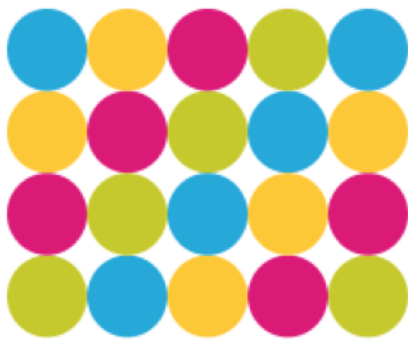




Biotech Academy



Biosensor

Case 2

Øvelsesvejledning

novo nordisk fonden

novozymes® 
Rethink Tomorrow

 NEW ENGLAND
BioLabs®

 BioNordika
YOUR SCIENTIFIC SUPPLIER

 **SnapGene**®
Software for molecular biology

 OTTO MØNSTEDS FOND

LUNDBECKFONDEN

Indholdsfortegnelse

| | | |
|----------|--|----------|
| 1 | Indledning | 1 |
| 2 | Protokol A - Transformation | 2 |
| 2.1 | Lærerforberedelse | 2 |
| 2.2 | Materialer: | 2 |
| 2.3 | Fremgangsmåde: | 3 |
| 2.4 | Opgaver | 5 |
| 3 | Protokol B - Test af Biosensor ved renstrygning | 6 |
| 3.1 | Lærer forberedelse | 6 |
| 3.2 | Materialer | 6 |
| 3.3 | Fremgangsmåde | 7 |
| 3.4 | Opgaver | 9 |

1 Indledning

Velkommen til Biotech Academy's Biosensor Case 2

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.

Vi har hos Biotech Academy produceret et Biosensor plasmid som under tilstedeværelse af acetylsalicylsyre (hvilket er et stof i smertestillende medicin såsom Treo) kan reagere ved at frembringe en lilla farve. I Biosensor Case 2 øvelsen får I denne øvelse mulighed for at lære at arbejde med GMO organismer da du skal transformere et plasmid ind i en bakterie. Efterfølgende skal du teste om din biosensor virker som forventet ved at lade Biosensoren vokse på medie hvor der er tilsat acetylsalicylsyre.

For at læse mere omkring Biosensor og teorien bag Biosensor Case 2 kan du besøge: <http://biosensor.dk>.

Vi håber, at det bliver sjovt og at du måske 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.

God fornøjelse!

Hilsen Viktor og Chrysillis 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.

2 Protokol A - Transformation

Denne øvelse går ud på at transformere et biosensor plasmid ind i en *E.coli* bakterie.

Plasmidet kommer ind i cellerne vha. et kort varmeshock ved 42°C. I langt de fleste tilfælde kommer plasmidet dog ikke ind i cellerne – derfor er der millioner af celler i hvert rør. 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 antibiotikumet kloramfenikol. Transformationen plades derfor på agarplader med kloramfenikol. Hver gruppe skal lave to transformationer: biosensoren samt en negativ 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.

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.

2.1 Lærerforberedelse

Der skal forberedes sterile LB agarplader med kloramfenikol og LB medie til forsøget (se https://biosensor.dk/wp-content/uploads/2019/09/1_rer_vejledning.pdf)

VIGTIGT Et par dage før øvelsen skal der forberedes *E. coli* celler. I Biosensor kittet findes et rør med *E. coli DH5α* celler. Udstreg *E. coli* cellerne på en LB agarplade og inkubér pladen ved 37°C natten over.

