

# Rapport

## Formål

Formålet med denne rapport er, at fremstille en lilla Biosensor i kontrollerede og sikre forhold.

## Materiale- og apparaturliste

De nedenstående lister, beskriver henholdsvis de materialer grupper har forbrugt og de apparatur der er anvendt af gruppen i forbindelse med projektet

### Materialeliste

#### I del 2.A

Responsgen (koordinat 6B i gruppens tilfælde)

Detektionsgen (koordinat 1A)

NEB Buffer 2.1

Restriktionsenzymer

*Xba*

*Pst*

*Spe*

Autoklaveret demineraliseret vand

Is

#### I del 2.b

T4 DNA-ligase

T4 DNA-ligase buffer

Det klippede respons- og detektorgen fra øvelsen 2.a

Autoklaveret demineraliseret vand

Is

#### I del 2.c

Positiv kontrol plasmid (PosCtr)

1 tube med ca. 75 µL kompetente *E. coli* celler

Din biosensor ligering fra øvelse 2.B

3 LB agarplader med 10 µg/mL chloramphenicol

Sterilt SOC eller LB medie

Is

# Apparaturliste

## I del 2.a

Fryseboks  
PCR tube eller 1.5 mL Eppendorf tube  
En varmekab eller varmeskab (instilles til 37°C)  
PCR maskine, til anvendelse som varmekab (80°C)  
Pipetter og pipettespidser  
En centrifuge  
Permanent marker

## I del 2.b

PCR tube eller 1.5 mL Eppendorf tube  
Pipetter og pipettespidser  
Permanent marker

## i del 2.c

Flyder til tuber  
Pipette og pipettespidser  
Vandbad eller varmekab indstillet til 42°C  
Drigalskyspatel  
Bunsenbrænder  
Permanent marker

# Sikkerhed

## GMO sikkerhed

Mærkning af LAB  
Kitler **må ikke** forlade LAB  
Man skal Bære handsker  
Husk ekstra grundig håndvask, ved skift af handsker, og når LAB forlades  
Alt brugt udstyr skal autoklaveres  
Al arbejde foregår på papir på bordet  
Personlige ejendele må ikke medbringes i LAB under forsøget

## Kemikaliesikkerhed

I det nedenstående skema, vil de forskellige sikkerhedsforanstaltninger for de forskellige anvendte kemikalier belyses.

For at beskrive sikkerhedsforanstaltningerne for de kemikalier der følger med biosensor kittet, er der anvendt de sikkerhedsdatablade, der er oplyst som værende indsendt til Arbejdstilsynet i forbindelse med godkendelsen af denne opgave.

For kemikalierne der er anvendt, og ikke følger med i biosensor kittet, er sikkerhedsdatabladene hentet fra frederiksens *chemical manager*.

Kemikalie	H & P klassifikationer	Regler ved eksponering	Brandbekæmpelse	Forholdsregler ved brug
Restriktionsenzym EcoRI <sup>1</sup>	Ingen H & P klassifikationer	<p>Det anbefales altid at tage lægekontakt ved eksponering. Fjern eksponeringskilden med det samme og at man ligger ned. Undgå indånding af støv, dampe, gas eller kondensering af kemikaliet.</p> <p><b>Ved kontakt med hud:</b> Vask hud med sæbe og vand.</p> <p><b>Ved kontakt med øjne:</b> Skyld altid øjne med rigeligt vand i mindst 15 minutter ved at løfte op i øjenlågene. Kontakt læge.</p> <p><b>Ved indånding:</b> Flyt dig til et område med frisk luft</p> <p><b>Ved indtagelse:</b> Rens mund med vand, og drik rigeligt med vand.</p>	<p><b>Slukningsmidler:</b> Sluk med pulver, skum, kulsyre eller vandtåge. Brug vand eller vandtåge til nedkøling af ikke antændt lager.</p> <p><b>Uegnet brandslukningsmidler:</b> Brug ikke vandstråle, da dette kan sprede branden.</p>	<p>Anvend laboratoriekittel, eller andre beskyttelsesbeklædning, sikkerhedsbriller samt nitrilhandsker. Sikre at der er god udluftning i arbejdsområdet.</p>
Restriktionsenzym XbaI <sup>2</sup>	Ingen H & P klassifikationer	<p>Det anbefales altid at tage lægekontakt ved eksponering. Fjern eksponeringskilden med det samme og lig ned. Undgå indånding af støv, dampe, gas eller kondensering af kemikaliet.</p> <p><b>Ved kontakt med hud:</b> Vask hud med sæbe og vand.</p> <p><b>Ved kontakt med øjne:</b> Skyld altid øjne med rigeligt vand i mindst 15 minutter ved at løfte op i øjenlågene. Kontakt læge.</p> <p><b>Ved indånding:</b> Flyt dig til et område</p>	<p><b>Slukningsmidler:</b> Sluk med pulver, skum, kulsyre eller vandtåge. Brug vand eller vandtåge til nedkøling af ikke antændt lager.</p> <p><b>Uegnet brandslukningsmidler:</b> Brug ikke vandstråle, da dette kan sprede branden.</p>	<p>Anvend laboratoriekittel, eller andre beskyttelsesbeklædning, sikkerhedsbriller samt nitrilhandsker. Sikre at der er god udluftning i arbejdsområdet.</p>

