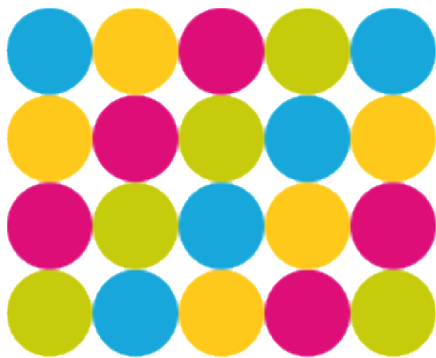


Opdateret august 2018



Biosensor

Niveau 1

Øvelsesvejledning

novo nordisk fonden



LUNDBECKFONDEN

Vigtig information om brug af Biosensor-kittet

for undervisere

Før øvelsen startes er det vigtigt, at underviseren har læst følgende erklæring og lærervejledningen, som kan tilgås via: <http://biosensor.dk/laerer/laervervejledning/>

Dette kit, som indeholder BioBricks, kloningsenzymmer og *E. coli* bakteriestamme, er godkendt til brug i undervisning i genteknologi i biologi, bioteknologi A, teknikfag og teknologi A på STX, HTX og HF. Aftalen med Arbejdsstyrelsen indebærer, at undervisningen skal varetages af en gymnasielærer, som har en biologisk uddannelsesbaggrund svarende til de af VTU udstukne faglige mindstekrav i biologi og som har gennemført et af Arbejdstilsynets godkendte kompetencegivende kurser i eksperimentel genteknologi af 2 dages varighed. Når eksperimenter, som er omfattet af aftalen, gennemføres i forbindelse med enkeltfaglig eller tværfaglig undervisning, har gymnasielæreren ansvar for, at forsøgene gennemføres efter de gældende retningslinjer.

De gentologiske forsøg må kun udføres, dersom der senest **3 uger** forud for arbejdet med forsøgene (herunder forarbejdet) er indsendt en indberetning til Undervisningsministeriets fagkonsulent i bioteknologi på det indberetningsskema, der indgår som en del af aftalen. Ved indberetning indsendes altid en udfyldt forside og mindst ét udfyldt bilag. Indberetningsskemaets forside skal underskrives af både den for forsøgenes udførelse ansvarlige lærer og skolens rektor/leder. Indberetningsskemaet kan findes på: <http://biosensor.dk/laerer/indberetningsskema/>

Det er et krav, at du som lærer registrerer dig på: <http://biosensor.dk/laerere/tilmeld/>. Under tilmeldingen skal der angives et kodeord. Kodeordet er blevet sendt til den registrerede kontaktperson på skolen. Findes skolen ikke på listen over tilmeldte skoler, kan skolen tilmeldes ved at skrive til: biosensor@bio.dtu.dk. Biosensor-kittet sendes til skolen én gang umiddelbart efter tilmeldingen. Kittet kan bruges i minimum 3 år, hvis det er opbevaret korrekt. Biotech Academy kan ikke stilles ansvarlig for holdbarheden af kittet.

Biotech Academy forventer, at både underviseren og eleverne registrerer deres biosensorer via hjemmesiden. Biosensor-kittet kan udsendes omkostningsfrit til gymnasierne, fordi Biotech Academy har modtaget støtte fra private fonde og virksomheder. Biotech Academy's fremtidige mulighed for at udvikle spændende naturvidenskabeligt undervisningsmateriale

afhænger af at kunne afrapportere til fonde og virksomheder. Derudover kan andre gymnasielever bruge resultaterne som inspiration til deres egne forsøg.

Velkommen til Biotech Academy's Biosensor-øvelse

Forestil dig, at du kunne designe en bakteriel biosensor, som kan hjælpe læger med at detektere kræft tidligere og derved redde liv, eller en bakterie, som kan finde plastik i havet og nedbryde det, eller måske noget helt tredje. I Biosensor-øvelsen skal du ikke blot forestille dig, hvordan du kan bruge bioteknologi til at løse problemstillinger. Du kan designe din egen biosensor og dernæst lave og teste den i laboratoriet.

Du vil bruge de samme bioteknologiske metoder, som forskere og universitetsstuderende bruger. Det tager én dag at lave biosensoren. Når du har testet din biosensor, kan du dele den med andre elever og danske universitetsstuderende. Du kan også være heldig, at din biosensor bliver indsendt til iGEM - den største internationale konkurrence for syntetisk biologi. Vi håber, at øvelsen vil inspirere dig til at se, hvordan bioteknologi kan bruges til at løse nationale og globale udfordringer.

Målet med Biosensor-kittet er, at du skal kunne lave mere end 500 forskellige biosensorer. Hvilken biosensor du laver er helt op til dig. Det er dog ikke muligt at detektere *alt* med Biosensor-kittet og vi arbejder stadig på at udsende alle de gener, som vi har i vores pipeline. Har du en god ide til en biosensor, kan du deltage i den årlige Biosensor-konkurrence med din ide. Hvis din idé er den bedste, laver vi biosensoren ved hjælp af DNA-syntese og udsender den til alle gymnasierne, som deltager i Biosensor-øvelsen.

Hvis det alt sammen er lidt overvældende, så husk at du kan finde videoer som beskriver, hvad en biosensor er, og hvordan du designer den, på:

<http://biosensor.dk>

Vi håber, at det bliver sjovt. God fornøjelse!

Hilsen Pernille og Viktor fra Biotech Academy

Projektet er sponsoreret af:

Novo Nordisk Fonden, Novozymes A/S, Lundbeckfonden, New England Biolabs,
BioNordika A/S, Otto Mønsted Fonden og SnapGene

Indhold og opbevaring af Biosensor-kittet

Biotech Academy udsender gratis Biosensor-kittet til danske gymnasier. Kittet indeholder kloningsenzymmer, BioBricks (=biosensor-gener) og *E. coli* bakterier til en værdi over 1.500 DKK. Da Biotech Academy er en non-profit organisation drevet af danske universitetsstuderende, er det kun muligt at sende ét Biosensor-kit ud per gymnasium. Kittet indeholder nok kloningsenzymmer til at lave op til 200 biosensorer og kan holde i minimum 3 år. Vi håber derfor, at I vil passe godt på kittet, så andre elever på jeres gymnasium kan få glæde af det i flere år. Det er derfor vigtigt, at I opbevarer kittet korrekt.

