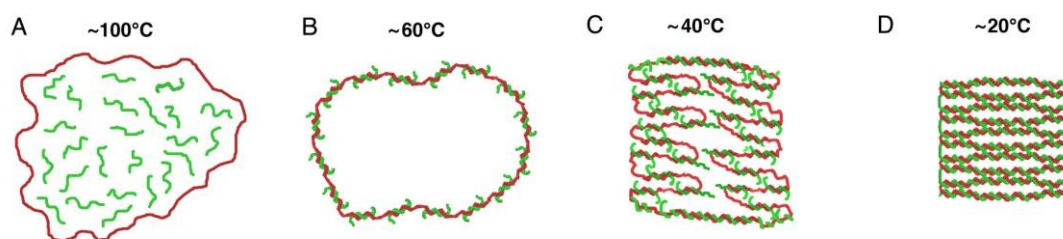


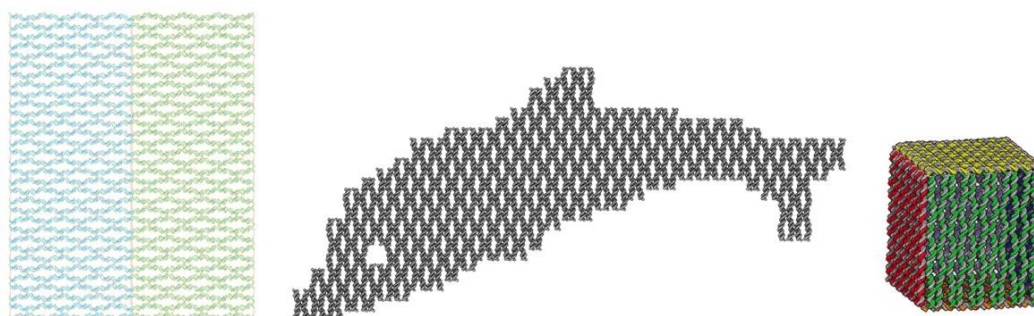
DNA origami øvelse

Introduktion

I denne øvelse bruger vi DNA origami teknikken til at samle en tavle af DNA med dimensioner på 70 nm x 100 nm. Tavlen dannes af et langt enkeltstrenget DNA molekyle, der vha. flere korte DNA strenge foldes i den ønskede struktur. Den lange DNA streng kommer fra en bakterievirus (M13) og er 7249 baser lang. Til at folde den lange DNA streng benyttes 222 korte syntetiserede DNA strenge, hvoraf hovedparten er 32 baser lange. De korte DNA strenge binder specifikt til forskellige steder på den lange DNA streng og kaldes hæfteklammer, fordi de holder strukturen sammen. Når en blanding af den lange og de korte DNA-strengene opvarmes til lige under kogepunktet og derefter sættes til afkøling, vil milliarder af nanotavler formes helt af sig selv i opløsningen. Denne proces kaldes selvsamling og sker pga. den stabiliserende effekt af baseparringen mellem komplementære DNA strenge (figur 1). Med DNA origami teknikken er det muligt at danne næsten vilkårlige strukturer blot ved at ændre sekvensen af hæfteklammerne (se eksempler i figur 2).

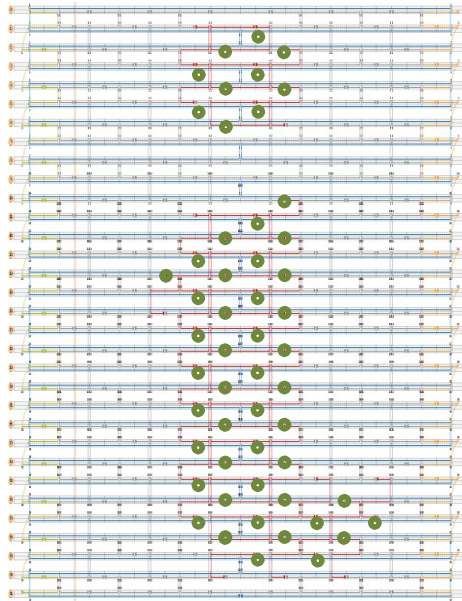


Figur 1. Selvsamlingsprocessen sker ved langsom afkøling af blandingen. (A) Ved ca. 100°C er DNA strengene adskilte. (B) Ved 60°C dannes de stærkeste baseparringene. (C) Ved 40°C dannes foldningen af strukturen. (D) Ved 20°C dannes alle baseparringerne. M13-strengen er rød og hæfteklammerne er grønne.



