

Øvelsesvejledning

Del 1: Genetisk test for forøget diabetesrisiko

Materialer

- Mus med/uden diabetes
- Kanyle
- Eppendorfrør
- Lysisbuffer
- Saltvand
- PCR-rør
- HNF1A primer
- Blå farve (bromfenolblåt)
- Gel
- PCR-mix (nukleotider og Taq-polymerase)
- DNA molekylvægtsmarkør

Supernatant: Efter centrifugering vil der i røret ofte findes to dele. Supernatanten er det flydende væske, mens pellet er det faste materiale der har lagt sig på bunden af røret.

Cellelysis betyder at cellens membran sprænger, for eksempel resultat af osmotisk tryk, og cellen derfor dør

Metode

- Udtag en blodprøve fra musen med kanyle.
- Overfør 4 ml blod til et eppendorfrør og centrifuger i 2 min ved 10.000 g.
 - Husk at afbalancere centrifugen med et modrør.
- Fjern det hvide lag (buffy coat) med de hvide blodlegemer og overfør til et nyt eppendorfrør.
- Opvarm røret til 60 °C i varmeblok.
- Tilsæt 200 µl lysisbuffer og derefter 500 µl saltvand → cellerne lyses.
- Centrifuger igen ved 10.000 g i 2 min for at adskille DNA fra cellerester.
- Overfør 10 µl supernatant (indeholder DNA) til et nyt PCR-rør og sæt på is.
- Tilsæt:
 - 80 µl PCR-mix (med Taq-polymerase og nukleotider)
 - 5 µl HNF1A-primer

PCR-program:

1. Cellelysis: 95 °C, 5 min
2. Denaturering: 95 °C, 1 min
3. Annealing: 50 °C, 1 min
4. Elongering: 70 °C, 3 min
 - a. Kør 30 cyklusser af trin 2–4.

Gelelektroforese:

- Tilsæt blå farve til prøven og bland forsigtigt.
- Påsæt gel i maskinen.
 - Brønd 1: 15 µl DNA-markør
 - Brønd 2: 15 µl farvet prøve
 - Brug handsker – gelen indeholder ethidiumbromid (kræftfremkaldende).
- Kør ved 110 V i 30 min.
- Undersøg gelen under UV-lys.