<sup>1</sup> [http://biosensor.dk/media/documents/sikkerhedsdatablad\\_EcoRI\\_dansk.pdf](http://biosensor.dk/media/documents/sikkerhedsdatablad_EcoRI_dansk.pdf)

<sup>2</sup> [http://biosensor.dk/media/documents/sikkerhedsdatablad\\_XbaI\\_dansk.pdf](http://biosensor.dk/media/documents/sikkerhedsdatablad_XbaI_dansk.pdf)

		med frisk luft <b>Ved indtagelse:</b> Rens mund med vand, og drik rigeligt med vand.		
Restrektionsenzymet Spel <sup>3</sup>	Ingen H & P klassifikationer	Det anbefales altid at tage lægekontakt ved eksponering. Fjern eksponeringskilden med det samme og lig ned. Undgå indånding af støv, dampe, gas eller kondensering af kemikaliet. <b>Ved kontakt med hud:</b> Vask hud med sæbe og vand. <b>Ved kontakt med øjne:</b> Skyld altid øjne med rigeligt vand i mindst 15 minutter ved at løfte op i øjenlågene. Kontakt læge. <b>Ved indånding:</b> Flyt dig til et område med frisk luft <b>Ved indtagelse:</b> Rens mund med vand, og drik rigeligt med vand.	<b>Slukningsmidler:</b> Sluk med pulver, skum, kulsyre eller vandtåge. Brug vand eller vandtåge til nedkøling af ikke antændt lager. <b>Uegnet brandslukningsmidler:</b> Brug ikke vandstråle, da dette kan sprede branden.	Anvend laboratoriekittel, eller andre beskyttelsesbeklædning, sikkerhedsbriller samt nitrilhandsker. Sikre at der er god udluftning i arbejdsområdet.
Restriktionsenzymet Pstl <sup>4</sup>	Ingen H & P klassifikationer	Det anbefales altid at tage lægekontakt ved eksponering. Fjern eksponeringskilden med det samme og lig ned. Undgå indånding af støv, dampe, gas eller kondensering af kemikaliet. <b>Ved kontakt med hud:</b> Vask hud med sæbe og vand. <b>Ved kontakt med øjne:</b> Skyld altid øjne med rigeligt vand i mindst 15 minutter ved at løfte op i øjenlågene. Kontakt læge. <b>Ved indånding:</b> Flyt dig til et område med frisk luft <b>Ved indtagelse:</b> Rens mund med vand, og drik rigeligt med vand.	<b>Slukningsmidler:</b> Sluk med pulver, skum, kulsyre eller vandtåge. Brug vand eller vandtåge til nedkøling af ikke antændt lager. <b>Uegnet brandslukningsmidler:</b> Brug ikke vandstråle, da dette kan sprede branden.	Anvend laboratoriekittel, eller andre beskyttelsesbeklædning, sikkerhedsbriller samt nitrilhandsker. Sikre at der er god udluftning i arbejdsområdet.
NEB Buffer 2.1 <sup>5</sup>	Ingen H & P klassifikationer	Det anbefales altid at tage lægekontakt ved eksponering. Fjern	<b>Slukningsmidler:</b> Sluk med pulver, skum, kulsyre eller vandtåge.	Anvend laboratoriekittel, eller andre beskyttelses-

<sup>3</sup> [http://biosensor.dk/media/documents/sikkerhedsdatablad\\_Spel\\_dansk.pdf](http://biosensor.dk/media/documents/sikkerhedsdatablad_Spel_dansk.pdf)