Figur 2. Forskellige DNA origami strukturer vi kan lave her i laboratoriet. (A) DNA tavle. (B) Delfin. (C) DNA boks.

En nanotavle er ikke meget værd, hvis ikke man kan skrive på den og aflæse skriften bagefter. I får derfor mulighed for at skrive på jeres nanotavler og visualisere dem bagefter med et Atomart Kraft Mikroskop (AFM). Vi skriver på tavlen med enzymet Terminal Transferase, der kan påføre ekstra nukleotider til 3'enden af DNA strenge. På nukleotiderne sidder biotin, et lille molekyle, der kan binde til proteinet Streptavidin, som vi kan se med AFM. Ved at påsætte biotin på bestemte hæfteklammer, der binder i et mønster i strukturen, kan vi således skrive bogstaver på nanotavlen. Hvert hold laver ét design hvor vi danner forskellige bogstav-mønstre: "i", "N", "A", "N" og "O". Se eksempelvis "i" nedenfor (Figur 3).



Figur 3. DNA tavle med lablede hæfteklammer, der danner et "i".

Oversigt over dagens øvelse:

1. Biotin-modificering af DNA hæfteklammer med enzymet Terminal Transferase.
2. Analyse af DNA hæfteklammer med denaturerende gel elektroforese.
3. Selvsamling af DNA nanotavler.
4. Oprensning af DNA nanotavler med S400 Spin-søjler.
5. Inkubering af DNA nanotavler med proteinet streptavidin.
6. AFM af DNA nanotavler.

Øvelsen illustrerer nogle af styrkerne ved DNA origami teknikken:

1. Parallel masseproduktion af designede nanostrukturer.
2. Relativ nem, hurtig og billig syntese.
3. Positionel kontrol af koblede molekyler på DNA origamien.

Vejledning

Hvert hold har fået udleveret to sæt DNA hæfteklammer. Det ene – i, N, A eller O - skal danne mønsteret og skal bruges i reaktionen, hvor biotin sættes på DNA hæfteklammerne. Det andet oligomix er ”baggrund”(bg) og skal *ikke* modificeres med biotin. Vi skal lave trin 1-3 i dag. Alle punkter markeret med • er det, I skal lave i laboratoriet – resten er informationer og regneopgaver.

Trin 1: Biotin-modificering af DNA hæfteklammer med enzymet Terminal Transferase

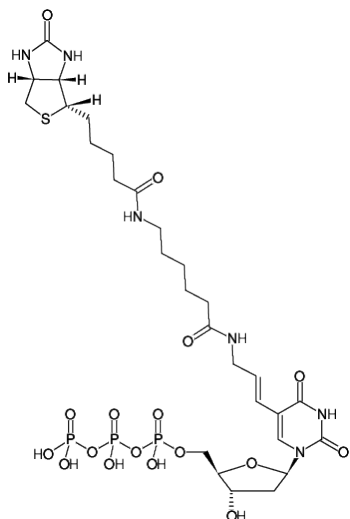
- Bland følgende i ét PCR rør:

Reaktion

8 µl 5x TdT Reaktion buffer (TdT buf)
 8 µl 25 mM CoCl₂
 16 µl 40 µM Biotin-dUTP (“Bio” - Figur 4)
 6 µl “i, N, A eller O” 20 µM hæfteklammer (let. i, N, A eller O)
2 µl Terminal transferase (fås hos instruktoren efter blanding af de andre ting)
 40 µl total

- Sæt et genkendeligt mærke på røret og giv det til instruktoren
- Den enzymatiske reaktion sættes ved 37°C i 35 minutter, og afsluttes ved 80°C i 10 min. af instruktoren.
- Når I har sat reaktionen i gang tilsættes 18 µl H₂O til den dråbe, der er tilbage i røret med “i, N, A eller O” hæfteklammer. Det er for at fortynde hæfteklammerne til senere brug.

Imens I venter på den enzymatiske reaktion, kan I forberede udregninger til gelelektroforese. I skal udregne, hvor stort et volumen I skal lade på gelen. Hop videre til Trin 2: *Analyse af DNA hæfteklammer med denaturerende gel elektroforese.*



Figur 4. Molekylestruktur for biotin-dUTP.

