far in advance.	Prepare Proteinase K within one hour of use.
	Water baths not at proper temperature	Use a thermometer to confirm water bath set point.
	Not enough DNA	Try cheek cell extraction. Final DNA concentrations are usually higher.
The extracted DNA is very cloudy.	Cellular debris from pellet transferred to tube	Centrifuge sample again and move supernatant to a fresh tube. Take care to avoid pellet.
	Cellular debris not separated from supernatant	Centrifuge sample again. If possible, centrifuge at a higher speed. Move cleared supernatant to a fresh tube.

## RESTRICTION ENZYME DIGESTION

PROBLEM:	CAUSE:	ANSWER:
Undigested or incompletely digested DNA	Impure DNA – some contaminants (EDTA, salts) might partially or completely inhibit activity of <i>Hae</i> III restriction enzyme	Poor DNA extraction. Extract new DNA. Cheek cell extraction usually results in higher DNA yield.
	Improper dilution of enzyme	Ensure that <i>Hae</i> III restriction enzyme was correctly diluted.
	Improper addition of enzyme	Ensure that correct amount of <i>Hae</i> III restriction enzyme was added to the restriction digest.
	Incorrect incubation temperature	Use a thermometer to confirm water bath temperature and adjust, if necessary.
Unexpected Cleavage Pattern	DNA sample is contaminated	Prepare a new DNA sample.
Smearing of digested DNA on gel	Nuclease contamination	Care should be taken to avoid cross contamination when setting up reactions.
	Agarose running conditions	Use fresh electrophoresis buffer and appropriate voltage.

## EDVOTEK® Troubleshooting Guides

## PCR AND ELECTROPHORESIS

PROBLEM:	CAUSE:	ANSWER:
There is very little liquid left in tube after PCR	Sample has evaporated	<p>Make sure the heated lid reaches the appropriate temperature.</p> <p>If your thermal cycler does not have a heated lid, overlay the PCR reaction with wax (see Appendix B for details)</p> <p>Make sure students close the lid of the PCR tube properly.</p>
	Pipetting error	Make sure students pipet 20 $\mu$ L primer mix and 5 $\mu$ L extracted DNA into the 0.2 mL tube.
The ladder, control DNA, and student PCR products are not visible on the gel.	The gel was not prepared properly.	<p>Ensure that the electrophoresis buffer was correctly diluted.</p> <p>Gels of higher concentration (&gt; 0.8%) require special attention when melting the agarose. Make sure that the solution is completely clear of "clumps" and glassy granules before pouring gels.</p>
	The gel was not stained properly.	Repeat staining.
	Malfunctioning electrophoresis unit or power source.	Contact the manufacturer of the electrophoresis unit or power source.
After staining the gel, the DNA bands are faint.	The gel was not stained for a sufficient period of time.	Repeat staining protocol.
After staining, the ladder is visible but no PCR products are present.	PCR amplification was unsuccessful.	Repeat PCR with fresh PCR EdvoBeads™ and primers.
		Ensure that the thermal cycler has been properly programmed. See Module II for guidelines
After staining, the ladder and control PCR products are visible on gel, but some student samples are not present.	Student DNA sample was not concentrated enough.	Poor DNA extraction. Extract new DNA. Cheek cell extraction usually results in higher DNA yield.
	Student DNA sample was degraded	If DNA is not used immediately following extraction, store sample at -20°C.
	Wrong volumes of DNA and primer added to PCR reaction	Practice using pipettes
Some students have more or less amplification than others.	Concentration of DNA varies by sample.	There is an inherent variability in the extraction process. For best results, use cheek cell extraction.
Low molecular weight band in PCR samples	Primer dimer	Low concentration of extracted DNA in PCR reaction.
DNA bands were not resolved.	Tracking dye should migrate at least 3.5 cm (if using a 7x7 cm tray), and at least 6 cm (if using a 7x14 cm tray) from the wells to ensure adequate separation.	Be sure to run the gel at least 6 cm before staining and visualizing the DNA (approximately one hour at 125 V).
DNA bands fade when gels are kept at 4°C.	DNA stained with FlashBlue™ may fade with time	Re-stain the gel with FlashBlue™

### Preparation and Handling of PCR Samples With Wax

ONLY For Thermal Cyclers WITHOUT Heated Lids, or Manual PCR Using Three Waterbaths

Using a wax overlay on reaction components prevents evaporation during the PCR process.

#### HOW TO PREPARE A WAX OVERLAY

1. Add PCR components to the 0.2 ml PCR Tube as outlined in Module III.
2. Centrifuge at full speed for five seconds to collect sample at bottom of the tube.
3. Using clean forceps, add one wax bead to the PCR tube.
4. Place samples in PCR machine and proceed with Module III.

#### PREPARING PCR SAMPLES FOR ELECTROPHORESIS

1. After PCR is completed, melt the wax overlay by heating the sample at 94° C for three minutes or until the wax melts.
2. Using a clean pipet, remove as much overlay wax as possible.
3. Allow the remaining wax to solidify.
4. Use a pipet tip to puncture the thin layer of remaining wax. Using a fresh pipet tip, remove the PCR product and transfer to a new tube.
5. Add 5  $\mu$ L of 10x Gel Loading Buffer to the sample. Proceed to Module IV to perform electrophoresis.

## Bulk Preparation of Agarose Gels

To save time, electrophoresis buffer and agarose gel solution can be prepared in larger quantities for sharing by the class. Unused diluted buffer can be used at a later time and solidified agarose gel can be remelted.

## BULK ELECTROPHORESIS BUFFER

Bulk preparation of 1X electrophoresis buffer is outlined in Table D.

Table  
D

Bulk Preparation of Electrophoresis Buffer

50x Conc. Buffer	+	Distilled Water	Total Volume Required
60 ml		2,940 ml	3000 ml (3 L)

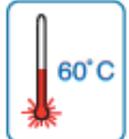
## BATCH AGAROSE GELS (2.0%)

Bulk preparation of 2.0% agarose gel is outlined in Table E.

1. Use a 500 ml flask to prepare the diluted gel buffer.
2. Pour the appropriate amount of UltraSpec-Agarose™ into the prepared buffer. Swirl to disperse clumps.
3. With a marking pen, indicate the level of solution volume on the outside of the flask.
4. Heat the agarose solution as outlined previously for individual gel preparation. The heating time will require adjustment due to the larger total volume of gel buffer solution.
5. Cool the agarose solution to 60°C with swirling to promote even dissipation of heat. If evaporation has occurred, add distilled water to bring the solution up to the original volume as marked on the flask in step 3.
6. Dispense the required volume of cooled agarose solution for casting each gel. The volume required is dependent upon the size of the gel bed.
7. Allow the gel to completely solidify. It will become firm and cool to the touch after approximately 20 minutes. Proceed with electrophoresis (Module IV) or store the gels at 4°C under buffer.

**Note:**

The UltraSpec-Agarose™ kit component is usually labeled with the amount it contains. Please read the label carefully. If the amount of agarose is not specified or if the bottle's plastic seal has been broken, weigh the agarose to ensure you are using the correct amount.

Table  
EBatch Prep of 2.0%  
UltraSpec-Agarose™

Amt of Agarose	+	Diluted Buffer (1x)
8.0 g		400 ml