<sup>4</sup> [http://biosensor.dk/media/documents/sikkerhedsdatablad\\_Pstl\\_dansk.pdf](http://biosensor.dk/media/documents/sikkerhedsdatablad_Pstl_dansk.pdf)

<sup>5</sup> [http://biosensor.dk/media/documents/sikkerhedsdatablad\\_NEBuffer21\\_dansk.pdf](http://biosensor.dk/media/documents/sikkerhedsdatablad_NEBuffer21_dansk.pdf)

		<p>eksponeringskilden med det samme og lig ned. Undgå indånding af støv, dampe, gas eller kondensering af kemikaliet.</p> <p><b>Ved kontakt med hud:</b> Vask hud med sæbe og vand.</p> <p><b>Ved kontakt med øjne:</b> Skyld altid øjne med rigeligt vand i mindst 15 minutter ved at løfte op i øjenlågene. Kontakt læge.</p> <p><b>Ved indånding:</b> Flyt dig til et område med frisk luft</p> <p><b>Ved indtagelse:</b> Rens mund med vand, og drik rigeligt med vand.</p>	<p>Brug vand eller vandtåge til nedkøling af ikke antændt lager.</p> <p><b>Uegnet brandslukningsmidler:</b> Brug ikke vandstråle, da dette kan sprede branden.</p>	<p>beklædning, sikkerhedsbriller samt nitralthandsker. Sikre at der er god udluftning i arbejdsområdet.</p>
T4 DNA ligase <sup>6</sup>	Ingen H & P klassifikationer	<p>Det anbefales altid at tage lægekontakt ved eksponering. Fjern eksponeringskilden med det samme og lig ned. Undgå indånding af støv, dampe, gas eller kondensering af kemikaliet.</p> <p><b>Ved kontakt med hud:</b> Vask hud med sæbe og vand.</p> <p><b>Ved kontakt med øjne:</b> Skyld altid øjne med rigeligt vand i mindst 15 minutter ved at løfte op i øjenlågene. Kontakt læge.</p> <p><b>Ved indånding:</b> Flyt dig til et område med frisk luft</p> <p><b>Ved indtagelse:</b> Rens mund med vand, og drik rigeligt med vand.</p>	<p><b>Slukningsmidler:</b> Sluk med pulver, skum, kulsyre eller vandtåge. Brug vand eller vandtåge til nedkøling af ikke antændt lager.</p> <p><b>Uegnet brandslukningsmidler:</b> Brug ikke vandstråle, da dette kan sprede branden.</p>	<p>Anvend laboratoriekittel, eller andre beskyttelsesbeklædning, sikkerhedsbriller samt nitralthandsker. Sikre at der er god udluftning i arbejdsområdet.</p>
T4 DNA ligase buffer <sup>7</sup>	Ingen H & P klassifikationer	<p>Det anbefales altid at tage lægekontakt ved eksponering. Fjern eksponeringskilden med det samme og lig ned. Undgå indånding af støv, dampe, gas eller kondensering af kemikaliet.</p> <p><b>Ved kontakt med hud:</b> Vask hud med sæbe og vand.</p>	<p><b>Slukningsmidler:</b> Sluk med pulver, skum, kulsyre eller vandtåge. Brug vand eller vandtåge til nedkøling af ikke antændt lager.</p> <p><b>Uegnet brandslukningsmidler:</b> Brug ikke vandstråle, da dette kan sprede branden.</p>	<p>Anvend laboratoriekittel, eller andre beskyttelsesbeklædning, sikkerhedsbriller samt nitralthandsker. Sikre at der er god udluftning i arbejdsområdet.</p>

<sup>6</sup> [http://biosensor.dk/media/documents/sikkerhedsdatablad\\_T4DNA\\_dansk.pdf](http://biosensor.dk/media/documents/sikkerhedsdatablad_T4DNA_dansk.pdf)

<sup>7</sup> [http://biosensor.dk/media/documents/sikkerhedsdatablad\\_T4LigaseBuffer.pdf](http://biosensor.dk/media/documents/sikkerhedsdatablad_T4LigaseBuffer.pdf)