2.2 Materialer:

- 50 mM CaCl₂ (Opløst i vand)
- 1 mL Flydende LB medie
- 1 LB agarplader
- 2 LB agarplader med 10 µg/mL kloramfenikol
- LB agarplade med *E. coli DH5α* (Som din lærer har klargjort)
- Biosensor plasmid Case 2 (Findes i Biosensor Case kittet)
- Sterilt vand
- Eppendorf rør
- Pipettespidser og pipetter
- Flyder til eppendorfrør

- Et isbad med is
- Varmebad eller varmeblok indstillet til 42°C
- Drigalskyspatel
- Bunsenbrænder
- Permanent marker

2.3 Fremgangsmåde:

Dag 1:

1. Klargør din arbejdsplads. Læg papir på arbejdspladsen og opstil en autoklaveringspose til GMO-affald. Lokalet skal være mærket til GMO-øvelse.
2. Skriv: "Biosensor" og gruppe nummer på et eppendorfrør.
3. Skriv: "Negativ kontrol" og gruppe nummer på et andet eppendorfrør.
4. Tilsæt 250 μL 50 mM CaCl_2 til de 2 eppendorfrør.
5. Find LB agarplade med *E. coli* kolonier som din lærer har forberedt.
6. Tag én koloni fra pladen med en pipettespids og dyb den i et af dine eppendorfrør med CaCl_2 i.
7. Gentag step 6 for det andet eppendorfrør med CaCl_2 .
8. Tilsæt 5 μL Biosensor plasmid til dit "Biosensor" eppendorfrør.
9. Tilsæt 5 μL sterilt vand til dit "Negativ kontrol" eppendorfrør.
10. Sæt rørene i et dit isbad og vent 10 minutter.
11. Mens at du venter kan du sikre dig at varmeblokken eller varmebadet er indstillet til 42°C.
12. Sæt dine 2 rør i varmeblokken eller varmebadet i 60 sekunder.
13. Sæt rørene i et dit isbad og vent 2 minutter.
14. Tilsæt 250 μL flydende LB medie til hver af de 2 eppendorfrør.
15. Inkubér de 2 eppendorfrør i et varmeskab ved 37°C i 2 timer.
16. Mens I venter kan I navngive jeres to LB plader med kloramfenikol således:
 - (a) Biosensor + LB kloramfenikol + dato + grupper navn/nummer.
 - (b) Negativ kontrol + LB kloramfenikol + dato + grupper navn/nummer.
17. Jeres LB plade uden kloramfenikol navngiver i:

- (a) Negativ kontrol + LB + dato + grupper navn/nummer.
18. Når I har navngivet jeres agarplader kan I gå i gang med supplementsopgaverne som findes https://biosensor.dk/wp-content/uploads/2019/08/supplement_opgaver_case2.pdf.
19. Tænd bunsenbrænderen. I de næste steps arbejdes der tæt på bunsenbrænderen, så udpladningen af celler foregår sterilt.
20. Ryst forsigtigt røret, så cellerne og LB-mediet er blandet.
21. Pipettér 250 µL af cellerne ud på den tilhørende agarplade.
22. Dyp drigalskispåtalen 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 petriskålen tæt over pladen, så du mindsker risikoen for kontaminering.
- (a) Husk at celler fra røret markeret med "Negativ kontrol" skal der udplades på 2 plader (både med og uden kloramfenikol).
23. Lad pladerne tørre tæt på bunsenbrænderen med låget halvt af.
24. I mellem tiden kan du rydde din arbejdsstation op:
- (a) De to rør med biosensor og negativ kontrol kan du smide ud som GMO-affald.
- (b) 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.
- (c) OBS vent med at fjerne dækpapiret til at du har fjernet agarpladerne fra bordet.
25. Når pladerne er tørre vend dem rundt, så bunden er opad og put dem i en pose.
26. Inkubér plasticposen ved 37°C til næste dag.