Kittet udsendes i to dele. Den første del udsendes af Biotech Academy i samarbejde med EduForce ved Danmarks Tekniske Universitet. Dette kit indeholder:

- ***E. coli* bakteriestamme** – *opbevares ved -20 eller -80°C*
Godkendt K12 stamme til brug i øvelsen. Cellerne er opløst i 15% glycerol. Det er bedst at opbevare dem ved -80°C, men de kan let holde sig i flere år ved -20°C.
- **Detektions og responsegener** – *opbevares ved -20°C*
Generne findes alle i 1.5 mL tuber. Tuberne er markeret med et bogstav (A-H) efterfuldt af et tal (1-12). I biosensor niveau 1 kittet findes 1 detektionsgen og 7 responsegener.
- **Kontrol-plasmider og biosensorer**
Kan bruges til at teste dine kompetente *E. coli* celler, eller hvis du ikke vil lave din egen biosensor. Kontrol-plasmiderne sendes sammen med biosensor-delene.
- **500 mg chloramphenicol** – *opbevares ved 4 °C (ikke opløst) eller -20°C (opløst i ethanol)*
Antibiotika til selektion af *E. coli* biosensor-transformanter. *E. coli* stammen, som er udsendt, er ikke resistent. **Inden kittet tages i brug første gang:** Tilsæts 50 ml 96 % ethanol derved opnås en opløsning på 50 mg/ml (1%) chloramphenicol. Husk at påsætte ny sikkerhedslabel (medfølger i kit).
- **1% chloramphenicol i ethanol sikkerhedslabel**
På sættes rør med chloramphenicol, når dette er blevet opløst i ethanol.
- **Fryseboks**

Kloningsenzymmerne er udsendt af New England Biolabs og deres danske samarbejdspartner BioNordika. Biotech Academy giver besked til BioNordika, når et Biosensor-kit skal udsendes. Kittet indeholder:

- **Restriktionsenzymmer** – *opbevares ved -20°C*

EcoRI, *XbaI*, *PstI* og *SpeI*. Med kittet kommer en lille fryseboks. Opbevar altid enzymerne i boksen, når du tager dem ud af fryseren. Stil dem tilbage, så snart du er færdig med dem.

- **T4 DNA-ligase** - *opbevares ved -20°C*
Brug fryseboksen til at holde enzymet koldt, når du skal bruge det.
- **Buffer til restriktionszymer** Buffer 2.1 - *opbevares ved -20°C*
Kan tøs op ved stuetemperatur.
- **Buffer til T4 DNA-ligase** - *opbevares ved -20°C*
Kan tøs op ved stuetemperatur. Denne buffer er ikke så stabil ved gentagne optøninger, så vi anbefaler, at man (første gang man bruger kittet), anvender et lille trick, som er beskrevet herunder.

Kittet skal opbevares ved -20°C. Når kloningsenzymene tages ud af fryseren, skal de **altid** opbevares på is eller i den lille fryseboks, som følger med i kittet. Tag først kloningsenzymene ud, lige før de skal tilsættes. Kloningsenzymene skal altid tilsættes som det sidste. Når kloningsenzymene er tilsat, bør de straks sættes tilbage i fryseren. Bufferne til kloningsenzymene skal tømme på is. Tag dem ud cirka 30 minutter, før du skal bruge dem. Bufferne til kloningsenzymene er meget stabile bortset fra T4 DNA-ligase bufferen, da den indeholder ATP. Ved gentagen optøning og nedfrysning, mister T4 DNA-ligase bufferen sin aktivitet. Vi anbefaler derfor at pipettere T4-DNA ligase bufferen ud i mindre portioner (tuber eller PCR-rør). På denne måde optøes kun en lille del af bufferen hver gang.

Det er ikke muligt at lave 200 af den samme (fx lilla) biosensor, da der i kittet kun er dele til at lave 20 af den samme biosensor. Ønsker I at lave mere end 200 biosensorer, skal I bruge mere af T4 DNA-ligase, som kan bestilles hos BioNordika.dk.

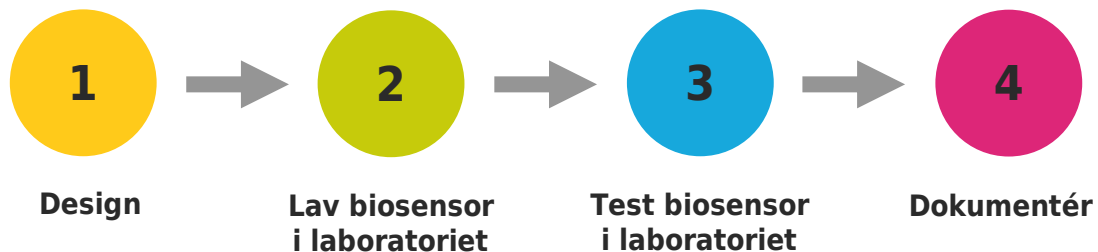
Biosensor-øvelsen

I gennem hele øvelsen skal du bruge Biosensor-projektets online-portal:

<http://biosensor.dk>

Du og din gruppe vil få jeres eget login til hjemmesiden tilsendt, når I er blevet oprettet af jeres underviser.

Øvelsen består af fire dele og kan med fordel udføres i grupper på 3-4 elever, som er interesseret i de samme bioteknologiske problemstillinger.



Hvad er en biosensor?