		<p><b>Ved kontakt med øjne:</b> Skyld altid øjne med rigeligt vand i mindst 15 minutter ved at løfte op i øjenlågene. Kontakt læge.</p> <p><b>Ved indånding:</b> Flyt dig til et område med frisk luft</p> <p><b>Ved indtagelse:</b> Rens mund med vand, og drik rigeligt med vand.</p>		
Chloramphenicol <sup>8</sup>	<p>H350: Kan fremkalde kræft.</p> <p>H341: Mistænkt for at forårsage genetiske defekter.</p> <p>H317: Kan forårsage allergisk hudreaktion.</p> <p>P201: Indhent særlige anvisninger før brug.</p> <p>P280: Bær beskyttelseshandsker/ øjenbeskyttelse</p> <p>P302+352: VED KONTAKT MED HUDEN: Vask med rigeligt vand</p> <p>P308+313: VED eksponering eller mistanke om eksponering: Søg lægehjælp</p>	<p>Det anbefales altid at tage lægekontakt ved eksponering. Fjern eksponeringskilden med det samme og lig ned. Undgå indånding af støv, dampe, gas eller kondensering af kemikaliet</p> <p><b>Ved kontakt med hud:</b> Skyl grundigt og længe med vand, fjern forurenede tøj og evt. smykker</p> <p><b>Ved kontakt med øjne:</b> Skyl øjet grundigt med vand og fjern eventuelle kontaktlinser. Fortsæt skylningen indtil en læge kan fortsætte behandlingen</p> <p><b>Ved indtagelse:</b> Skyl straks munden og drik vand eller mælk. Fremkald ikke opkastning. .</p>	<p>Ved brand dannes der giftige gasser og dampe, heriblandt carbonmonoxid, nitrogenoxider og hydrogenchlorid. Brand af chloramphenicol skal slukkes ved anvendelse af vandtåge-, kulsyre- og pulverslukker .</p>	<p>Anvend laboratoriekittel, eller andre beskyttelsesbeklædning, sikkerhedsbriller samt nitrilhandsker. Sikre at der er god udluftning i arbejdsområdet.</p>
96% ethanol <sup>9</sup>	<p>H225: Meget brandfarlig væske og damp</p> <p>H319: Forårsager alvorlig øjenirritation</p> <p>P210: Holdes væk fra antændelseskilder. Rygning forbudt.</p> <p>P280: Bær beskyttelseshandsker/ øjenbeskyttelse</p> <p>P305+351+338: Ved kontakt med øjnene: skyl forsigtigt med vand i flere minutter. Fjern evt. kontaktlinser, hvis dette kan gøres let. Fortsæt skylningen</p> <p>P337+313: Ved vedvarende</p>	<p><b>Ved indånding:</b> Personen bringes i frisk luft, og holdes i ro samt under opsyn. Personen lejres i aflåst sideleje og holdes varm, ved risiko for bevidstløshed. Ved manglende vejtrækning, udøver der kunstigt åndedræt.</p> <p><b>Ved kontakt med hud:</b> Fjern forurenede tøj og evt. smykker, skyl længe og grundigt med vand .</p> <p><b>Ved indtagelse:</b> Skyl straks munden og drik vand eller mælk. Fremkald ikke opkastning.</p> <p><b>Ved kontakt med øjne:</b> Skyl øjet</p>	<p>Ved brande dannes der giftige gasser, heriblandt carbonmonoxid. Brand af ethanol slukkes ved anvendelse af vandtåge-, kulsyre- og pulverslukker</p>	<p>Anvend laboratoriekittel, eller andre beskyttelsesbeklædning, sikkerhedsbriller samt nitrilhandsker. Sikre at der er god udluftning i arbejdsområdet. Der må ikke være åben ild hvor stoffet anvendes.</p>

