



Biotech Academy



Biosensor

Case 1 & 2

Øvelsesvejledning

novo nordisk fonden

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	6
3 Protokol B - Test af Biosensor ved renstrygning	7
3.1 Lærerforberedelse	7
3.2 Materialer	7
3.3 Fremgangsmåde	8
3.4 Opgaver	10

1 Indledning

Velkommen til Biotech Academy's Biosensor Case 1 & 2

Forestil dig, at du kunne designe en bakteriel biosensor, som kan hjælpe læger med at detektere kræft. 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 & 2.

I Case 1 skal du lave en Biosensor som udtrykker et rødt fluorescerende protein. Denne Biosensor er faktisk ikke en rigtig biosensor, da den ikke er i stand til at "sense" noget, men derimod altid er aktiv. Det betyder at Biosensoren altid vil være rød. Selv om at Case 1 ikke giver dig 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. Øvelsen skal laves over 2 dage, eftersom bakterierne skal have tid til at vokse og udtrykke det røde fluorescerende protein (RFP).

I Case 2 skal du lave en biosensor, der vil kunne reagere på acetylsalicylsyre (hvilket er et stof i smertestillende medicin såsom Treo). Ved tilstedeværelse af dette stof, vil biosensoren frembringe en lilla farve. Efterfølgende skal du teste om din biosensor virker som forventet ved at lade Biosensoren vokse på medie hvor der er tilsat acetylsalicylsyre. Du får i disse øvelser mulighed for at lære at arbejde med genmodificerede organismer (GMO), da du skal transformere et plasmid ind i en bakterie.

For at læse mere omkring Biosensor og teorien bag Biosensor Case 1 & 2 kan du besøge: <http://biosensor.dk>.

Vi håber, at det bliver sjovt og at du måske vil uploade billeder af din biosensor på sociale medier og dermed være med til at udbrede øvelsen. Du kan tage dit opslag med [#biosensor](#) og [#biotechacademy](#).

God fornøjelse!

Hilsen Chrysilis, Iben 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.

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 antibiotikummet ampicillin. Transformationen plades derfor på agarplader med ampicillin. 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, at det kun er de bakterier, som har biosensorplasmidet i sig, der kan gro på LB pladerne.

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 afmærkes.

2.1 Lærerforberedelse

Der skal forberedes sterile LB agarplader med ampicillin og sterilt flydende LB medie til forsøget (se <https://biosensor.dk/vejledninger-og-opgaver/>)

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

2.2 Materialer

- 50 mM CaCl₂ (Opløst i vand)
- 1 mL flydende LB medie
- 1 LB agarplader
- 3 LB agarplader med 100 µg/mL ampicillin
- LB agarplade med *E. coli DH5α* (Som din lærer har klargjort)
- Biosensor plasmid Case 1 (Findes i Biosensor kittet)
- Biosensor plasmid Case 2 (Findes i Biosensor kittet)
- Sterilt demineraliseret vand
- Eppendorfrør
- Pipettespidser og pipetter

- Flyder til eppendorfrør
- Isbad
- Varmebad eller varmeblok indstillet til 42°C
- Drigalskispatel
- Ethanol
- Bunsenbrænder **OBS! Kan ikke erstattes af et stearinlys**
- Permanent tus

2.3 Fremgangsmåde

Dag 1:

1. Klargør din arbejdsplads. Læg papir på bordet og opstil en autoklaveringspose til GMO-affald. Lokalet skal være mærket til GMO-øvelse.
2. Først skal eppendorfrørene klargøres:
 - (a) Skriv: "Biosensor Case 1" og gruppenummer på et eppendorfrør.
 - (b) Skriv: "Biosensor Case 2" og gruppenummer på et andet eppendorfrør.
 - (c) Skriv: "Negativ kontrol" og gruppenummer på et tredje eppendorfrør.
3. Herefter skal jeres LB plader med antibiotikum navngives:
 - (a) Biosensor Case 1 + LB ampicillin + dato + gruppenummer.
 - (b) Biosensor Case 2 + LB ampicillin + dato + gruppenummer.
 - (c) Negativ kontrol + LB ampicillin + dato + gruppenummer.
4. Jeres LB plade uden ampicillin navngives:
 - (a) Negativ kontrol + LB + dato + gruppenummer.
5. Tilsæt 250 μL 50 mM CaCl_2 til de tre eppendorfrør.
Tip: Se video om korrekt pipettering.
<https://vimeo.com/479841249>
6. Find LB agarplade med *E. coli* kolonier som din lærer har forberedt.
7. Tag én koloni fra pladen med en pipettespids og dyp den i et af dine eppendorfrør med CaCl_2 i.
8. Gentag trin 7 for det alle eppendorfrør med CaCl_2 .
9. Tilsæt 5 μL Biosensor plasmid til dit "Biosensor Case 1" eppendorfrør.
10. Tilsæt 5 μL Biosensor plasmid til dit "Biosensor Case 2" eppendorfrør.