En biosensor er en bakterie, som kan detektere et input og give et respons. Vi har lavet en video, som forklarer, hvad en biosensor er. Se den på:

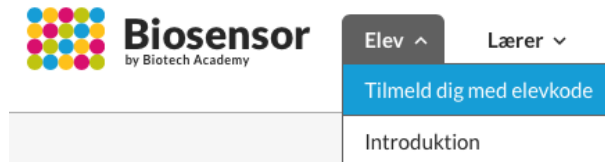
<http://biosensor.dk/elev/teoribiosensor/>

I biosensor niveau 1 øvelsen skal du lave en biosensor, som altid er tændt. Det betyder, at dine *E. coli* bakterier altid udtrykker det gen, som du sætter ind i dem. Hvis du sætter et gen ind, som producerer et blå farvestof, så bliver dine celler blå. Hvis du sætter et laktose-nedbrydende enzym ind, så kan dine bakterier gro på laktose (mælkesukker). Du vælger selv hvilket gen, du har lyst til at arbejde med.

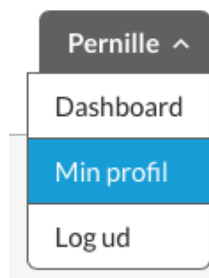
1. Design biosensor

Step 1 - Opret dig på biosensor.dk

For at kunne oprette en biosensor skal du/l være registreret på biosensor.dk. Du kan registrere dig under "Elev > Tilmeld dig med elevkode". Du skal bruge en elevkode, som din lærer giver dig.



Når du er tilmeldt får du tilsendt en e-mail med et link. Klik på linket for at aktivere din bruger. Du kan nu logge ind. Hvis du har brug for at ændre dit password kan du klikke på dit navn i øverste højre hjørne og vælge "Min profil".



Når I alle er oprettet kan din lærer tilføje dig/jer til en gruppe. Du får automatisk besked på e-mail, når du bliver tilføjet til en gruppe. Først når din/jeres gruppe er oprettet kan I registrere din/jeres biosensor.

Step 2 - Design biosensor

Til biosensor niveau 1 skal du/l vælge det **responsgen** fra BioBrick Exploren, som du/l ønsker at arbejde med. Biobrick Exploren findes på forsiden af hjemmesiden (klik evt. på Biosensor logoet i øverste venstre hjørne).

Hvert gen kommer i en tube, som er markeret med et bogstav (A-H) efterfulgt af et tal (1-12). Det kan være en god idé at se, om der allerede er nogle andre, som har lavet en biosensor, som har det samme gen, som du har valgt. Du kan nemlig bruge andres rapporter som inspiration til, hvordan du kan teste din biosensor. Du må selvfølgelig gerne lave en biosensor, som allerede er lavet før. Du kan se alle biosensorer, som er færdige i BioBrick Exploren på forsiden.

Responsgener
Enzymer
Amylase
Beta-galaktosidase
Luciferase (lys-enzym)
Phytase
Cel5A, endoglucanase
Farver
Fluorescens
Lugte
Syntaser

Step 3 - Opret biosensor

Når du/I har besluttet jer for, hvilken biosensor I gerne vil lave, skal én af jer oprette biosensoren. Det kan du via dit "Dashboard", som du finder i øverste højre hjørne. Klik herefter på "Opret biosensor".



The screenshot shows two parts of the interface. On the left is a user profile menu for 'Pernille' with options: 'Dashboard' (highlighted in blue), 'Min profil', and 'Log ud'. On the right is a group page for 'Gruppe 1' (Biotech Academy BA-klasse årgang 2014 fra Biotech Academy). Under the heading 'Biosensorer', it says 'Din gruppe har ingen biosensorer' and there is a blue button labeled 'Opret biosensor'.

Du/I skal vælge "Plasmid Niveau 1" under Detektor-gen. Vælg desuden responsgenet og giv din/jeres biosensor et navn. Desuden er der noget information, som I skal læse og klikke, at I er indforstået med. Det er for, at Biotech Academy er sikre på, at jeres lærer har givet jer den nødvendige information om håndtering af GMO i laboratoriet.

Opret biosensor

Navn

Citron-biosensoren

Detektor gen

Plasmid Niveau 1

Respons gen



Limonene synthase

Hvis I er interesseret i at læse mere om GMO, så findes der en god artikel om GMO og antibiotika resistens på Biotech Academy's hjemmeside:

<http://www.biotechacademy.dk/Undervisningsprojekter/Grundskoleprojekter/Bakterier-vira-og-antibiotikaresistens/Teori/Antibiotika-og-resistens>

2. Lav biosensor i laboratoriet

Den eksperimentelle del af øvelsen er delt op i tre dele. På biosensor-projektets hjemmeside kan du finde videoer, som viser, hvordan øvelsen foregår.

Del	Eksperiment	Tid
2.a	<u>Klipning af gener med restriktionsenzym</u>	2 timer
2.b	<u>Ligering af plasmider</u>	1.5 time
2.c	<u>Transformation af <i>E. coli</i> (GMO protokol)</u>	3 timer