<sup>8</sup><http://biosensor.dk/media/documents/Chloramphenicol.pdf>

<sup>9</sup><http://biosensor.dk/media/documents/Ethanol.pdf>

	øjenirritation: Søg lægehjælp.	grundigt med vand og fjern eventuelle kontaktlinser. Fortsæt skylningen indtil en læge kan fortsætte behandlingen		
Positiv kontrol plasmid opbevaringsbuffer <sup>10</sup>	Ingen H & P klassifikationer	<b>Ved kontakt med huden:</b> Skyl med rigeligt vand. Øjeblikkelig lægehjælp er ikke nødvendig. <b>Ved kontakt med øjnene:</b> Skyl forsigtig med vand i flere minutter. Fjern kontaktlinser, hvis dette er relevant og kan gøres nemt. <b>Ved indtagelse:</b> Søg lægehjælp hvis du føler dig dårligt tilpas efter indtagelse, ellers forventes der ikke at være nogen fare ved indtagelse. <b>Ved indånding:</b> Søg lægehjælp efter behov, forventes ikke at være en inhalationsfare under normal anvendelse.	Der kendes ingen særlige farer ved brand af opbevaringsbufferen. Slukkes ved anvendelse af vandspray, kulsyre-, skum-, og pulverlukker.	Anvend laboratoriekittel, eller andre beskyttelsesbeklædning, sikkerhedsbriller samt nitralthandsker.
Glycerol <sup>11</sup>	Ingen H & P klassifikationer	<b>Ved indånding:</b> Personen bringes i frisk luft. <b>Ved kontakt med hud:</b> Skyl med vand <b>Ved kontakt med øjne:</b> Skyl med vand. Fjern kontaktlinser. <b>Ved indtagelse:</b> Skyl munden og drik vand	Ved brand dannes der giftige gasser og damp, heriblandt carbonmonoxid. Brand af glycerol slukkes ved anvendelse af vandtåge-, kulsyre- og pulverlukker	laboratoriekittel, eller andre beskyttelsesbeklædning, sikkerhedsbriller samt nitralthandsker.
Tryptone <sup>12</sup>  (her er anvendt sikkerhedsdatablad fra Sigma-Aldrich, se fodnote)	Ingen H & P klassifikation	<b>Ved indånding:</b> Personen bringes i frisk luft, hvis manglende vejtrækning forekommer, giv kunstigt åndedræt. <b>Ved kontakt med hud:</b> Vaskes af med sæbe og vand <b>Ved kontakt med øjne:</b> Skyl øjnene med vand <b>Ved indtagelse:</b> Skyl munden med vand	Der kendes ingen særlige farer ved brand af tryptone. Slukkes ved anvendelse af vandspray, kulsyre-, alkoholbestandigt skum-, og pulverlukker.	laboratoriekittel, eller andre beskyttelsesbeklædning, sikkerhedsbriller samt nitralthandsker.

<sup>10</sup> [http://biosensor.dk/media/documents/K0491COMPONENTH\\_MTR-EULT\\_DA.pdf](http://biosensor.dk/media/documents/K0491COMPONENTH_MTR-EULT_DA.pdf)

<sup>11</sup> <http://biosensor.dk/media/documents/Glycerol.pdf>

<sup>12</sup>

<https://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=DK&language=da&productNumber=22090&brand=SIAL&PageToGoToURL=https%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fsearch%3Fterm%3D91079-40-2%26interface%3DCAS%2520No.%26N%3D0%26mode%3Dpartialmax%26lang%3Den%26region%3DDK%26focus%3Dproduct>

# Fremgangsmåde og valg

## Step 1

Find en tube med kompetente celler (75µL)

## Step 2

Optø cellerne langsomt på is (5 min)

## Step 3

Marker 3 tuber med henholdsvis: Biosensor, negativ kontrol og positiv kontrol.

## Step 4

Tuberne sættes på is

## Step 5

Tilføj de kompetente celler til de tre tuber

## Step 6

5 µL ligerede biosensor tilføjes til tuben "biosensor"

## Step 7

1,0µL positiv kontrol tilføjes tuben "positiv kontrol"

## Step 8

Rul tuben i luften

## Step 9

Cellerne sættes på is i 15 min

## Step 10

Fly tuberne til varmeblok (42°C i præcis 30 sek)

## Step 11

Placer rør på is i 5 min

## Step 12

Tilføj 250µL LB medie i hver tube.

## Step 13

Tuber inkuberes ved 37°C i 2-3 timer.

## Step 14



Tænd bunsenbrænder og arbejde tæt ved den.

Step 15

Ryst forsigtigt tuben.

Step 16

Pipetter 100µL af celler og tilføj dem til passende agarplader.

Step 17

Brug en spatel, som har været dyppet i ethanol og brændt over bunsenbrænder til at sprede cellerne på agarpladerne.

Step 18

Agarpladerne sættes til tørring ved siden af bunsenbrænderen.

Step 19

Når agarpladerne er tørre, vendes de med bunden opad vendt og placeres i en pose.

Step 20

Posen inkuberes ved 37 °C i 3 dage.

## Teori

I følgende afsnit vil der være teoretiske forklaringer og uddybninger for de valg der blev truffet tidligere i opgaven. Der vil også være et teoretisk afsnit omkring nødvendig forhåndsviden og om biosensor generelt.

