

Opdateret d. 17. august 2017



# 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/laerervejledning/>

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](mailto: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  $-80^{\circ}\text{C}$   
Godkendt K12 stamme til brug i øvelsen. Cellerne er opløst i 15% glycerol. Det er bedst at opbevare dem ved  $-80^{\circ}\text{C}$ , men de kan let holde sig i flere år ved  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- **BioBricks** (biosensor gener) – opbevares ved  $-20^{\circ}\text{C}$   
Plasmid og genet findes alle i 1.5 mL tuber. Tuberne er markeret med et bogstav (A-H) efterfuldt af et tal (1-12).
- **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.
- **10 mg/mL chloramphenicol (1%) opløst i 96% ethanol** – opbevares ved  $-20^{\circ}\text{C}$   
Antibiotika til selektion af *E. coli* biosensor-transformanter. *E. coli* stammen, som er udsendt, er ikke resistent.
- **Fryseboks**
- **DNA primere** – opbevares ved  $-20^{\circ}\text{C}$   
Disse kan bruges til at lave mere af en BioBrick, hvis man løber tør.

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 restriktionsenzymmer** 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.
- **Flyder til vandbad**

Kittet skal opbevares ved -20°C. Når kloningsenzymmerne tages ud af fryseren, skal de **altid** opbevares på is eller i den lille fryseboks, som følger med i kittet. Tag først kloningsenzymmerne ud, lige før de skal tilsættes. Kloningsenzymmerne skal altid tilsættes som det sidste. Når kloningsenzymmerne er tilsat, bør de straks sættes tilbage i fryseren. Bufferne til kloningsenzymmerne skal tøs på is. Tag dem ud cirka 30 minutter, før du skal bruge dem. Bufferne til kloningsenzymmerne 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. Løber I tør for en biosensor-del (BioBrick), er det muligt at lave mere af delen vha. PCR. Der skal som minimum være 0.5 µL BioBrick tilbage, som skal bruges som template til PCR, så sørg altid for, at der er lidt tilbage i tuben, når I er færdige. Ønsker I at lave mere end 200 biosensorer, skal I bruge mere af T4 DNA-ligase. På projektets hjemmeside kan I finde guide til, hvordan dette kan bestilles.

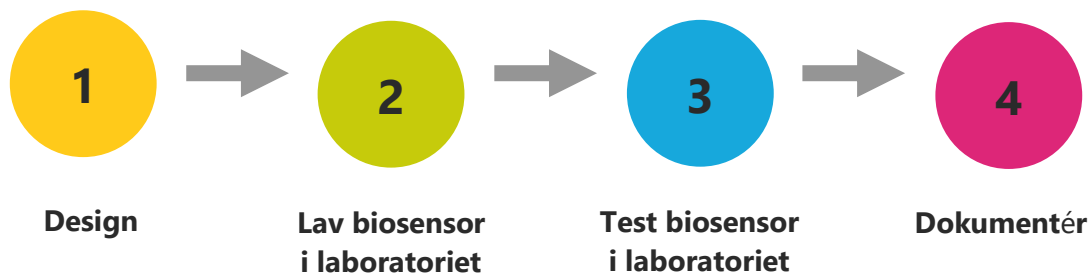
## Biosensor-øvelsen

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/>

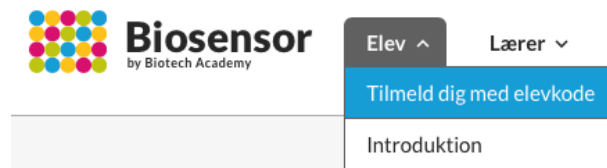
I biosensor niveau 1 øvelsen skal du lave en biosensor, som altid er tændt. Det betyder, at dine *E. coli* bakterier altid udtrykker det gen, som du sætter ind i dem. Hvis du sætter et gen ind, som producerer et blåt farvestof, så bliver dine celler blå. Hvis du sætter et laktose-nedbrydende enzym ind, så kan dine bakterier gro på laktose (mælkesukker). Du vælger selv blandt de 25 gener, hvilket gen, du har lyst til at arbejde med.