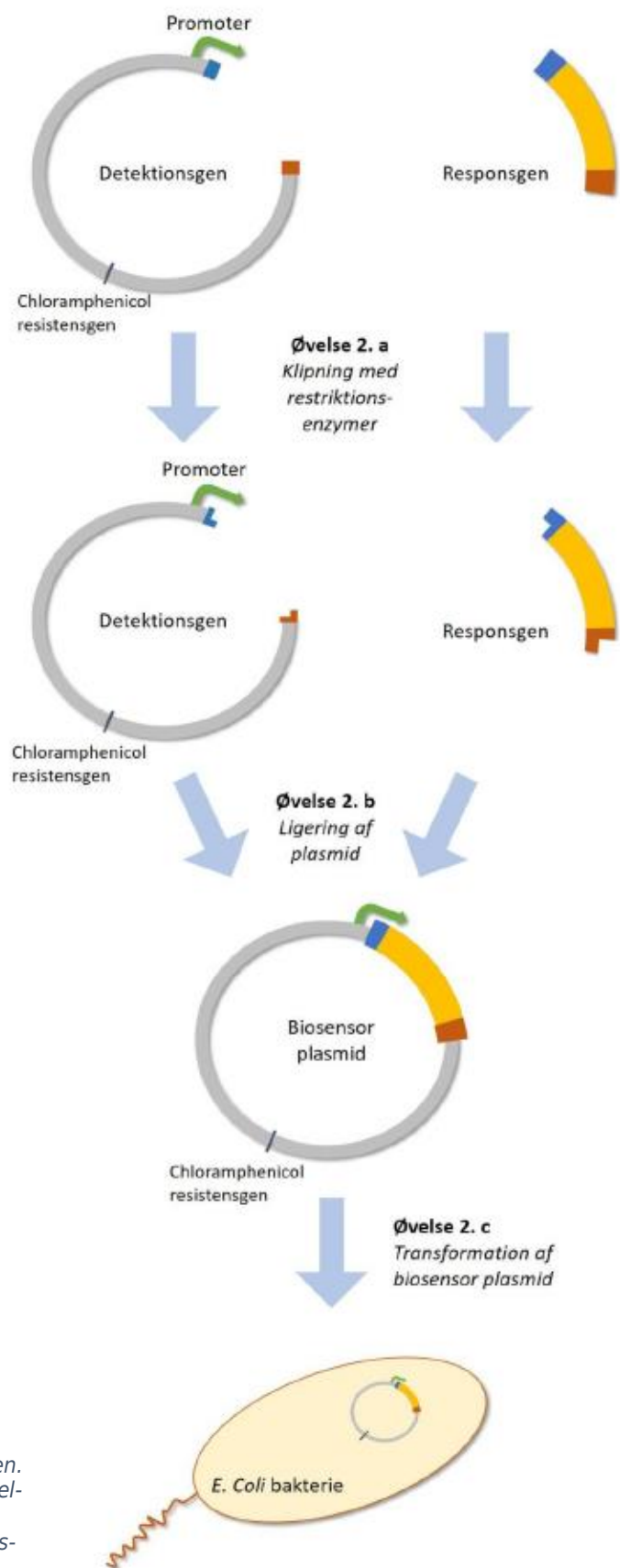
Du kan vælge at udføre hele øvelsen på én dag eller over flere dage. Efter hver deløvelse er det muligt at stoppe øvelsen. Det eneste du skal gøre er at sætte reaktionen (PCR rør eller tube) i fryseren.

Øvelse 2.c er **GMO-øvelse** og der skal derfor anvendes dækpapir på arbejdspladsen. Al affald skal smides i en autoklaveringspose til GMO-affald, og lokalet skal mærkes, inden øvelsen må påbegyndes. Til øvelsesdelen 2.c skal der forberedes kompetente *E. coli* celler. Underviseren bør gøre dette før øvelsen (skal startes senest dagen før øvelse 2.c udføres). Kompetente celler er celler, som kan optage DNA. *E. coli* bakteriecellerne gøres kompetente ved at behandle dem med en saltopløsning.

Baggrund

På <http://biosensor.dk> kan du finde videoer som beskriver, hvad der sker i øvelsen. Du kan også finde videoer, hvor du kan se, hvordan man udfører øvelserne i laboratoriet.

Figur 1 viser hvad der sker i løbet af de tre deløvelser. I øvelse 2.a klipper du dit detektions- og responsegen restriktionszymer. Et restriktionsenzym er et enzym, som kan genkende et bestemt stykke DNA. Forskellige restriktionszymer genkender forskellige DNA-sekvenser og klip-per forskelligt i DNA'et. Når de klippes, produceres "sticky-ends", som gør, at den ene af de to DNA-strenges er lidt længere end den anden. De to sticky-ends på responsegenet passer sammen med de to på detektionsgenet. Når I i øvelse 2.b tilsætter et enzym, som hedder DNA ligase, så limes de to gener sammen til et plasmid. Plasmidet indeholder de nødvendige genetiske dele, som gør at plasmidet kan dele sig inde i E. coli bakterien. Disse dele er: et replication origin, som er nødvendigt for at plasmidet kan blive i cellen, og et resistensgen, som gør E. coli bakterier, der indeholder resistensgenet, modstandsdygtige overfor antibiotikummet chloramphenicol.



Figur 1 Teoretisk gennemgang af Biosensor øvelsen. På figuren ser hvordan at du gennem de tre deløvelser klipper og samler de to DNA-fragmenter til et plasmid og til sidst laver din biosensor ved at transformere plasmidet ind i E. coli bakterien.

2.a Klipping af plasmid og gen med restriktionszymer = 2 timer

Til hver biosensor skal du have en tube, hvor du har klippet dit valgte gen med to restriktionszymer:

Responsegen: **XbaI** + **PstI**

Du skal også klippe detektorgenet med to forskellige restriktionszymer.

Detektorgen: **SpeI** + **PstI**

For at klippe generne skal der laves to såkaldte mastermix; et til responsgenet og et til detektorgenet.

Hvad er et mastermix?

Et mastermix er ligesom en portion pandekagedej. Det er besværligt at lave dej til én pandekage, da det ikke er nemt at tilsætte 1/10 æg. Det samme gælder for genteknologi. Hver reaktion indeholder 0.2 µL restriktionsenzym. Det er næsten umuligt at pipettere, medmindre man har en meget sensitiv pipette. Skal man lave 5 forskellige biosensorer eller er man 5 forskellige grupper, kan man derfor lave et mastermix til 5 reaktioner. Så skal man pipettere 1.0 µL enzym i stedet for 0.2 µL. Ulempen er, at der normalt aldrig er nok til 5 reaktioner. Ligesom pandekagedej, så sidder en del af dejen på skeen (her pipettespidsen) og går derfor tabt. Man skal derfor lave mastermix til n+1 reaktioner, hvor n er antallet af reaktioner. Når man laver et mastermix, skal man tilsætte alt undtagen DNA (husk at tilsætte enzymet til sidst) og pipettere 4 µL ud i en tube til hver gruppe.

Hvorfor skal restriktionszymerne inaktiveres?