11. Tilsæt 5 µL sterilt demineraliseret vand til dit "Negativ kontrol" eppendorfrør.
12. **CHECKPOINT! Har du husket at tilføje:**
 - (a) **CaCl₂ i alle rør?**
 - (b) ***E.coli* i alle rør?**
 - (c) **Biosensor Case 1 plasmid i det ene rør, Biosensor Case 2 plasmid i det andet rør og sterilt vand i det tredje rør?**
13. Sæt alle rørene i et isbad og inkuber i 10 minutter.
14. Mens du venter, kan du sikre dig at varmeblokken eller varmebadet er indstillet til 42°C.
15. Sæt dine tre rør i varmeblokken eller varmebadet og giv bakterierne et varmeshok i 60 sekunder.
16. Sæt rørene i isbadet og inkuber i 2 minutter.
17. Tilsæt 250 µL flydende LB medie til hver af de tre eppendorfrør.
18. Inkuber de tre eppendorfrør i et varmeskab ved 37°C. I kan inkubere bakterierne i op til 30 minutter. Vi anbefaler minimum at inkubere i 10 minutter.
19. Tænd bunsenbrænderen. I de næste trin arbejdes der tæt på bunsenbrænderen, så udpladningen af celler foregår sterilt.
20. Ryst forsigtigt røret, så cellerne og LB-mediet er blandet.
21. Pipetter 250 µL af cellerne ud på den tilhørende agarplade.
Tip: Se video om korrekt udpladning af celler.
<https://vimeo.com/479842141>
22. Dyp drigalskispalten i ethanol og hold den ind under bunsenbrænderen i et par sekunder. Vift spatlen i luften for at slukke flammen, og lad den køle af. Hvis spatlen er for varm når du udplader, kan cellerne dø. Tryk den forsigtigt ned på agarpladen et sted, hvor der ikke er celler, så du er helt sikker på, at den er kølet af. Brug så spatlen til at plade cellerne ud over hele pladen. Hold 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 to plader (både med og uden ampicillin).
23. Lad pladerne tørre tæt på bunsenbrænderen med låget halvt af.
24. I mellemtiden kan du rydde din arbejdsstation op:
 - (a) De tre rør med Biosensor Case 1, Biosensor Case 2 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 trin.
- (c) **OBS** vent med at fjerne dækpapiret til du har fjernet agarpladerne fra bordet.
25. Når pladerne er tørre, skal du vende dem rundt, så bunden er opad. Dette sikrer at der ikke drypper kondens ned på pladerne. Put herefter pladerne i en plastikpose.
26. **CHECKPOINT! Har du husket at:**
- (a) **Skrive gruppenummer**
- (b) **Skrive negativ kontrol, Biosensor Case 1 eller Biosensor Case 2**
27. Inkuber pladerne ved 37°C til næste dag.

Dag 2:

1. Kig på dine plader.
2. Tæl antallet af kolonier på pladen med Biosensor, og indfør numrene i skemaet nedenfor
 - (a) På de to plader med negativ kontrol celler skal I blot se om der er vækst eller ej, og notere det i skemaet. I skulle gerne kunne se, at der er vækst på LB-pladen uden ampicillin, mens der ikke bør være vækst på LB pladen med ampicillin.
3. Opbevar pladerne med kolonier i en tillukket pose i køleskabet. Dette forhindrer at pladerne udtørres. Husk at agaren skal vende opad.
4. Når du er færdig med forsøget, skal alle agarpladerne og affaldsposen smides ud i GMO-affald.
5. Du kan nu gå i gang med at løse opgaverne. Se afsnit 2.4.