Trin 2: Analyse af DNA hæfteklammer med denaturerende gel elektroforese

Instruktoren har forberedt en gel til jer. Herunder kan I læse, hvordan den laves (markeret med *kursiv*):

I skal bruge to glasplader, tre plastik pinde, seks klemmer og én kam. Gelen støbes i stinkskalet med 10% polyacrylamid gel-blanding. Bemærk, at polyacrylamid er giftigt, så vær forsigtig og brug handsker! Overfør 35 ml af gel-blandingen til et bægerglas og tilsæt 280 µl 10% APS og 14 µl TEMED - dette får gel-blandingen til at polymerisere. Hæld gel-blandingen ned mellem glaspladerne. Sæt kammen i gelen, læg noget tungt på glaspladen og vent 20 minutter indtil gelen er polymeriseret.

Bufferkamre fyldes med 1X TBE buffer, gem lidt buffer til opfyldning til sidst. Når gelen er polymeriseret fjernes klemmerne og den nederste plastik pind. Med to store klemmer sættes gelen samt metalplade fast på elektroforese apparatet – undgå bobler – og det sidste buffer hældes i det øverste kammer, så gelen er dækket. Nu renses brøndene med buffer vha. en sprøjte og gelen sættes til at forvarme ved 20W. Gelen skal forvarme i ca. 15 min.

Imens gelen forvarmer, kan vi forberede vores prøver, som skal loades på gelen. Først skal vi blande reagenserne til prøve 3 (se næste punkt):

For at inkubere de biotin-modificerede hæfteklammer med streptavidin (til prøve 3), skal I først blande følgende i et tomt PCR rør:

- 3µL biotin-modificerede hæfteklammer (fra den enzymatiske reaktion)
- 3µL streptavidin (fås hos instruktoren)
- Inkuber 5 min ved stuetemperatur på din labbænk

Mens vi venter, skal vi udregne (næste side), hvor meget DNA vi skal loades på gelen for hver prøve.

Vi skal kigge på tre forskellige prøver (beskrevet nedenfor). Til hver prøve skal tilsættes 2 pmol DNA strenge, men koncentrationerne er forskellige, og derfor skal vi bruge forskellige volumener. I skal selv regne ud, hvor stort et volumen, det svarer til for de enkelte opløsninger (en god formel at huske er $n=c*V$):

Prøve 1: DNA hæfteklammer $2 \mu M$. (Findes i røret ”i”, ”N”, ”A”, eller ”O”. Det rør som I fortyndede med vand.)

Vol (μL): ____

Prøve 2: Biotin-modificerede hæfteklammer på $3 \mu M$. (Fra den enzymatiske reaktion, som I får tilbage fra instruktoren)

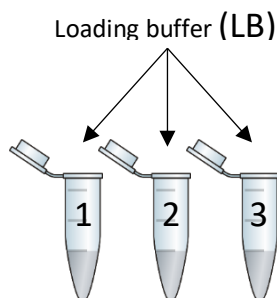
Vol (μL): ____

Prøve 3: Biotin-modificerede hæfteklammer, inkuberet med Streptavidin på $1,5 \mu M$

Vol (μL): ____

Nu kan vi forberede alle vores prøver:

- Tilsæt 10 μl Loading Buffer (LB) til 3 tomme PCR rør.
- Skriv 1, 2 og 3 på de respektive rør.
- Herefter tilsættes de udregnede volumener til de tre rør med loading buffer:



Rør 1: DNA-hæfteklammer (let. "i", "N", "A", eller "O"), som I har fortyndet med vand.

Rør 2: Biotin-modificeret hæfteklammer (fra den enzymatiske reaktion, som I får tilbage af instruktoren)

Rør 3: Biotin-modificeret hæfteklammer inkuberet med streptavidin

Når gelen er varm, kan I load jeres prøver:

- Rens brøndene med sprøjten og load 10 μl af jeres prøver – spørg instruktoren om hjælp.
- Polyacrylamid gelen køres ved 20W i 45 min, når alle grupper har loadet deres prøver.