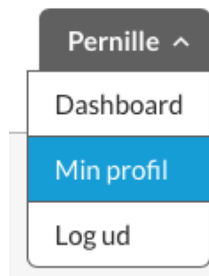
## 1. Design biosensor

### 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).

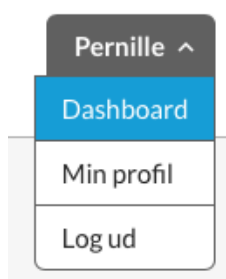
Hvert gen kommer i en tube, som er markeret med et bogstav (A-H) efterfulgt af et tal (1-12). Det kan være en god idé at se, om der allerede er nogle andre, som har lavet en biosensor, som har det samme gen, som du har valgt. Du kan nemlig bruge andre elevers rapporter som inspiration til, hvordan du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

sensor, som allerede er lavet før. Du kan se alle biosensorer, som er færdige i BioBrick Exploreren på forsiden.

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

### 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".



### Gruppe 1

Biotech Academy BA-klasse årgang 2014 fra Biotech Academy

#### Biosensorer

*Din gruppe har ingen biosensorer*

[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 anti-biotika 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 gen med restriktionszymer</u>	<b>2 timer</b>
2.b	<u>Ligering af plasmider</u>	<b>1.5 time</b>
2.c	<u>Transformation af <i>E. coli</i> (GMO protokol)</u>	<b>3 timer</b>

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.

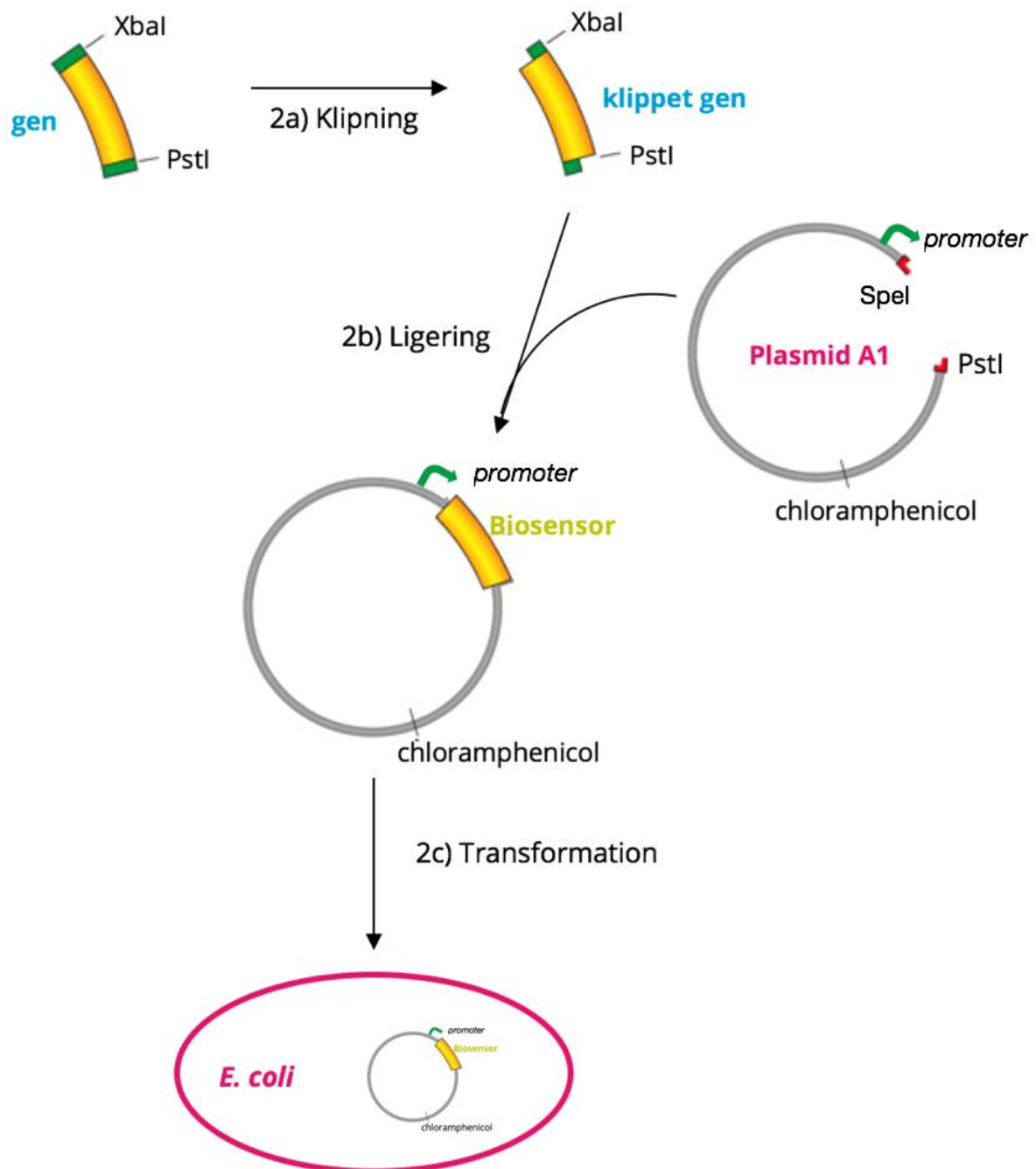
Øvelse 2.c er **GMO-øvelse** og der skal derfor anvendes dækpapir på arbejdspladsen. Al affald skal smides i en autoklaveringspose til GMO-affald, og lokalet skal mærkes, inden øvelsen må påbegyndes. Til øvelsesdelen 2.c skal der forberedes kompetente *E. coli* celler. Underviseren bør gøre dette før 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.