Plade	Antal kolonier
Biosensor Case 1 + LB ampicillin	
Biosensor Case 2 + LB ampicillin	
Vækst (ja/nej)	
Negativ kontrol + LB	
Negativ kontrol + LB ampicillin	

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 ja, hvilken farve? Hvis nej, hvorfor?

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 du ser på din agarplade med biosensorbakterier 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 enkelte 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/479843957>.

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 afmærkes.

3.1 Lærerforberedelse

Der skal forberedes sterile LB agarplader, LB agarplader med ampicillin, LB agarplader med ampicillin og acetylsalicylsyre, samt flydende LB medie. Du kan finde vejledninger til dette på <https://biosensor.dk/vejledninger-og-opgaver/>. 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 100 µg/mL ampicillin og 1 mmol/L Acetylsalicylsyre
- LB agarplade med 100 µg/mL ampicillin
- Sterile podenåle eller autoklaverede tandstikker
- Bunsenbrænder eller spritbrænder
- Permanent tus

3.3 Fremgangsmåde

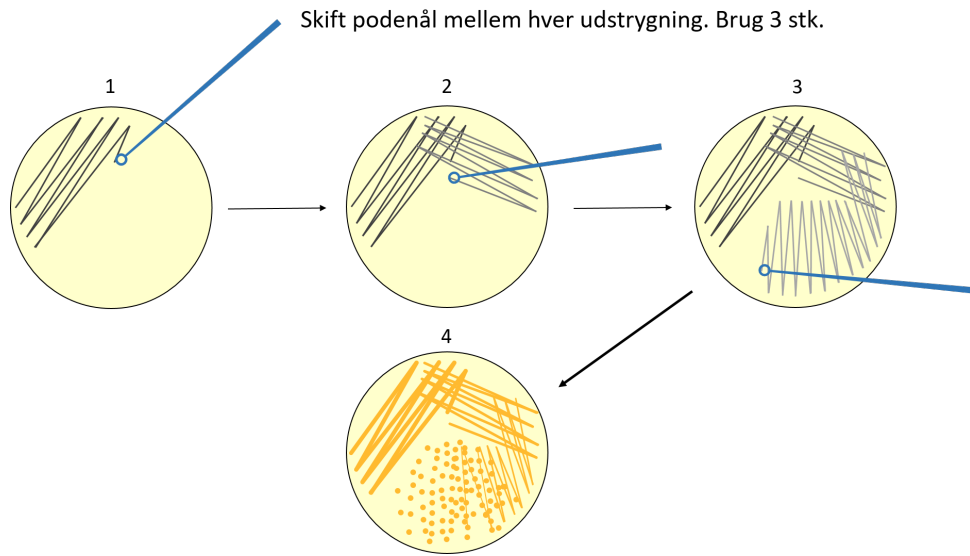
Dag 1:

1. Klargør din arbejdsplads. Læg papir på bordet og opstil en autoklaveringspose til GMO-affald. Lokalet skal være mærket til GMO-øvelse.
2. Navngiv LB agarpladen med ampicillin og acetylsalicylsyre:
 - (a) Biosensor renstrygning + LB ampicillin ASA¹ + dato + gruppenummer.
3. Navngiv LB agarpladen med ampicillin:
 - (a) Biosensor renstrygning + LB ampicillin + dato + gruppenummer.
4. Dyp forsigtigt en podenål eller en tandstik i en koloni på din agarplade med transformanter.
5. Styg podenålen eller tandstikken i et zigzag-mønster over **LB ampicillin ASA** pladen som vist på figur 1. Pas på at du ikke trykker podenålen eller tandstikken gennem agaren. Husk at skifte podenål eller tandstik mellem udstrygningerne.
6. Dyp forsigtigt en podenål eller tandstik i samme koloni som i punkt 4.
7. Styg podenålen eller tandstikken i et zigzag-mønster over **LB ampicillin** pladens som vist på figur 1. 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 plastikpose.
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 bordet og opstil en autoklaveringspose til GMO-affald. Lokalet skal være afmærket 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 korrekt renstrygning.

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?