I øvelse 2.b skal dit klippede responsgen blandes sammen med dit detektorgen. Hvis man ikke har inaktiveret restriktionszymerne inden, så kan responsgenet og detektorgenet ikke sætte sig sammen da restrictionenszymerne klipper de to gener fra hinanden så snart at du har sat sig sammen. Det betyder, at man ikke kan samle biosensoren.

Protokol:

Du skal bruge følgende dele fra Biosensor-kittet:

- Responsgen (find koordinat på <http://biosensor.dk>)
- Detektorgen (koordinat A1)
- NEB Buffer 2.1
- Fryseboks

Husk at restriktionsenzymene først skal **tages ud lige inden** de skal tilsættes. Opbevar dem på is eller i fryseboksen:

- Restriktionsenzym *XbaI*
- Restriktionsenzym *PstI*
- Restriktionsenzym *SpeI*

Du skal desuden bruge:

- Autoklaveret demineraliseret vand
- PCR tube eller 1.5 mL Eppendorf tube
- En varmeblok eller varmeskab indstillet til 37°C.
- (Hvis laboratoriet har en PCR-maskine, kan den med fordel bruges.)
- Pipetter og pipettespidser
- Is
- En centrifuge til at spinne væksen i din tube ned i bunden, så alle reagenserne bliver ordentligt blandet.
- Permanent marker

Fremgangsmåde:

1. Angiv hvilke koordinat du skal bruge:

Detektorgen: (I niveau 1 biosensor kittet findes kun ét detektorgen)

Responsgen:

2. Fyld en bøtte med is. Optø NEB Buffer 2.1 og tuben med dit valgte detektor- og responsgen på is. Det tager cirka 30 minutter.
3. Imens du venter, udregn hvor meget der skal tilsættes af hvert reagens til mastermixet. Husk at lave til én ekstra. Det skal i alt laves to mastermixes - et til responsgenet og et til detektorgenet. Vælg to grupper til at lave mastermix - én til hver mastermix. Udregn i tabellen herunder mængden af de forskellige reagenser i skal bruge i jeres mastermix.
4. **Grupper, som laver mastermix:** Markér et eppendorfrør så du ved at det er et mastermix - f.eks. med "Res MM" (for **Responsgen mastermix**) eller "Det MM". Tilsæt først vand og buffer til et eppendorfrør. Sæt låg på tuben og slå let på den for at blande. Man kan også blande ved at pipettere op og ned, men så risikerer man at danne en masse luftbobler. Stil restriktionsenzymerne på is. Pipetter enzymet. Enzymet er opløst i glycerol, så der sidder ofte også enzym på siden af pipettespidsen. (Husk at skifte pipettespids før du pipetterer det næste enzym!) Bland forsigtigt mastermixet ved at slå på tuben. Slut af med at centrifugere begge rør med mastermix ved 5000 RPM i 1 min **VIGTIGT** husk at rørene skal stå overfor hinanden.

Responsgen mastermix

Reagens	Volumen	Mastermix
ddH ₂ O	2.8 µL	
10x Buffer 2.1	0.8 µL	
PstI	0.2 µL	
XbaI	0.2 µL	
Total volumen	4.0 µL	

Detektorgen mastermix

Reagens	Volumen	Mastermix
ddH ₂ O	2.8 µL	
10x Buffer 2.1	0.8 µL	
PstI	0.2 µL	
SpeI	0.2 µL	
Total volumen	4.0 µL	

5. **Grupperne som laver mastermix:** Giv mastermixen til jeres lærer når I er færdige med dem, så kan de andre grupper hente det hos ham eller hende.
6. Hver gruppe pipetterer 4 μ L master-mix ud i en tube. Markér tuben med "R Gen" samt gruppenummer, så du kan genkende din tube fra de andre grupper.
7. Dernæst pipetterer hver gruppe 4 μ L detektionsgen mastermix ud i en tube. Markér tuben med "D gen", samt gruppenummer, så du kan genkende din tube fra de andre grupper.
8. Tilsæt 4 μ L af dit valgte responsgen fra biosensor kittet til tuben markeret med ResGen"
9. Tilsæt 4 μ L af detektionsgenet 1A fra biosensor kittet til tuben markeret med "D Gen"
10. Centrifuger begge tuber ved 5000 RPM i 1 min, HUSK at rørene skal stå overfor hinanden
11. **Klip generne** ved at inkubere eppendorfrørerne ved 37°C i en time.
12. **Inaktivér restriktionsenzymene** ved 80 °C i 20 minutter. Hvis I bruger en PCR-maskine, kan I derfor indstille et program. Hvis I ikke bruger en PCR-maskine kan I i stedet bruge et varmeskab eller en varmeblok. Sørg for at **låget** på tuben er **ordentligt lukket** ellers fordamper jeres reaktioner.
 - a. Efter inaktivering kan det se ud som om at det ikke er noget i jeres rør, men forsæt til næste step om se om er kommer noget.
13. Centrifuger begge tuber ved 5000 RPM i 1 min, HUSK at rørene skal stå overfor hinanden
14. Sæt eventuelle tuber fra biosensor kittet tilbage i kittet.

Gå direkte til øvelse 2.b eller opbevar dine rør med klippede gener på is eller i fryseren, indtil du starter øvelse 2.b. Mastermixen kan smides ud.

Spørgsmål til øvelsen (valgfrit):

1. Tegn genkendelsessekvensen for restriktionsenzym *PstI*, *XbaI* og *SpeI*

Du finder den på: <http://neb.com/>. Indtast navnet på restriktionsenzymet i søgefeltet i øverste højre hjørne. Fx er genkendelsessekvensen for *EcoRI*:

5'... G[▼]AATTC... 3'
3'... CTTAA[▲]G... 5'

Hjælp: For nogle enzymer findes der to versioner, fx EcoRI og EcoRI-HF. Nogle gange kommer restriktionsenzymer til at klippe forkert. HF står for High-Fidelity og betyder, at nogle forskere har modificeret enzymerne, så de ikke laver ligeså mange fejl. Genkendelsessekvensen er stadig den samme.

