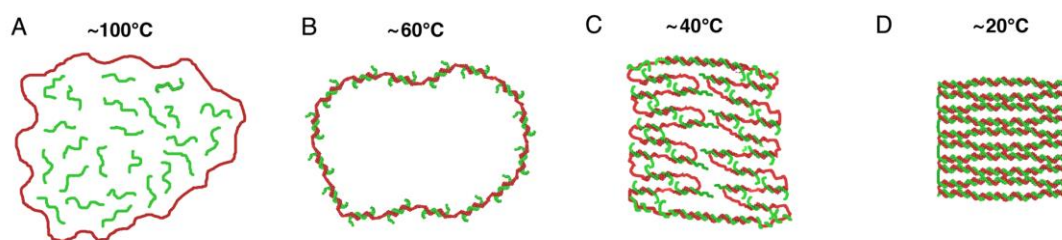


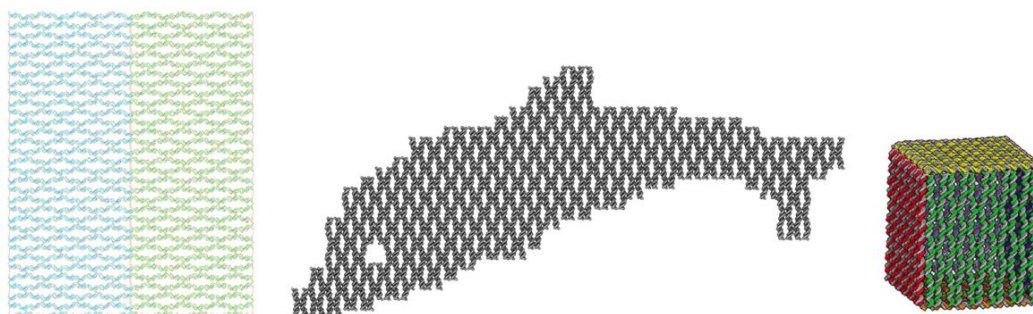
## DNA origami øvelse

### 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. Der benyttes 222 korte DNA strenge, hvoraf hovedparten er 32 baser lange, til at folde den lange DNA streng. 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-streng opvarmes til lige under kogepunktet og derefter sættes til afkøling, vil milliarder af nano-tavler 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).

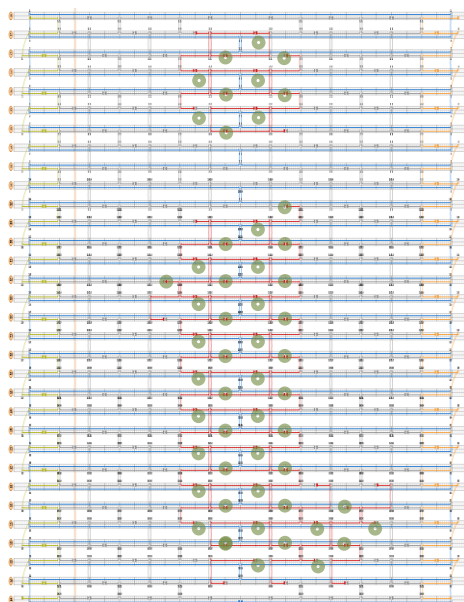


**Figur 1.** Selvsamlingsprocessen sker ved langsom afkøling af blandingen. (A) Ved ca. 100°C er DNA strengene adskilte. (B) Ved 60°C dannes de stærkeste baseparringer. (C) Ved 40°C dannes foldningen af strukturen. (D) Ved 20°C dannes alle baseparringerne. M13-strengen er rød og hæfteklammerne er grønne.



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

En nano-tavle er ikke meget værd, hvis ikke man kan skrive på den og aflæse skriften bagefter. I får derfor mulighed for at skrive på jeres nano-tavler 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 S-400 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 nano-strukturer
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 oligo-mix er ”baggrund” og skal *ikke* modificeres med biotin.