Dag 2:

1. Kig på dine plader.
2. Tæl antallet af kolonier på pladen med biosensor indfør numrene i skemaet under.
 - (a) 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 kloramfenikol, mens at der ikke er vækst på LB pladen med kloramfenikol.
3. Opbevar pladerne med kolonier i en tillukket pose i køleskabet. Husk at agaren skal vende opad. Det forhindrer at pladerne udtørres.
4. Når du er færdig med forsøget alle agarpladerne og posen smides ud i GMO affald.
5. Du kan nu gå i gang med at løse opgaverne se afsnit 2.4.

| Plade | Antal kolonier |
|------------------------------------|-----------------------|
| Biosensor + LB kloramfenikol | |
| | Vækst (ja/nej) |
| Negativ kontrol + LB | |
| Negativ kontrol + LB kloramfenikol | |

2.4 Opgaver

De følgende spørgsmål kan du besvare på dag 2:

1. Hvordan ser kolonierne ud? Du kan f.eks. notere farve, form og størrelse.

2. Er de farvede? Hvis ikke, hvorfor?

Når I er færdige med opgaverne her kan I gå i gang med supplementsopgaverne

3 Protokol B - Test af Biosensor ved renstrygning

I denne øvelse skal du teste om din Biosensor fungerer. Din biosensor fungerer korrekt hvis den bliver lilla når den vokser på medie med acetylsalicylsyre i, mens at den ikke er lilla når den vokser uden acetylsalicylsyre i mediet. Efter transformationen af biosensor plasmidet kan du ikke være sikker på at de kolonier som du ser på din agarplade med biosensor bakterier på er fuldstændigt genetisk identiske. Derfor er det god praksis at renstryge sine transformanter inden at man arbejder videre med dem. I denne øvelse skal du derfor øve renstrygningsteknikken. Formålet med renstrygning er at isolere enkelt kolonier, sådan at alle bakterierne i samme koloni vil komme fra den samme bakterie og dermed være genetisk identiske. Det er vigtigt at have genetisk identiske bakterier, når man arbejder videre med biosensoren for at sikre reproducerbare resultater. I biosensor øvelsen skal du ikke arbejde videre med dine biosensorer, men det er stadigvæk en oplagt mulighed for at øve renstrygningsteknikken når du skal teste om din biosensor fungerer.

Biotech Academy har tidligere lavet en video om renstrygning se den inden du går i gang med øvelsen. Du kan finde videoen her: <https://vimeo.com/30977209>.

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.

3.1 Lærer forberedelse

Der skal forberedes sterile LB agarplader, LB agarplader med chloramphenicol, LB agarplader med chloramphenicol og acetylsalicylsyre, samt LB medie. Du kan finde vejledninger til dette på https://biosensor.dk/wp-content/uploads/2019/09/1_rer_vejledning.pdf. Til LB agarpladerne der indeholder acetylsalicylsyre kan du med fordel benytte treo tabletter.

3.2 Materialer

- Agarplade med transformanter fra øvelse 2 Protokol A - Transformation
- LB agarplade med 10 µg/mL Chloramphenicol og 1 mmol/L Acetylsalicylsyre
- LB agarplade med 10 µg/mL Chloramphenicol
- Sterile podenåle eller autoklaverede tandstikker
- Bunsenbrænder eller spritbrænder
- Permanent marker