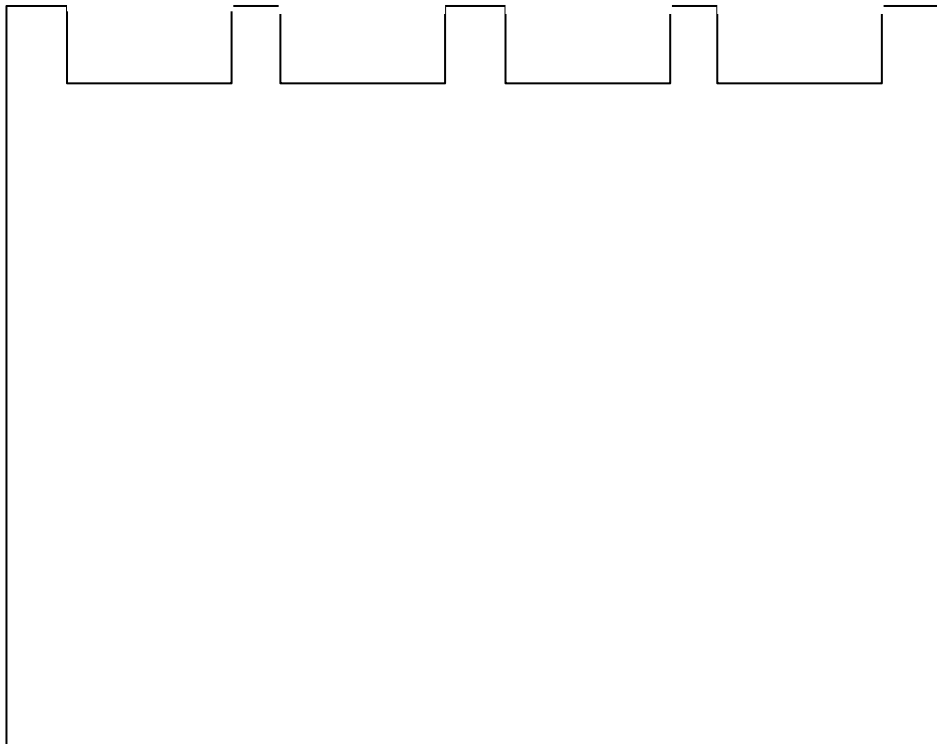
I de 45 min kan I svare på spørgsmål på den sidste side i protokollen.

Når de 45min er gået, skal gelen ”farves”, så vi kan se DNA’et i scanneren. Dette udføres af instruktoren, men I kan læse herunder hvordan det foregår (med *kursiv*):

Forbered en bakke med vand tilsat 10 μl SYBRgold. Gelen skal overføres til vandbadet, der rystes i 10 minutter. Gelen overføres nu til en glasplade og bringes til Typhoon scanneren, der kan tage et billede af den.

Herefter går vi samlet op til scanneren og kigger på vores resultater.

I kan tegne jeres DNA bånd ind på figur 5. Forklar hvad I ser, og hvad I kan konkludere af dette resultat:



Figur 5. Her kan I indtegne resultaterne fra jeres polyacrylamid gel. Angiv hvad de forskellige bånd repræsenterer.

Fordi vi kun har 3 timer til øvelsen i dag, vil instruktoren gennemgå, hvad vi ville have gjort hvis vi skulle fortsætte, og vise eksempler på billeder af DNA nanotavler fra tidligere øvelser. Vi vil nu fokusere på at regne opgaverne på side 9. I kan læse resten af øvelsesvejledningen.

Trin 3: Selvsamling af DNA nanotavler

Nu blandes jeres biotin-mærkede DNA hæfteklammer med baggrunds-hæfteklammerne og den lange M13 streng, så nanotavlerne kan dannes. I skal selv regne ud, hvor meget i skal blande af hver opløsning.

De nødvendige oplysninger I skal bruge er:

1. Total volumen i reaktionen er 40 μ l
2. Der skal bruges 4 gange så mange hæfteklammer (af begge slags) som M13 DNA

- Bland de udregnede volumener af de 4 opløsninger
- Sæt et genkendeligt mærke på røret og aflever til instruktoren

Selvsamlingsreaktion	Start conc.	Slut conc.	Volumen (μL)
Biotin-hæfteklammer (dem I har lavet)	50 nM		
Tri-acetate-EDTA-magnesium (TAEM)	5x	1x	
Baggrund hæfteklammer ("Bg")	100 nM		
M13 DNA			
Slut volumen			<u>40 μL</u>

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

Trin 4: Oprensning af DNA nanotavler.

Til oprensning af DNA nanotavler bruger vi S-400 Spin-søjler. Først skal søjlen forberedes til brug:

- Skru låget halvt op, knæk den nederste tap af og sæt et lille mærke på siden af søjlen.
- Sæt nu søjlen med rør i centrifugen og sørg for, at det lille mærke du satte peger udad.
- Kør centrifugen i 1 minut ved 3.200 rpm.
- Smid væsken ud, der er løbet ned i røret, tilsæt forsigtigt 500 μl 1XTAEM til søjlen
- Slå bunden let mod bordet et par gange og centrifuger igen 1minut ved 3.200 rpm med mærket udad.
 - Gentag disse trin 3 gange.