Figuren på næste side viser, hvad der sker i øvelsen. I øvelse 2.a klipper du dit gen med to forskellige restriktionszymer. Et restriktionsenzym er et enzym, som kan genkende et bestemt stykke DNA. Forskellige restriktionszymer genkender forskellige DNA-sekvenser og klipper forskelligt i DNA'et. Når de klippes, produceres "sticky ends", som gør, at den ene af de to DNA strenge er lidt længere end den anden. De to forskellige sticky ends passer ind i

plasmidet, som tilsættes i øvelse 2.b. Når man i øvelse 2.b tilsætter et enzym, som hedder DNA ligase, så limes genet ind i plasmidet. 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.



## 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:

Gen: **XbaI** + **PstI**

**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 pipettespidisen) 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 gen blandes sammen med et plasmid. Hvis man ikke har inaktiveret restriktionszymerne inden, så klipper *XbaI* i plasmidet. Det betyder, at man ikke kan samle biosensoren.

## Protokol:

Du skal bruge følgende dele fra Biosensor-kittet:

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

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

- Restriktionsenzym *XbaI*
- Restriktionsenzym *PstI*

Du skal desuden bruge:

- Autoklaveret demineraliseret vand
- PCR tube eller 1.5 mL Eppendorf tube
- En varmeklok 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.

## Fremgangsmåde:

1. Angiv hvilke koordinat du skal bruge:

**Gen:**                     

2. Fyld en bøtte med is. Optø NEB Buffer 2.1 og tuben med dit valgte gen 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. Vælg en gruppe, som laver mastermixet.
4. **Gruppen, som laver mastermix:** Tilsæt først vand og buffer. 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 restriktionsenzymene i den lille fryseboks, som medfølger (eller 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.

Reagens	Volumen	Master-mix
ddH <sub>2</sub> O	2.8 µL	
10x Buffer 2.1	0.8 µL	
Gen	4.0 µL	
PstI	0.2 µL	
XbaI	0.2 µL	
Total volumen	8.0 µL	

5. Hver gruppe pipetterer 4 µL master-mix ud i hver sin tube. Markér tuben med "G/gen" samt gruppenummer, så du kan genkende din tube fra de andre grupper.
6. Tilsæt 4 µL af dit gen til tuben markeret med "G/gen"
7. **Klip genet** ved at inkubere tuben ved 37°C i en time.



8. **Inaktiver 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.
9. Spin indholdet i tuben ned, så al væsken er i bunden.