2. Hvilke to restriktionsenzymer (*PstI*, *XbaI*, *SpeI*) producerer sticky ends, som kan limes sammen? (Husk at A altid parrer med T, og C altid parrer med G).

3. Hvad betyder de her logoer?

Du kan finde logoet inde på et af restriktionsenzymerne. Prøv at klikke på det.

4. En ven har givet dig noget restriktionsenzym, men din ven kan ikke huske, om det er *PstI* eller *PstI-HF*. Hvilken buffer vil du vælge til din klipning?

Hjælp: Restriktionszymer er kun aktive, hvis de er i en bestemt buffer. NEB har 5 forskellige buffere: Buffer 1.1, 2.1, 3.1, 4.1 og CutSmart bufferen, som de fleste restriktionszymer er aktive i. Du kan se aktiviteten af dit restriktionsenzym ved at søge på restriktionsenzymet. Cirka halvvejs nede på siden står aktiviteten angivet.

2.b Ligering af plasmid

T4 DNA-ligase er et enzym, som limer DNA-stykker sammen. Enzymet kræver ATP, som er tilsat til bufferen. I denne øvelse ligerer du dit klippede responsgen og dit detektorgen sammen til et plasmid.

Protokol

Du skal bruge følgende dele fra Biosensor-kittet:

- T4 DNA-ligase buffer
- T4 DNA-ligase (Skal først tages ud af fryseren lige før den skal bruges)

Du skal desuden bruge:

- Dit klippede respons- og detektorgen fra øvelse 2a
- Autoklaveret demineraliseret vand
- PCR tube eller 1.5 mL Eppendorf tube
- Pipetter og pipettespidser
- Is
- Permanent marker

Fremgangsmåde:

1. Fyld en bøtte med is og tøm T4 DNA-ligase bufferen på is. Det tager cirka 30 minutter. Der er kun én tube buffer, så alle grupper skal deles om tuben. Når I giver tuben til en ny gruppe, så skal gruppen medbringe deres isboks, så tuben er på is hele tiden.
2. Bland følgende reagenser sammen i den rækkefølge, som de er angivet; i skemaet under. Tag T4 DNA-ligasen ud af fryseren lige før du skal bruge den. Transportér den i den lille fryseboks eller på is og stil den tilbage, så snart du er færdig med den.

Reagens	Reaktion
ddH ₂ O	5.5 µL
T4 DNA-ligase buffer	2.0 µL
Klippet detektorgen	4.0 µL
Klippet responsgen	8.0 µL
T4 DNA-ligase	0.5 µL
<hr/>	
Total volumen	20.0 µL

3. Centrifuger begge tuber ved 5000 RPM i 1 min, HUSK at rørene skal stå overfor hinanden
4. **Lim genet ind i plasmidet** ved at lade reaktionen stå ved stuetemperatur på bordet i 30 minutter. Enzymet er aktivt ved stuetemperatur, men den optimale aktivitet er ved 16°C. Reaktionen kan evt. sættes i en PCR-maskine.
5. I mellem tiden kan I smide jeres to rør med det klippende respons- og detektionsgen ud i laboratorie affald.
6. Fortsæt derefter direkte til transformationen (del 2.c) eller opbevar liggeringen i fryseren ved -20°C indtil næste øvelsesdag.

2.c Transformation

GMO-øvelse: I denne del af øvelsen arbejdes der med GMO. Arbejdspladsen skal derfor dækkes med papir, alt affald skal i en autoklaveringspose til GMO-affald, og øvelseslokalet skal mærkes.

Obs! Denne del af øvelsen kræver, at de kompetente *E. coli* bakterieceller er klar. Dette tager 2 dage. Den øvelsesansvarlige bør stå for eksperimentet. Protokollen findes på www.biosensor.dk/laerer/vejledninger/. Cellerne kan forberedes lang tid inden (flere måneder) og opbevares ved -80 °C. Der skal desuden forberedes sterile LB agarplader med chloramphenicol og sterilt SOC eller LB medie til forsøget (se www.biosensor.dk/laerer/vejledninger/).

Efter at plasmidet er ligeret sammen, er det nu klart til at blive transformeret ind i *E. coli* bakterieceller. Plasmidet kommer ind i cellerne vha. et kort heat shock ved 42 °C. I langt de fleste tilfælde kommer plasmidet dog ikke ind i cellerne – derfor er der millioner af celler i hver tube. For at være sikker på, at det kun er de celler, som har fået plasmidet ind, som kan gro, anvender man selektion. Dit biosensor plasmid indeholder et gen, som gør cellerne resistente over for antibiotikummet chloramphenicol. Transformationen plades derfor på agarplader med chloramphenicol.

Hver gruppe skal lave tre transformationer: biosensoren samt en positiv og en negativ kontrol. Den positive kontrol er et plasmid med et rødt farvegen (faktisk det samme som findes i responsegen 5A). Hvis der er gået noget galt i øvelse 2.a eller 2.b, vil man stadig få kolonier for den positive kontrol. I en negativ kontrol tilsætter man ikke DNA. Derfor bør disse celler ikke kunne gro på LB plader med antibiotikum i. Denne kontrol laves for at være helt sikker på dine agarplader dræber de bakterier som ikke har biosensor plasmidet i sig.