### Biotin-modificering af DNA hæfteklammer med enzymet Terminal Transferase

Bland følgende i et PCR rør:

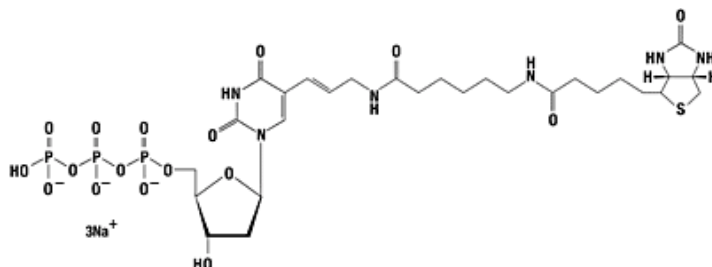
#### Reaktion

8 ul 5x TdT Reaktion buffer  
 8 ul 25 mM CoCl<sub>2</sub>  
 2 ul Terminal transferase (fås hos instruktoren)  
 6 ul “i, N, A eller O” hæfteklammer (20 uM)  
16 ul 40 uM Biotin-dUTP (Figur 4)  
 40 ul total

Reaktionen sættes ved 37°C i 35 minutter, og afsluttes ved 80°C i 10 min.

Når I har sat reaktionen i gang tilsættes 18 uL H<sub>2</sub>O til røret med “i, N, A eller O” hæfteklammer. Det er for at fortynde den sidste dråbe i røret.

Imens I venter, kan I forberede til gel-elektroforese og udregne, hvor meget I skal load på gelen. Hop videre til punktet *Analyse af DNA hæfteklammer med denaturerende gel elektroforese*.



**Figur 4.** Molekylestruktur for biotin-dUTP.

### Analyse af DNA hæfteklammer med denaturerende gel elektroforese

Instruktoren har forberedt en gel til jer. Herunder kan I læse hvordan den laves.

*I skal bruge to glasplader, tre plastik pinde, seks klemmer og én kam. Gelen støbes i stinkskebet 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 uL 10% APS og 14 uL 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 klargøres jeres prøver, der skal undersøges på gelen. Tilsæt 10 uL Loading Buffer (LB) til tre PCR rør. Til hvert rør skal tilsættes 2 pmol DNA strenge, I skal selv regne ud, hvor stort et volumen det svarer til for de enkelte opløsninger (en god formel at huske er  $n=V \cdot c$ ):

- 1) DNA hæfteklammer 2 uM. (Findes i røret "i", "N", "A", eller "O". Det rør som i fortyndede med vand.)

Vol: \_\_\_\_\_

- 2) Biotin-modificerede hæfteklammer på 3 uM. (Fra den enzymatiske reaktion)