Gå direkte til øvelse 2.b eller opbevar din tube med gen 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'...GAATTC...3'  
3'...CTTAAG...5'
```

*Hjælp: For nogle enzymer findes der to versioner, fx EcoRI og EcoRI-HF. Nogle gange kommer restriktionsenzymet 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 restriktionsenzym (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 restriktionsenzymene. 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: Restriktionsenzymet 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 restriktionsenzymet 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.

### **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 gen fra øvelse 2a
- Plasmid (BioBrick A1)
- Autoklaveret demineraliseret vand
- PCR tube eller 1.5 mL Eppendorf tube
- Pipetter og pipettespidser
- Is

### Fremgangsmåde:

1. Fyld en bøtte med is og tøj T4 DNA-ligase bufferen og plasmidet A1 på is. Det tager cirka 30 minutter. Der er kun én tube af hver, 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 <sub>2</sub> O	5.5 µL
T4 DNA-ligase buffer	2.0 µL
Plasmid A1	4.0 µL
Klippet gen	8.0 µL
T4 DNA-ligase	0.5 µL
Total volumen	20.0 µL

3. **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.
4. Fortsæt derefter direkte til transformationen (del 1.d) eller opbevar legeringen 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 i lærervejledningen. Cellerne kan forberedes lang tid inden (flere måneder) og opbevares ved  $-80^{\circ}\text{C}$ . Der skal desuden forberedes sterile LB agarplader med chloramphenicol og sterilt SOC medie til forsøget (se lærervejledningen).

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  $42^{\circ}\text{C}$ . 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. Plasmidet pSB1C3 indeholder et gen, som gør cellerne resistente over for antibiotikummet chloramphenicol. Transformationen plades derfor på agarplader med chloramphenicol.

Hver gruppe skal lave to transformationer: biosensoren samt en positiv kontrol. Den positive kontrol er et plasmid med et rødt farvegen. Hvis der er gået noget galt i øvelse 2.a eller 2.b, vil man stadig få kolonier for den positive kontrol. Hvis man får hvide kolonier på den positive kontrol, så ved man er noget er gået galt. Den positive kontrol fungerer derfor også som en negativ kontrol. Man kan derfor spare på de kompetente celler, da de tager lang tid at lave. Hvis man har ekstra celler eller ønsker det, er det selvfølgelig muligt også at lave en negativ kontrol. Det er altid en god praksis. Transformationen er den samme for den negative kontrol, dog skippes trin 6 i forsøgsprotokollen.

**Biosensor:** Din legering fra øvelse 2.b

**Positiv kontrol:** Positiv kontrol (plasmid) H12

## Protokol

Du skal bruge følgende dele fra Biosensor-kittet:

- Den positive kontrol er i brønd **H12** (nederste højre hjørne)
- Flyder til tuber

Du skal desuden bruge:

- 2 tuber med kompetente *E. coli* celler (se lærervejledning)
- Din biosensor (øvelse 2.b)
- 2 LB agarplader med 10 µg/mL chloramphenicol
- Sterilt SOC medie (se lærervejledning)
- Pipetter og pipettespidser
- Is
- Vandbad eller varmeblok indstillet til 42°C
- Drigalskyspatel
- Bunsenbrænder

## 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 2 tuber med kompetente celler (50  $\mu$ L i hver). 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 tuberne med "Biosensor" og "positiv kontrol". Husk også gruppenummer.
6. Tilsæt 5  $\mu$ L af den legerede biosensor (fra øvelse 2.c) til tuben markeret med "Biosensor".