### Nødvendig teori:

<http://biosensor.dk/elev/teoribaggrund/>

### Det centrale dogme

Det centrale dogme er en hovedsætning inden for molekylærbiologi, der beskriver strømmen af genetisk information mellem de biologiske stoffer i en celle. DNA koder for RNA som koder for protein.

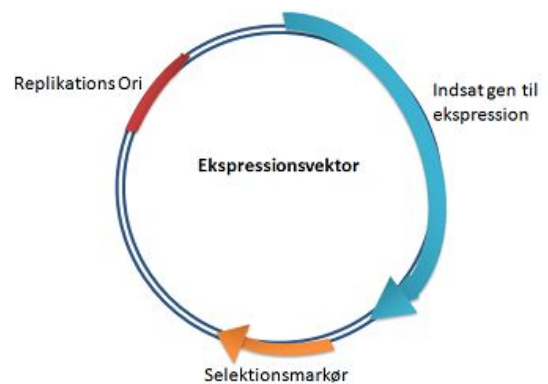
Cellens DNA udgøre den samlede arvemasses. DNA's informationer i de enkelte gener kan overføres til proteiner ved at bliver transskriberet til en RNA molekyle, som efterfølgende ved hjælp af translation, bliver til protein.

I 1970 fandt man ud af at informationsstrømmen ikke kun går en vej, men ved brug af revers transkriptase, kan RNA laves til DNA.

## Plasmider/ekspressionsvektorer

En nem måde at koble gener sammen er vha. færdiglavede ekspressionsvektorer. Det er cirkulære DNA-sekvenser eller plasmider. De indeholder to ekstra områder, et replikations ORI og en selektionsmarkør som sikre en god produktion af genets protein.

Det samlede gen kan sættes ind i ekspressionsvektoren, som kan ses på **figur#**



## Heat-shock transformation

Når en organisme skal optage fremmede DNA, kaldes det for transformation. Der findes forskellige transformations former. I biosensor benytter vi os af transformations metoden der hedder heat-shock transformation. Heat-shock transformation bliver også kaldet for kemisk kompetence. Med heat-shock transformationen behandles cellerne kemisk med fx calcium ioner. Efter de er blevet kemisk behandlet, kaldes cellerne kemisk kompetente

Når kompetente celler udsættes for et varme/heat-shock åbnes membranen kortvarigt og den ekspressionsvektorer kan nu optages af cellen. Efter cellerne har været udsat for heat-shock transformation kan de være skrøbelige og skal derfor håndteres skånsomt.

## Genregulering

En celler har tusindvis af gener og for at kunne styre at kun de ønskede gener er aktive er det vigtigt at forstå genregulerings tænd og sluk mekanismer. Når man forstår genregulerings tænd og sluk mekanisme, kan man bruge det til at tune celler, så de kan producere det ønskede produkt.

Mange genre er kun nødvendige i særlige situationer og derfor er der behov for en regulering af deres ekspression. Nogle bakterier eksempelvis særlig selvmord gener, som ikke skal udtrykkes normalt, da den kun skal bruges i særlige tilfælde. Der findes også gener der beskytter en celle mod varme, og det er kun nødvendigt at det gen er aktivt når cellerne bliver udsat for varme.

## Antibiotika og brugen af antibiotika som selektionsmarkør

Selektion er en udvælgelse af bestemte genetiske forandrede celler, det kan for eksempel forekomme efter en gensplejsning, hvis der sker en mutation. I gensplejsning vil typisk kun en lille del af cellerne blive gensplejset som ønsket. For at undgå at skulle teste en masse forkerte celler, kan man bruge selektion, for at få de forkerte celler fjernet.

Ved selektion skaber man et miljø for cellerne, hvor kun celler med et bestemt selektionsgen kan vokse. Det kan for eksempel være en bestemt type af antibiotikum man bruger til at selekterer. Det betyder at man sætter antibiotikumet ind i cellen, og på den måde bliver antibiotikaen, det nye selektion markør i cellen. Selektionsgenet bliver så markør for om gensplejsningne er lykkedes. Dette skyldes at kun de rigtigt gensplejsede gener ville overleve i det valgte miljø. Princippet er en positiv selektion, da kun de interessante celler ville blive selekteres for.