3.3 Fremgangsmåde

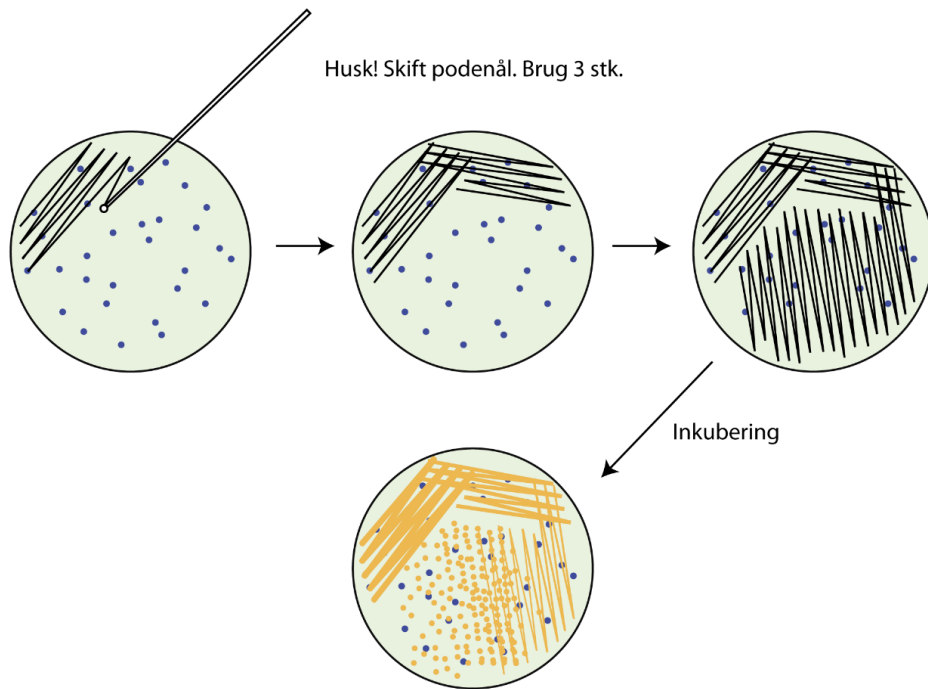
Dag 1:

1. Klargør din arbejdsplads. Læg papir på arbejdspladsen og opstil en autoklaveringspose til GMO-affald. Lokalet skal være mærket til GMO-øvelse.
2. Navngiv LB agarpladen med chloramphenicol og acetylsalicylsyre:
 - (a) Biosensor renstrygning + LB kloramfenikol ASA¹ + dato + gruppenavn/nummer.
3. Navngiv LB agarpladen med chloramphenicol:
 - (a) Biosensor renstrygning + LB kloramfenikol + dato + gruppenavn/nummer.
4. Dyp forsigtigt en podenål eller en tandstik i en koloni på din agarplade med transformanter.
5. Styg podenålen eller tandstikke i et zigzag-mønster over **LB kloramfenikol ASA** pladens som vist på figur 1. Husk at skifte podenål eller tandstik. Pas på at du ikke trykker podenålen eller tandstikken gennem agaren.
6. Dyp forsigtigt en podenål eller tandstik i samme koloni som i punkt 4.
7. Styg podenålen eller tandstikke i et zigzag-mønster over **LB kloramfenikol** pladens som vist på figur 1. Husk at skifte podenål eller tandstik. Pas på at du ikke trykker podenålen eller tandstikken gennem agaren.
8. Hvis I har flere plader kan I gentage punkt 4 til 7 hvor I udvælger en ny koloni på transformationspladen.
9. Læg pladerne med de renstrøgne kolonier i en plastik pose.
10. Sæt pladerne med bunden opad i et inkubatorskab ved 37°C. Lad dem stå natten over.

Dag 2:

1. Klargør din arbejdsplads. Læg papir på arbejdspladsen og opstil en autoklaveringspose til GMO-affald. Lokalet skal være mærket til GMO-øvelse.
2. Tag pladerne ud af inkubatorskabet.
3. Noter dine observationer ved at besvare spørgsmålene, se afsnit 3.4.

¹Acetylsalicylsyre forkortes ofte ASA fra det engelske AcetylSalicylic Acid



Figur 1: Mønster for renstrygning. Her ser du hvordan du skal renstryge din biosensor. Figuren er fra Biotech Academy's tidligere projekt "Fra Darwin til Bioteknologi".

3.4 Opgaver

De følgende spørgsmål kan du besvare på dag 2:

1. Hvordan ser kolonierne ud på pladen med acetylsalicylsyre? Du kan f.eks. notere farve, form og størrelse.

2. Er alle kolonierne på pladen med acetylsalicylsyre samme farve? Hvorfor er de det/hvorfor er de ikke det?

3. Hvordan ser kolonierne ud på pladen uden acetylsalicylsyre? Du kan f.eks. notere farve, form og størrelse.

4. Er alle kolonierne på pladen uden acetylsalicylsyre samme farve? Hvorfor er de det/hvorfor er de ikke det?