Protokol

Du skal bruge følgende dele fra Biosensor-kittet:

- Positiv kontrol plasmid (PosCtr)
- Flyder til tuber

Du skal desuden bruge:

- 1 tube med ca. 75 μ L kompetente *E. coli* celler (se lærervejledning)
- Din biosensor ligering fra øvelse 2.b
- 3 LB agarplader med 10 μ g/mL chloramphenicol
- Sterilt SOC eller LB medie (se lærervejledning)
- Pipetter og pipettespidser
- Is
- Vandbad eller varmeblok indstillet til 42°C
- Drigalskyspatel
- Bunsenbrænder
- Permanent marker

Fremgangsmåde:

Dag 1:

1. Klargør din arbejdsplads. Læg papir på arbejdspladsen og opstil en autoklaveringspose til GMO-affald. Lokalet skal være mærket.
2. **Det er meget vigtigt, at de kompetente celler altid er på is indtil trin 11.**
3. Hver gruppe skal bruge 1 tube med kompetente celler (75 μ L). Hvis cellerne er forberedt inden, tag cellerne ud af fryseren og stil dem direkte på is.
4. Optø cellerne langsomt på is (tager cirka 5 minutter)
5. Marker tre tuber med "Biosensor", "Negativ kontrol" og "Positiv kontrol". Husk også gruppenummer.
6. Sæt disse tre tuber på is
7. Tilsæt 25 μ L kompetente celler til hver af de tre tuber
8. Tilsæt 5 μ L af den ligerede biosensor (fra øvelse 2.c) til tuben markeret med "Biosensor".
9. Tilsæt også 1.0 μ L af det positive kontrol-plasmid (PosCtr fra Biosensor kittet) til tuben "positiv kontrol".
10. Der skal IKKE tilsættes noget til tuben markeret med "Negativ kontrol"
11. Mix forsigtigt DNA og celler ved at rulle de tre tuber rundt i luften. Undgå at holde på bunden af tuben, hvor cellerne er. Så varmer du dem op. **Stil straks cellerne tilbage på is.**
12. Lad cellerne stå på is i 15 minutter. I mens du venter så fortsæt til step 13.
13. Varm varmeblokken eller vandbad op til 42°C.
14. Når de 30 minutter er gået, flyt alle tuberne til vandbadet/varmeblokken i nøjagtig 30 sekunder.
15. Tag straks rørene op af varmeblokken og placér dem på is i 5 minutter.
16. Pipettér 250 μ L sterilt SOC eller LB medie ud i hver tube.
17. Inkubér transformationen ved 37°C i 2-3 timer for at give *E. coli* cellerne tid til at udtrykke antibiotika-resistensgenet. Cellerne bør inkuberes i 2 timer, hvis de inkuberes under ryst. Ellers bør de inkubere i 3 timer for at sikre sig, at cellerne er begyndt at udtrykke resistens-genet.
18. Mens I venter kan I navngive jeres tre LB plader med chloramphenicol således:
 - a. Biosensor + LB cam + dato + grupper navn/nummer
 - b. Positiv kontrol + LB cam + dato + grupper navn/nummer
 - c. Negativ kontrol + LB cam + dato + grupper navn/nummer

19. Jeres LB plade uden chloramphenicol navngiver I:
 - a. Negativ kontrol + LB + dato + grupper navn/nummer
20. Tænd bunsenbrænderen. I de næste steps arbejde tæt på bunsenbrænderen, så udpladningen af celler foregår sterilt.
21. Ryst forsigtigt tuben, så cellerne og SOC/LB-mediet er blandet.
22. Pipetter 100 μ L af cellerne ud på den tilhørende agarplade.
23. Dyp spatelen i ethanol og hold den ind under bunsenbrænderen. Tag den ud, så den kan køle af. Tryk den forsigtigt ned på agarpladen et sted, hvor der ikke er celler, så du er sikker på, at den er kold. Hvis den stadig er meget varm, vil alle cellerne dø. Brug så spatelen til at plade cellerne ud over hele pladen. Du kan holde låget til petrisålen tæt over pladen, så du mindsker risikoen for kontaminering.
24. **Husk** at celler fra tuben markeret med "Negativ kontrol" skal udplades på 2 plader (både med og uden chloramphenicol).
25. Lad pladerne tørre tæt på bunsenbrænderen med låget halvt af.
26. I mellem tiden kan du rydde din arbejdsstation op: de tre tuber med biosensor, positiv og negativ kontrol kan du smide ud. Desuden kan du sætte pipetter, pipettespidser, bunsenbrænder, sprit og eppendorfrør på plads. Når du er færdig med at rydde op kan du fortsætte til næste step. **OBS** vent med at fjerne dækpapiret til at du har fjernet agarpladerne fra bordet.
27. Når pladerne er tørre vend dem rundt, så bunden er opad og put dem i en pose. Inkuber plasticposen ved 37°C til næste dag eller alternativt ved stuetemperatur på labbenken i 3 dage.

Dag 2:

1. Kig på dine plader. Tæl antallet af kolonier på pladen med biosensor og pladen med den positive kontrol og indfør numrene i skemaet under. Den positive kontrol er rød, da den indeholder et farvegen. På de to plader med negativ kontrol celler skal I blot se om der er vækst eller ej og notere det nedenfor. Det skal gerne være sådan at det er vækst LB pladen uden cam, mens at der ikke er vækst på LB pladen med cam.

Plade	Antal kolonier
Biosensor + LB Cam	
Positiv kontrol + LB Cam	
	Vækst (Ja/Nej)
Negativ kontrol + LB cam	
Negativ kontrol + LB	

2. Opbevar pladerne med kolonier i en tillukket pose i køleskabet. Husk at agaren skal vende opad. Det forhindrer at pladerne udtørres. Når du er færdig med forsøget alle agarpladerne og posen smides ud i GMO affald.

Spørgsmål til øvelsen

1. Hvordan ser kolonierne ud for din biosensor? (Er de farvede? Hvorfor er de farvede?)

2. Hvorfor tilsætter man antibiotika til agarpladerne? (Hvordan tror du, at pladerne ville se ud, hvis der ikke var antibiotika på?)

3. Hvis der er både er røde og hvidgullige kolonier på den positive plade, hvad betyder det så? (Man bør altid lave en positiv/negativ kontrol, så man ved om ens eksperiment virker)

3. Test af biosensor - Valgfri øvelse

GMO-øvelse: I denne del af øvelsen arbejdes der med GMO. Arbejdspladsen skal derfor dækkes med papir, alt affald skal i en autoklaveringspose til GMO-affald, og øvelseslokalet skal mærkes.