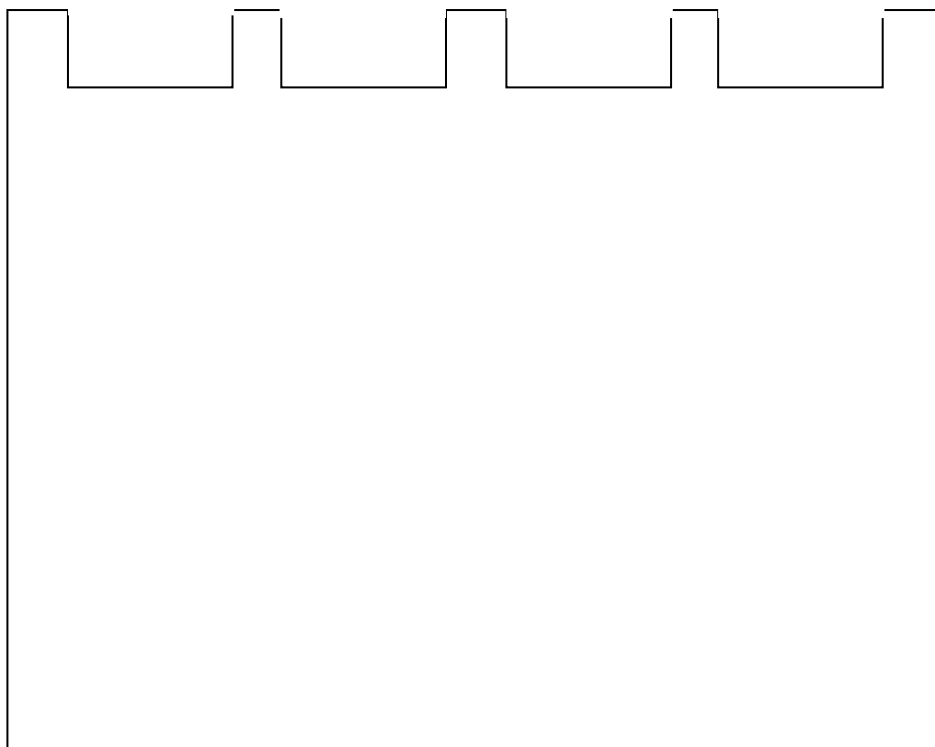
Vol: \_\_\_\_\_

- 3) Biotin-modificerede hæfteklammer, inkuberet med Streptavidin på 1,5 uM. (Tag 3 uL fra den enzymatiske reaktion og tilsæt 3 uL streptavidin (fås hos instruktoren – det er det første I skal gøre, når reaktionen er fædig!).

Vol: \_\_\_\_\_

Når gelen er varm, kan I load jeres prøver. Stop elektroforesen, rens brøndene med sprøjten som før og load 10 uL af jeres prøver – spørg instruktoren om hjælp. Polyacrylamid gelen køres ved 20W i 45 min.

Nu skal gelen "farves", så vi kan se DNA'et i scanneren. Forbered en bakke med vand tilsat 10 uL SYBRgold (udleveres af instruktoren). Gelen skal overføres til vandbadet, der rystes i 10 minutter. Gelen overføres nu til en glasplade – instruktoren vil hjælpe jer med det – og bringes til Typhoon scanneren, der kan tage et billede af den. I 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.

### Selvsamling af DNA nanotavler

Nu blandes alle hæfteklammer - lablede og ulablede - med den lange streng, så strukturerne kan dannes. I skal selv regne ud, hvor meget I skal blande af hver opløsning. De nødvendige oplysninger I skal bruge er:

1. total volumenet i reaktionen er 40  $\mu$ l
2. der skal bruges 4 gange så mange hæfteklammer som M13 DNA

Selvsamlingsreaktion	start conc.	slut conc.	Volumen
biotin-hæfteklammer (dem I har lavet)	50 nM		
Tris-Acetate-EDTA-Magnesium (TAEM)	5X	1X	
Baggrund hæfteklammer ("Bg")	100 nM		
M13 DNA	25 nM	5 nM	
Slut volumen			<u>40 <math>\mu</math>l</u>

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

### 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 ul 1XTAEM til søjlen, slå bunden let mod bordet et par gange og centrifuger igen med mærket udad. Gentag dette 3 gange.

Til sidst tilsættes en blandning af 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 2800 rpm. I eppendorf røret har I nu de oprensede nanotavler

Overfør halvdelen af indholdet til et andet rør.

### **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 uL 30 mM 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.

### **AFM af DNA nanotavler**

1. Overfladen hvorpå DNA tavlerne skal lægge sig forberedes ved at påsætte tape og fjerne det øverste lag.
2. 5 ul prøve tilsættes og man lader stå i 5 min.
3. Herefter indsættes prøven i prøveholderen og selvsamlings-buffer påføres.
4. Der scannes indtil vi kan se DNA tavler på stor skala.
5. Tilsidst zoomes ind på de forskellige tavler og der forsøges at opnå gode billeder af hver type tavle.
6. Vi kan prøve både med og uden streptavidin.

**Spørgsmål:**

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?

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

Forklar hvordan man kan forudsige hvilke bogstaver, der skal stå på DNA nanotavlerne.

**Regneopgaver:**

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?

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. ¼ - hvad bliver prisen så?

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 enkelt hæfteklamme er 1:4.

I vores forsøg bruger vi dog ikke alle 20 nmol af vores DNA hæfte-streng. Hvor stor en mængde af hver enkelt hæfteklamme bruges til selvsamlingsreaktionen af jeres DNA tavler? Koncentrationen i regneskemaet er for hver DNA hæfteklamme.

Brug dette tal til at estimere hvad det koster at lave jeres prøve med DNA strukturer?

Hvor mange DNA strukturer har I i ét rør?

Kemisk DNA syntese har en fejlrate på 1/100. Beregn hvor mange fejl der er i hver DNA origami struktur.

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 formlen  $T_m = 4^\circ\text{C} * (\text{antal G,C}) + 2^\circ\text{C} * (\text{antal A,T})$  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)?

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?