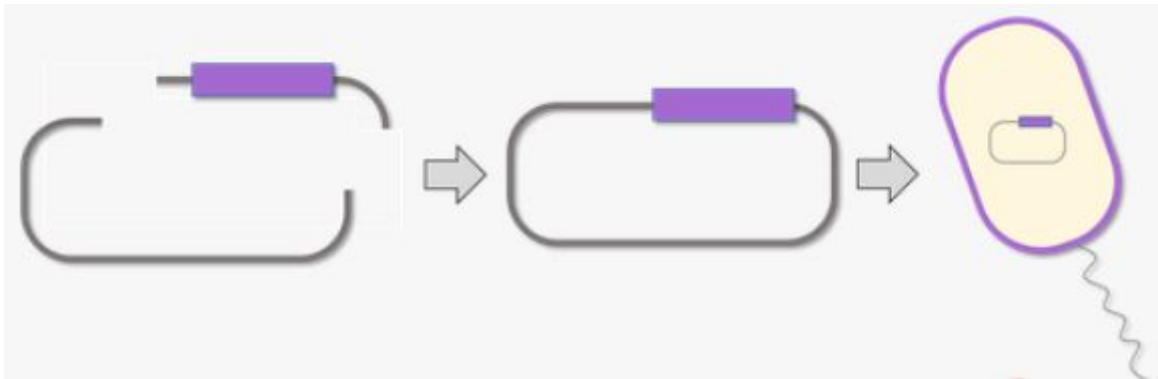
Antibiotikaresistens er en populær selektionsform. Den bruges i bakterier der er følsomme over for antibiotikum. Man skal kende et selektionsgen for resistensen, der fjerner den følsomhed.

## Biosensor

<http://biosensor.dk/elev/teoribiosensor/>

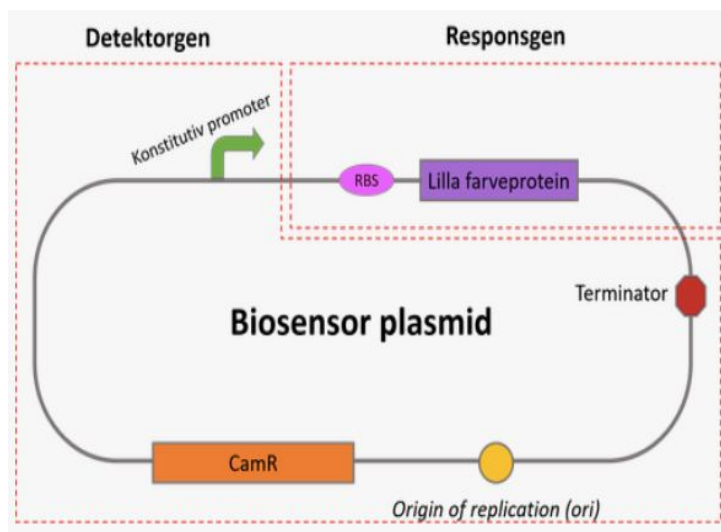
En biosensor er en bakterie, der kan detektere et input og give et respons. Vi laver biosensor niveau 1, hvilket betyder, at vores biosensor ikke er en rigtig biosensor og kan derfor ikke detektere et input, men kun give en respons.

På niveau 1 laves der det man kalder en biosensor plasmid. Hvilket betyder, at to stykker DNA sammensættes. Plasmidet bliver transformeret ind til en E. coli bakterie, som dernæst bliver genmodificeret til, at være lilla som det også kan ses på figuren herunder.



Når man kigger nærmere på de to sammensatte DNA stykke, indeholder Detektionsgenet fire elementer, som er følgende: En promoter, et origin of replication (ori), et chloramphenicol (Cam) resistensgen og en terminator. Det andet DNA stykke kaldes responsgenet, og indeholder følgende genelementer: et ribosomalt binding sted(RBS- også kendt som Shine-Delgarno sekvens) og en kodende DNA sekvens (CDS- som kommer fra det engelske navn coding DNA sequence.) Når et responsgen og et detektionsgen bliver korrekt sammensat dannes der et funktionelt biosensor plasmid. Promotoren i detektionsdelen er hvad man også kalder en konstitutiv promoter og vil dermed altid være aktiv. Det betyder, at den altid udtrykker det DNA som ligger efter promotoren.

I det sammensatte plasmid bliver responsgenet udtrykt fordi det ligger nedstrøms for promotoren. Hvis koden i DNA'et koder for et farvet protein, som det gør i vores tilfælde, bliver det udtrykt og biosensoren bliver farvet (lilla).