Efter klargøring af søjlerne tilsættes en blanding af jeres DNA nanotavler, så der kan skrives "iNANO":

- Tilsæt det i midten af søjlen uden at røre den.
- Overfør søjlen til et rent Eppendorf rør og centrifuger i 2 min ved 2.800rpm. I Eppendorf røret har I nu de oprensede nanotavler.
- Overfør halvdelen af indholdet til et andet Eppendorf rør, så I nu har 2 rør med halvdelen af de oprensede nanotavler i hvert.

Trin 5: Inkubering af DNA nanotavler med proteinet Streptavidin

For at vi kan læse hvad, der står på vores DNA nano-tavler, tilsætter vi proteinet streptavidin til prøverne – det svarer lidt til at fremkalde et billede.

- Til det ene rør med nanotavler tilsættes nu 3 µl 20 µM Streptavidin.

Nu har vi to prøver med DNA nanotavler, en med bogstaver vi kan læse (med streptavidin) og en vi ikke kan læse (uden streptavidin). Vi tager prøverne med til AFM for at læse tavlerne.

Trin 6: AFM af DNA nanotavler

- Overfladen hvorpå DNA tavlerne skal lægge sig forberedes ved at påsætte tape og fjerne det øverste lag.
- 5 µl prøve tilsættes og man lader det stå i 5 min.
- Herefter indsættes prøven i prøveholderen og selvsamlings-buffer påføres.
- Der scannes indtil vi kan se DNA tavler på stor skala.
- Til sidst zoomes ind på de forskellige tavler og der forsøges at opnå gode billeder af hver type tavle.
- Vi kan prøve både med og uden streptavidin.

Spørgsmål til forståelse:

Forklar hvad I så på gelen. Hvordan kan I se et bånd på gelen? Hvad er det, der trækker DNA molekylerne ned i gelen? Hvorfor løber nogle bånd længere i gelen end andre?

Forklar konceptet bag DNA origami selvsamling. Hvilken funktion har den lange M13 DNA streng? Hvilken funktion har de korte DNA hæfteklammer?

Forklar hvordan man kan skrive de bogstaver, der skal stå på DNA nanotavlerne.

Regneopgaver:

- 1) DNA syntese af 20 nmol af én DNA hæfte-streng koster 5.25 kr pr. base. Til vores DNA struktur bruges "hæfte-streng" med en længde på ca. 32 baser. Hvad koster det at købe én DNA hæfte-streng, hvis man bestiller 20 nmol?
- 2) Til en hel DNA origami struktur skal bruges ca. 220 DNA hæfte-streng til at folde den lange M13 DNA streng. Hvad koster det at købe alle disse 220 DNA hæfte-streng? (Vi køber 20 nmol af hver). Ved stor-indkøb kan man få prisen ned på ca. $\frac{1}{4}$ - hvad bliver prisen så?
- 3) Hvor mange DNA strukturer kan man danne ved at bruge alt DNA materialet man har købt på én gang? Husk, at alle 220 hæfteklammer skal bruges i en struktur og forholdet mellem M13 og hver enkel hæfteklamme er 1:4.
- 4) I vores forsøg bruger vi dog ikke alle 20 nmol af vores DNA hæfte-streng. Hvor stor en mængde af hver enkel hæfteklamme bruges til selvsamlingsreaktionen af jeres DNA tavler? Koncentrationen i regneskemaet er for hver DNA hæfteklamme.
- 5) Brug dette tal til at estimere, hvad det koster at lave jeres prøve med DNA strukturer.
- 6) Hvor mange DNA strukturer har I i ét rør?
- 7) Kemisk DNA syntese af DNA har en fejlrate på 1/100 pr base. Beregn hvor mange fejl der er i hver samlet DNA origami struktur.
- 8) En DNA hæfteklamme streng er 32 baser lang og binder M13 med en lang region på 16 baser og med to korte regioner på 8 baser. Her er et eksempel: ACGCTAGC-GCGAGGTGCATGCTAC-GAGCTACA. Brug formelen $T_m = 4^\circ\text{C} * (\text{antal G,C}) + 2^\circ\text{C} * (\text{antal A,T})$ til at beregne smeltetemperaturen T_m for hhv. 16-base regionen og 8-base regionerne. I hvilken rækkefølge binder regionerne i selvsamlingsprocessen (figur 1 side 1)?
- 9) Der er ca. 3,5 mio. Bogstaver i biblen. Hvis I skulle genskrive biblen med ét bogstav per DNA origami, der lå side om side, hvor meget ville det så fylde?