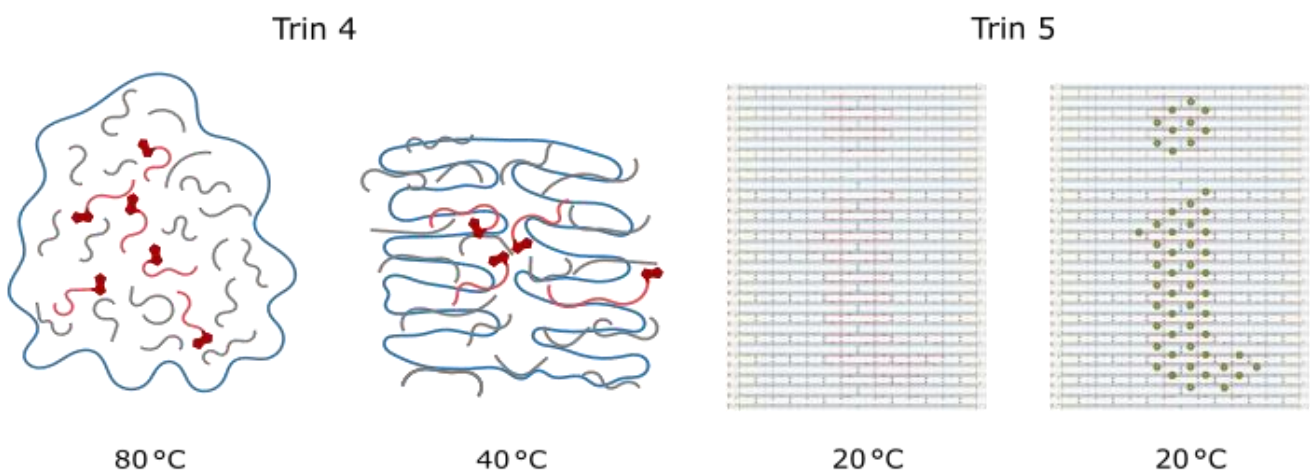
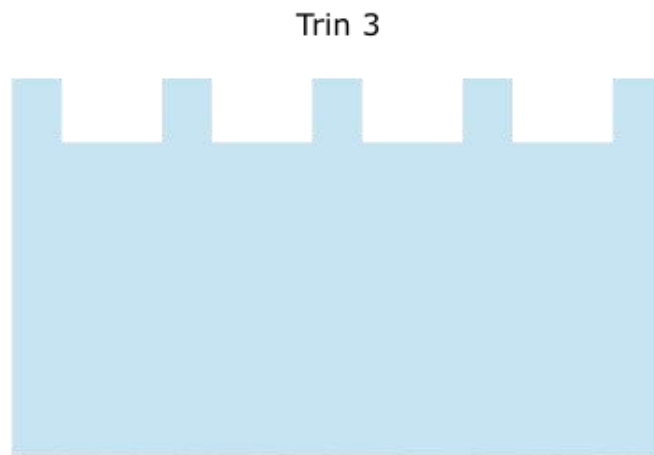
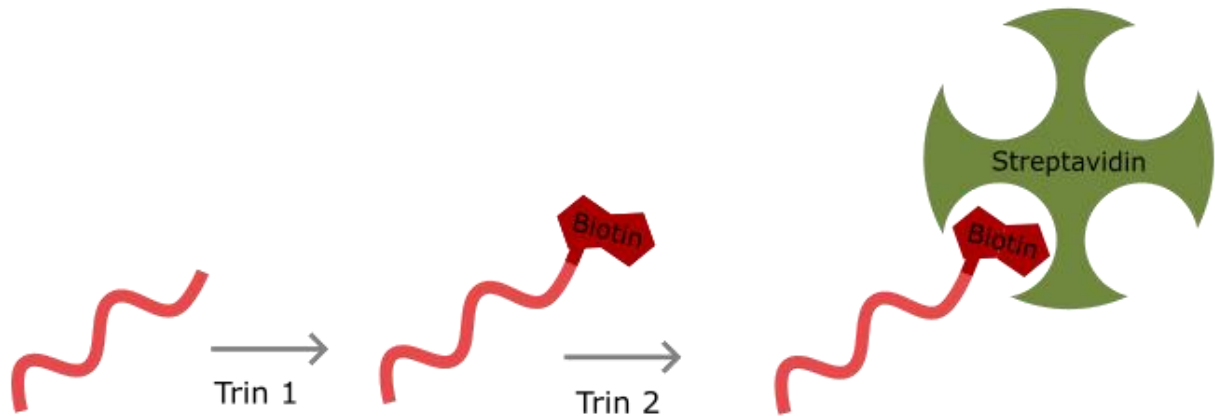