7. Tilsæt også 1.0  $\mu$ L af det positive kontrol-plasmid til tuben "positiv kontrol".
8. Mix forsigtigt DNA og celler ved at rulle tuben rundt i luften. Undgå at holde på bunden af tuben, hvor cellerne er. Så varmer du dem op. **Stil straks cellerne tilbage på is.**
9. Lad cellerne stå på is i 30 minutter. I mens du venter så fortsæt til step 10.
10. Varm varmeblokken eller vandbad op til 42°C.
11. Når de 30 minutter er gået, flyt alle tuberne til vandbadet/varmeblokken i nøjagtig 30 sekunder.
12. Tag straks rørene op af varmeblokken og placér dem på is i 5 minutter.
13. Pipettér 950  $\mu$ L sterilt SOC medie ud i hver tube.
14. 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.
15. Tænd bunsenbrænderen. I de næste steps arbejde tæt på bunsenbrænderen, så udpladningen af celler foregår sterilt.
16. Ryst forsigtigt tuben, så cellerne og SOC-mediet er blandet. Pipettér 200  $\mu$ L af cellerne ud på en agarplade med 10  $\mu$ g/mL chlorampenicol. Husk at navngive pladerne (bunden af pladerne), så du kan kende forskel.
17. 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 sik-

ker 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 petriskålen tæt over pladen, så du mindsker risikoen for kontaminering.

18. Lad pladerne tørre tæt på bunsenbrænderen med låget halvt af.
19. Når pladerne er tørre vend dem rundt, så bunden er opad og put dem i en pose. Inkubér plasticposen ved 37°C til næste dag eller alternativt ved stuetemperatur på labbænken i 3 dage.

### Dag 2:

1. Kig på dine plader. Tæl antallet af kolonier på hver af de tre plader og indfør numrene i skemaet under. Den positive kontrol er rød, da den indeholder et farvegen. Du skal tælle, hvor mange røde og hvor mange hvide kolonier, der er på den positive kontrol. Er dit valgte gen ikke et farvestof, skal du dyrke kulturen for at udtrykke og teste dit enzym. Du kan læse mere om det længere nede.

	<b>Antal kolonier</b>
<b>Biosensor</b>	
<b>Positiv kontrol</b>	

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.

Hvis du har valgt en lugt (banan eller lime), så er du nødt til at opvokse dine kolonier i en kultur. Det gør du ved at tilsætte lidt af en koloni til en LB kultur 3 - 10 mL og inkubér den til næste morgen. Husk at kulturen er GMO, så du skal arbejde sterilt og autoklavere kulturen bagefter. Du kan finde vejledninger til dyrkning af bakteriekultur på biosensor-hjemmesiden <http://biosensor.dk/elev/forsoegsvejledning/>

### **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

**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 grupperes 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 vækstofforsøg og måling af absorbans måling og/eller enzymaktivitet**

Du skal bruge følgende fra kittet:

- Antibiotikummet chloramphenicol (1% i ethanol)

Derudover skal du bruge:

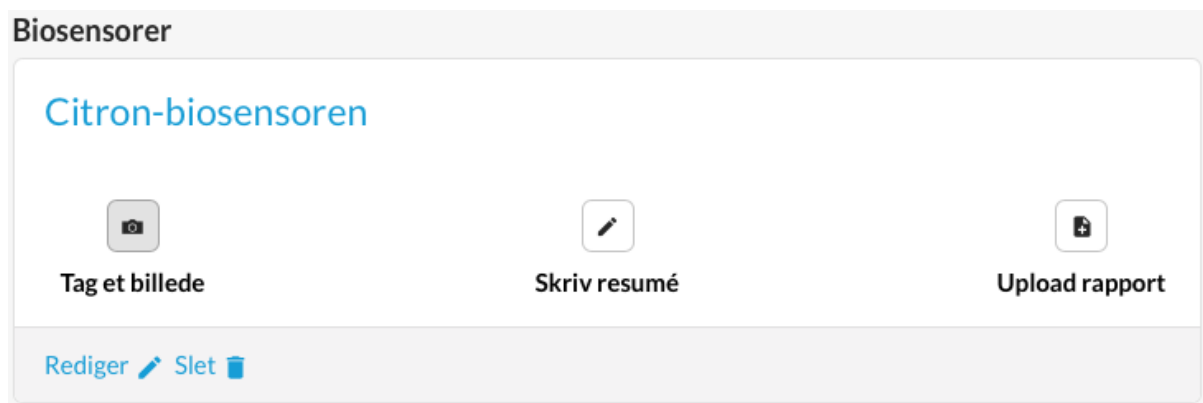
- Plastik falcon tube eller glastube til dyrkning af E. coli celler
- LB medium
- Sterile podenåle eller autoklaverede tændstikker
- Pipetter og pipettespidser

## Protokol til vækstforsøg

1. Klargør din arbejdsplads. Læg papir på arbejdspladsen og opstil en autoklaveringspose til GMO-affald. Lokalet skal være mærket. Tænd bunsenbrænderen.
2. Tilsæt LB medium og chloramphenicol til væksttuben. 5 mL kultur er nok til enzym-assay, 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**.