



Biotech Academy



# Biosensor

## Case 1

### Øvelsesvejledning

novonordisk fonden

novozymes<sup>®</sup>   
Rethink Tomorrow

 NEW ENGLAND  
*BioLabs*<sup>®</sup>

 BioNordika  
YOUR SCIENTIFIC SUPPLIER

 **SnapGene**<sup>®</sup>  
Software for molecular biology

 OTTO MØNSTEDS FOND

---

LUNDBECKFONDEN

---

## Indholdsfortegnelse

|          |                                    |          |
|----------|------------------------------------|----------|
| <b>1</b> | <b>Indledning</b>                  | <b>1</b> |
| <b>2</b> | <b>Protokol A - Transformation</b> | <b>2</b> |
| 2.1      | Lærerforberedelse . . . . .        | 2        |
| 2.2      | Materialer: . . . . .              | 2        |
| 2.3      | Fremgangsmåde: . . . . .           | 3        |
| 2.4      | Opgaver . . . . .                  | 5        |

# 1 Indledning

## Velkommen til Biotech Academy's Biosensor Case 1

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 udviklet et øvelse hvor du kan lave en Biosensor og teste hvordan den virker. Med Biosensor kittet kan du lave forskellige cases, denne øvelsesvejledning hører til Biosensor Case 1. I Case 1 skal du lave en Biosensor som udtrykker et rødt fluorescerende protein. Denne Biosensor er faktisk ikke en rigtig biosensor fordi den ikke kan "sense" noget, derimod er den altid aktiv. Det betyder at Biosensoren altid vil være rød. Selv om at denne Biosensor ikke er en rigtig Biosensor, kan det stadigvæk være en rigtig god øvelse at lave den, da de teknikker du skal bruge er fuldstændig de samme som man bruger til at lave andre biosensorer. Du får i denne øvelse mulighed for at lære at arbejde med GMO organismer da du skal transformere et plasmid ind i en bakterie. Øvelsen skal laves over 2 dage det er fordi bakterierne skal have tid til at gro og udtrykke det røde fluorescerende protein.

For at læse mere omkring Biosensor og teorien bag Biosensor Case 1 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 sterilt LB medie til forsøget (se [https://biosensor.dk/wp-content/uploads/2019/08/l\\_rer\\_vejledning.pdf](https://biosensor.dk/wp-content/uploads/2019/08/l_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 CaCl<sub>2</sub> (Opløst i vand)
- 1 mL Flydende LB medie
- 1 LB agarplader
- 3 LB agarplader med 10 µg/mL kloramfenikol
- LB agarplade med *E. coli DH5α* (Som din lærer har klargjort)
- Biosensor plasmid - Case 1 (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  $\mu\text{L}$  50 mM  $\text{CaCl}_2$  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  $\text{CaCl}_2$  i.
7. Gentag step 6 for det andet eppendorfrør med  $\text{CaCl}_2$ .
8. Tilsæt 5  $\mu\text{L}$  Biosensor plasmid til dit "Biosensor" eppendorfrør.
9. Tilsæt 5  $\mu\text{L}$  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 to rør i varmeblokken eller varmebadet i 60 sekunder.
13. Sæt rørene i et dit isbad og vent 2 minutter.
14. Tilsæt 250  $\mu\text{L}$  flydende LB medie til hver af de to eppendorfrør.
15. Inkubér de to 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. Tænd bunsenbrænderen. I de næste steps arbejdes der tæt på bunsenbrænderen, så udpladningen af celler foregår sterilt.
  19. Ryst forsigtigt røret, så cellerne og LB-mediet er blandet.
  20. Pipettér 250 µL af cellerne ud på den tilhørende agarplade.
  21. Dyp drigalskispatelen 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 udplades på 2 plader (både med og uden kloramfenikol).
  22. Lad pladerne tørre tæt på bunsenbrænderen med låget halvt af.
  23. 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.
  24. Når pladerne er tørre vend dem rundt, så bunden er opad og put dem i en pose.
  25. 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.

| <b>Plade</b>                       | <b>Antal kolonier</b> |
|------------------------------------|-----------------------|
| Biosensor + LB kloramfenikol       |                       |
|                                    | <b>Vækst (ja/nej)</b> |
| 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? Hvilken farve?

---

---

---