# DNA-origami øvelsesprotokol

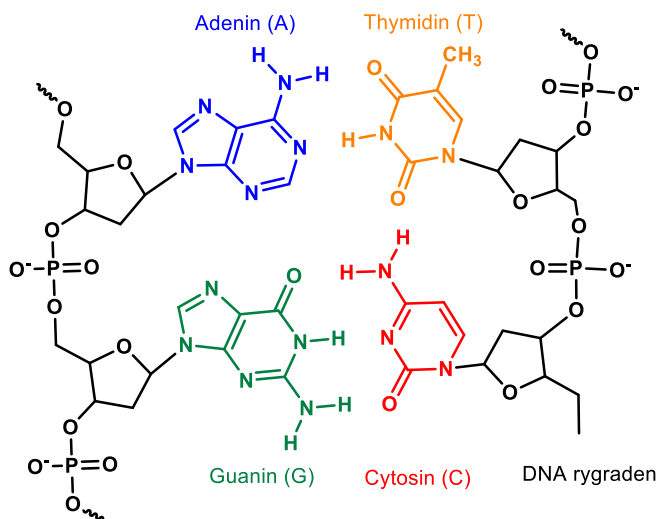


## Indholdsfortegnelse

|  |   |
|--|---|
| <b>Introduktion</b> .....  | 2 |
| <b>Protokol Del 1</b> .....  | 4 |
| <b>1. Trin: Biotin-modificering af bogstavshæfteklammer</b> .....                    | 4 |
| <b>2. Trin: Bind streptavidin til biotin-modificerede bogstavshæfteklammer</b> ..... | 4 |
| <b>3. Trin: Analyse af hæfteklammer på en gel</b> .....                              | 5 |
| <b>Protokol Del 2</b> .....  | 6 |
| <b>4. Trin: Selvsamling af DNA nanotavler</b> .....                                  | 6 |
| <b>5. Trin: Oprensning, klargøring og billeder af nanotavler</b> .....               | 6 |

## Introduktion

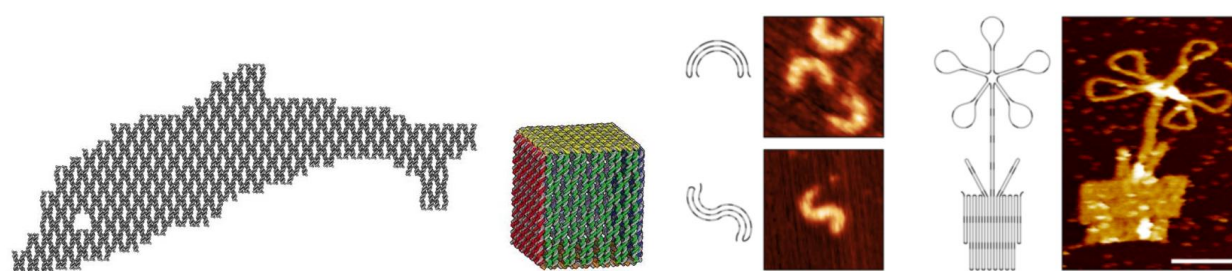
De fleste tænker på DNA som molekyler, der indeholder vores genetiske information. DNA er opbygget af fire forskellige nukleotider. Forskellen mellem de fire nukleotider er, at de indeholder fire forskellige baser (Figur 1). Baserne hedder adenin (A), thymidin (T), cytosin (C) og guanin (G). Adenin og thymidin binder til hinanden og ligeledes binder cytosin og guanin til hinanden. Disse baseparinger er årsagen, til at DNA-molekylerne i vores celler er dobbeltstrengt.



Figur 1: Viser et kort udsnit af to DNA-streng, som binder til hinanden. En DNA-streng består af en DNA-rygrad (sort), hvorpå der er påsat baser. Baserne er farvet blå (adenin), gul (Thymidin), grøn (guanin) eller rød (cytosin) på figuren.