## Origin of the replication og Chloramphenicol resistensgen

Origin of replication sørger for, at bakterierne kan replicere biosensor plasmidet ligesom bakterierne replicere deres egne kromosomer. Hvis ikke Origin of replication var tilstedeværende i plasmidet, ville plasmidet ikke komme med videre når bakterien deler sig. På den måde vil kun få bakterier indeholde biosensor plasmidet og udtrykke responsgenet, i form af den lilla farve.

Chloramphenicol resistensgenet bruges som selektionsmarkør; når bakterierne transformeres er det kun meget få som optager Biosensor plasmidet. Derfor for at finde de bakterier som har optaget plasmidet, sættes bakterierne ned i et vækstmedium med antibiotikummet chloramphenicol i. Dette gør man fordi, biosensor plasmidet indeholder et resistensgen overfor chloramphenicol. Det betyder altså, at der kun vil være bakterier tilbage som har optaget plasmidet.

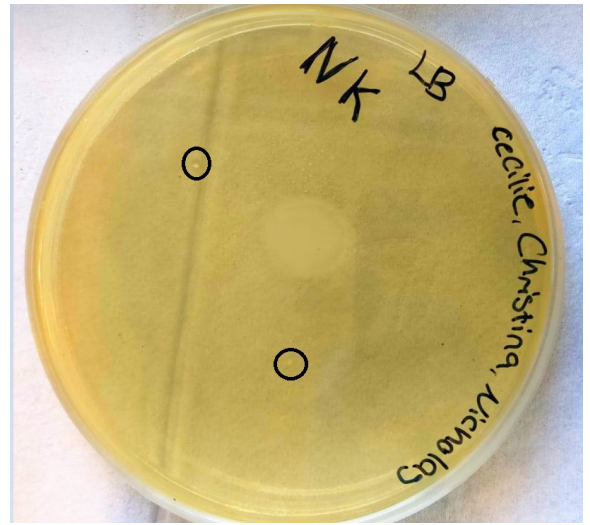
## Resultater

I dette afsnit vil resultaterne kort blive præsenteret og kommenteret. Til dette er der anvendt et skema, hvor resultaterne bliver kommenteret, og vist.

Beskrivelse af resultat	Billede af petriskåle
-------------------------	-----------------------

### Negativ kontrol uden chloramphenicol

Som det kan ses på billedet til venstre, er der to bakteriekolonier på vækstmediet. Disse to kolonier er markeret med en sort ring. Her kunne det forventes at være en større bakterievækst, da der er ikke er et antibiotikum til stede der begrænser væksten af microorganismer.



### Positiv kontrol biosensor med chloramphenicol

På den positive kontrol er der kun markeret en enkelt koloni, på petriskålen. Dette indikerer at vores biosensor forsøg er mislykkedes, da der burde være mange kolonier. Endvidere burde der, for at forsøget lykkedes, være kolonier med farven lilla, da det er dette vores biosensor gen koder for.



## Fejlkilder

Da vi på baggrund af vores ovenstående resultater kan konkludere at vores biosensor forsøg, må der konkluderes at der må være hændt komplikationer i forbindelse med udførelsen af forsøget. Disse mulige komplikationer vil blive gennemgået i dette afsnit.

Det er mest sandsynligt at komplikationen er forekommet under øvelsen 2.c *Transformation*, specielt er det sandsynligt at det er hændt under skridt 11. Det er netop under skridt 11 i 2.c, at man skal være speciel påpasselig omkring skrøbeligheden af forsøget. Hvis der er sket komplikationer i dette skridt i forsøget, kan man risikere at plasmidet ikke kommer ind i cellen i nogen af tilfælde. Det er sandsynligvis dette der er hændt i vores forsøg, da der er vokset meget få kolonier på vækst medierne, af disse kolonier på vækst medierne, har ingen af disse kolonier aktive biosensor gen.

Endvidere kan det så formodes at de kolonier der var på vækstmediet, var udefrakommende, og skyldes derfor en kontamination. Dette er en formodning der er dannet

på baggrund af at de *E.coli* bakterier der er anvendt i biosensor forsøget, er omkommet under skidt 11 i øvelse 2.c

## Konklusion

Det kan konkludere at biosensoren ikke virkede. Gruppen gætter på at grunden til at biosensoren ikke virkede, skyldes at efter cellerne havde været udsat for heat-shock transformation , og at de efterfølgende ikke blev behandlet forsigtigt nok.