Du kan allerede næste dag se, om din biosensor virker. Biosensoren virker, hvis dine kolonier er farvede. De forskellige farvegener er ikke altid lige hurtige til at udvikle farven. Du kan læse om dit farvegen på biosensor hjemmesiden. Du kan også læse andre gruppers rapporter og se, hvornår de så farven. Nogle farvegener skal aktiveres af UV-lys. UV-lys kan være skadeligt, derfor skal du have beskyttelsesudstyr på efter samme forholdsregler, som når man tager billeder af DNA/agarosegeler. Enzymerne i kittet er "tagget" med et grønt farvegen. Det betyder, at du også næste dag kan se, om din biosensor har virket, men da du har valgt et enzym kan du bagefter teste enzymet. Du kan læse mere under hvert enzym på biosensor-hjemmesiden.

Obs! Denne del af forsøget er valgfrit. Det er ikke nødvendigt at teste din biosensor, men denne del af projektet giver dig også mulighed for at være kreativ. Har du en god idé til, hvordan man let kan måle?

Protokol til vækstforsøg og måling af absorbans måling og/eller enzymaktivitet

Du skal bruge følgende fra kittet:

- Antibiotikummet chloramphenicol (1% i ethanol)

Derudover skal du bruge:

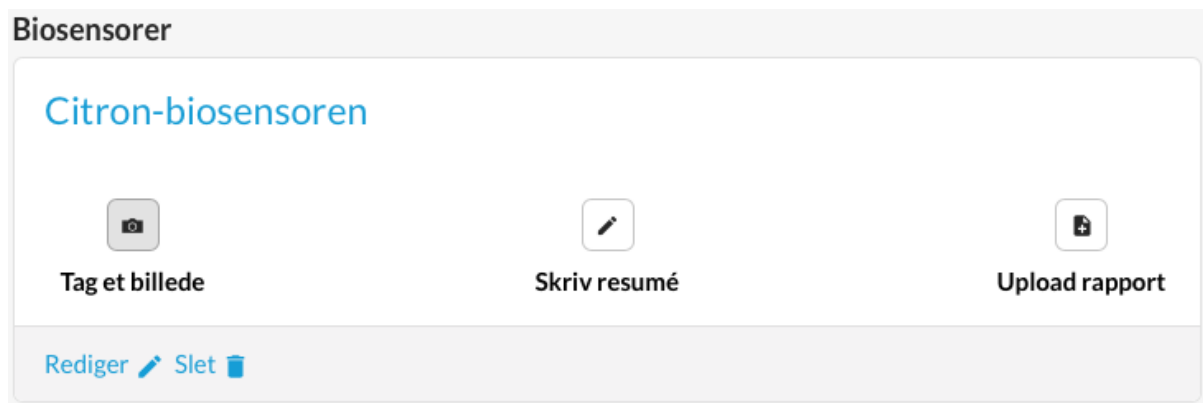
- Plastik falcon tube eller glastube til dyrkning af E. coli celler
- LB medium
- Sterile podenåle eller autoklaverede tændstikker
- Pipetter og pipettespidser
- Permanent marker

Protokol til vækstforsøg

1. Klargør din arbejdsplads. Læg papir på arbejdspladsen og opstil en autoklaveringspose til GMO-affald. Lokalet skal været mærkes. Tænd bunsenbrænderen.
2. Tilsæt LB medium og chloramphenicol til væksttuben. 5 mL kultur er nok til enzymassay, men hvis du også skal måle absorbans, er det bedre at have rigeligt med celler. Opvoks derfor en kultur på 10 mL. Du skal tilsætte chloramphenicol til en koncentration på 10 µg/mL. Det svarer til 10 µL 1% chloramphenicol i 10 mL.
3. Udtag med en steril tandstik eller podenål en koloni og tilsæt den til vækstmediet. Luk tuben.
4. **Kun til måling af absorbans:** Tag 1 mL kultur ud til måling af absorbans. Mål med det samme. Dette er nulprøven ved 0 timer. Husk at bruge 1 mL LB medium til at nulstille spektrofotometeret med.
5. Inkubér tuben ved 37°C under rystning/omrøring.
6. Tag prøver hver time. Husk, at når absorbansen er over 1.2, skal du fortynde kulturen for at få en nøjagtig måling. Du kan måle, hvor hurtigt bakterierne vokser ved at måle absorbansen ved 600 nm.
7. Efter endt forsøg skal alle prøver hældes i en glasflaske til GMO-affald. Flasken skal autoklaveres.

4. Dokumentér

Når du er færdig med eksperimentet skal du lægge et billede op af din biosensor (eller et billede fra dit forsøg) samt et kort resumé. Du kan desuden vælge at lægge en rapport eller forsøgsprotokol, som du afleverer til din lærer, op. Dette er dog helt valgfrit. Hvis du vælger at gøre det, har du mulighed for at deltage i biosensor-konkurrencen (du vælger selv om du vil deltage) samt om andre elever må læse din rapport. Husk at fjerne cpr-nummer eller anden information fra din rapport. Spørg din/jeres lærer, så I er sikre.



Selvom dette er den sidste del af øvelsen og det kan være nemt at springe den over, så er denne del faktisk den vigtigste. Andre elever, lærere og gymnasier kan nemlig bruge dine resultater og gode idéer til deres egne projekter. På denne måde håber Biotech Academy, at landets gymnasier kan dele deres opfindelser, opdagelser og interessante projekter.

Er du i tvivl om, hvad du skal skrive, kan du finde inspiration i allerede uploadede rapporter på <http://biosensor.dk>. Du kan finde svarerne til spørgsmålene fra øvelsen på: <http://biosensor.dk/elev/loesninger/>.

Til sidst håber vi, at du selvfølgelig vil uploade billeder af din biosensor på andre sociale medier og at du gerne vil være med til at udbrede øvelsen. Du kan bruge tag **#biosensor** og **#biotechacademy**.