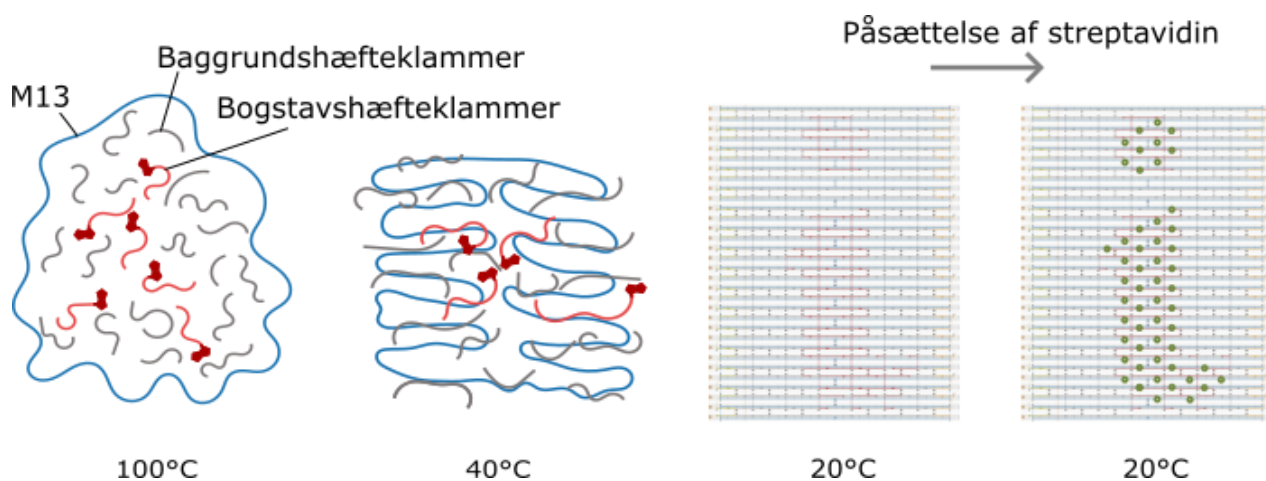
Denne viden kan bruges til at lave forskellige strukturer med DNA. Et computerprogram bruges til at designe DNA-streng, som binder til hinanden, så man opnår den ønskede struktur. Origami er en japansk papirfoldningsteknik, hvor man folder forskellige figurer ud af et enkelt stykke papir. Metoden hvor på man folder DNA-streng til en ønsket figur kaldes DNA-origami (Figur 2).

I denne øvelse bruger vi DNA-origami teknikken til at samle en tavle af DNA med dimensioner 70 nm x 100 nm (nanometer, som er  $10^{-9}$  meter). En nanotavle består af en lang DNA-streng på ca. 7000 nukleotider (M13) og mange korte DNA-streng kaldet hæfteklammer (Figur 3). Der bruges ca. 200 DNA-hæfteklammer til nanotavlen, hvoraf hovedparten er 32 nukleotider lange. De korte DNA-streng binder specifikt til forskellige steder på den lange DNA-streng og hæfter den lange streng sammen til den ønskede struktur. Når en blanding af den lange og de korte DNA-streng opvarmes til 80 grader og derefter afkøles, vil milliarder af nanotavler foldes i opløsningen (Figur 3). Denne proces kaldes selvsamling og sker pga. den stabiliserende effekt af baseparringerne mellem DNA-hæfteklammerne og den lange DNA-streng (Figur 1). Med DNA-origami teknikken er det muligt at lave adskillige strukturer blot ved at ændre sekvensen af hæfteklammerne (se eksempler i Figur 2).



Figur 2 Illustrationer af forskellige publicerede DNA-origami strukturer fra Aarhus Universitet.

For at kunne se nanotavlerne, bruges et Atomart Kraft Mikroskop (AFM). Der skrives på nanotavlerne med streptavidin, som er et protein. Streptavidin binder meget stærkt til biotin, som er et molekyle. Biotin-molekyler kan sættes på den ene ende af DNA-hæfteklammerne ved at bruge enzymet Terminal Transferase. Da vi ved, hvilke DNA-hæfteklammer der binder hvor i nanotavlen, kan vi specifikt påsætte biotin på udvalgte DNA-hæfteklammer (bogstavshæfteklammer), sådan at der skrives et bogstav når tavlen er samlet.

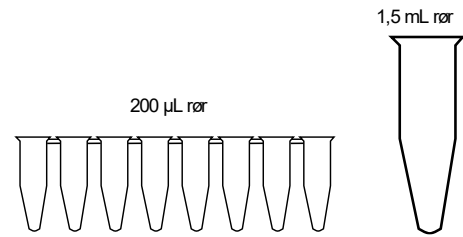


Figur 3: M13-strengen er blå, baggrundshæfteklammerne er grå og bogstavshæfteklammerne er røde. Selvsamlingsprocessen sker ved langsom afkøling af DNA-strengene. Ved ca. 80 °C er DNA strengene adskilte. Ved 40°C dannes de stærkeste baseparring. Ved 20 °C har alle hæfteklammerne bundet. Når tavlen er samlet, tilsættes proteinet streptavidin så bogstavet kan aflæses med AFM.

## Protokol Del 1

### 1. Trin: Biotin-modificering af bogstavshæfteklammer

- Bland følgende i ét 200  $\mu$ L rør:
    - 8  $\mu$ l TdT buffer (5x TdT Reaktion buffer)
    - 8  $\mu$ l  $\text{CoCl}_2$  25 mM
    - 16  $\mu$ l Biotin-dUTP 40  $\mu$ M
    - 6  $\mu$ l Hæfteklammer 20  $\mu$ M (i, N, A eller O)
    - 2  $\mu$ l Terminal transferase (fås af instruktoren når resten er blandet)
- Slut volumen: 40  $\mu$ L



- Skriv "B" på røret samt gruppenummer og giv det til instruktoren.

Instruktoren sætter røret i en inkubator først 37 °C i 35 min derefter 80 °C i 10 min.

- Tilsæt 38  $\mu$ l  $\text{H}_2\text{O}$  til de 2  $\mu$ L som er tilbage i jeres 200  $\mu$ L rør med hæfteklammer "i", "N", "A" eller "O" og gem røret til senere. **Dette er prøve 1.**
- Tag et 200  $\mu$ L rør og skriv "P2" på røret
- Fra rør "B", som I får tilbage fra instruktoren, tager I 2  $\mu$ L og tilsætter til "P2"-røret
- Tilsæt 4  $\mu$ L  $\text{H}_2\text{O}$ . **Dette er prøve 2.**

### 2. Trin: Bind streptavidin til biotin-modificerede bogstavshæfteklammer

- Skriv "BS" på et 200  $\mu$ L rør og bland følgende i røret
    - 3  $\mu$ l Hæfteklamme med biotin på (rør "B" som I har fået tilbage fra instruktoren)
    - 3  $\mu$ l Streptavidin (udleveres af instruktoren)
- Slut volumen: 6  $\mu$ L

- Smølfespark røret og brug en lille centrifuge til at få blanding ned i bunden af røret
- Lad prøven stå 5 min på jeres bord.
- Tag et 200  $\mu$ L rør og skriv "P3" på røret
- Overfør 4  $\mu$ L fra "BS"-røret som har inkuberet 5 min
- Tilsæt desuden 2  $\mu$ L  $\text{H}_2\text{O}$ . **Dette er prøve 3**



### 3. Trin: Analyse af hæfteklammer på en gel

- Klargør 3 tomme 200  $\mu$ L rør ved at skrive 1, 2, og 3 på dem
- Skift til grønne handsker

Tilsæt 10  $\mu$ l orange LB (Loading Buffer) til hvert af rørene

Til rør 1 tilsættes 2  $\mu$ L prøve 1

Til rør 2 tilsættes 2  $\mu$ L prøve 2

Til rør 3 tilsættes 2  $\mu$ L prøve 3

- Load prøverne i hver sin brønd (Udføres med instruktoren).
- Gelen køres ved 20 Watt i 45 min, efter at alle grupper har loadet deres prøver.
- Når gelen er kørt færdig farver instruktoren gelen og scanner den.





## Protokol Del 2

### 4. Trin: Selvsamling af DNA nanotavler

Nanotavlerne samles nu ved at blande jeres biotin-mærkede DNA-hæfteklammer med baggrunds-hæfteklammerne og den lange M13 streng.

- Bland følgende i ét 200  $\mu$ L rør:
  - 16  $\mu$ l Biotin-hæfteklammer 50 nM (Rør "B" fra trin 1)
  - 8  $\mu$ l Baggrund hæfteklammer ("Bg") 100 nM
  - 2  $\mu$ l M13 DNA 100 nM
  - 8  $\mu$ l Tri-acetat-EDTA-magnesium (TAEM) (5x)
  - 6  $\mu$ l TE bufferSlut volumen: 40  $\mu$ L

- Skriv gruppenummer på røret og aflever til instruktoren

Nu sættes prøven i PCR-maskinen, hvor selvsamlingsreaktionen finder sted (dette trin udføres af instruktoren). Det sker ved at varme reaktionen op til 80 °C og så langsomt køle ned til 20 °C.

### 5. Trin: Oprensning, klargøring og billeder af nanotavler

**Resten af protokollen vil instruktoren lave for jer. Jeres lærer vil få billederne af jeres nanotavler tilsendt**

- De samlede tavler oprenses fra de resterende DNA-streng, som har været i overskud og ikke indgår i en DNA-tavle
- Herefter inkuberer nanotavlerne med streptavidin som giver skriften på tavlerne
- Til slut tages der billeder af nanotavlerne med en AFM-maskine