

Biotechnology Explorer™ GMO analyse Kit

Katalog nr.166-2500EDU

explorer.bio-rad.com

Bemærk: Kittet indeholder temperaturfølsomme dele. Åbn derfor straks kassen og læg de pågældende dele til opbevaring ved den anbefalede temperatur.

Kopiering kun tilladt ved brug i undervisningen

BIO-RAD

For teknisk service bedes du ringe til dit lokale Bio-Rad kontor Office
or in the U.S. Call **1-800-4BIORAD** (1-800-424-6723)

10002155

Tjekliste

I nedenstående liste findes en oversigt over de dele, der følger med kittet. Desuden findes en oversigt over det udstyr, der er nødvendigt for at gennemføre forsøget. Tjek venligst udstyrslisten før forsøget udføres.

Kittets indhold:

Dele, der skal opbevares ved -20 °C (temperaturfølsomme komponenter)

BioRad nonfood GMO kontrol	1 pakke
GMO-positivkontrol 0,5 mL	1 rør
master-mix 2x, 1,2mL	1 rør
GMO-primere (rød), 15 µL	1 rør
PCR molekylærlineal (DNA standard) 200 µL	1 rør

Dele, der skal opbevares i køleskab (4 °C)

InstaGene™ matrix, 20mL	1 flaske
Orange G loading dye, 1mL	1 rør

Dele, der skal opbevares ved stuetemperatur

PCR-rør	1 pakke
Skruelågseppendorfrør, 1,5mL	1 pakke
Eppendorfrør – uden låg, 1,5mL	1 pakke
Flip-top rør 1,5 mL	2 pakker
Engangsplastikpipette	2 pakker
Skum-holdere til eppendorfrørene	8
Manual på engelsk	1

Nødvendigt tilbehør/udstyr, som ikke er indeholdt i selve kittet

Til eleverne:

Mikropipetter 2-20 µL	
Mikropipetter 20-200 µL	
Mikropipetter 20-1000 µL	
Spidser til mikropipetter	
Mortere og pistiller	
Fødevareprøver fra supermarkedet	
Demineraliseret eller destilleret vand	3,5 L
Vandbad	
Mikrocentrifuge	
Vægt, 0,5g's nøjagtighed	
Vejepapir eller vejebåde	
Strømforsyning	
Bakker med knust is	
Tuscher til at mærke med	
Affaldsbeholdere	

Fællesudstyr i laboratoriet

Mikropipetter 0-20 µL, 20-200 µL og 100-1000 µL
Pipettespidser til ovennævnte

Termocykler (PCR-maskine) eller 3 vandbade til manuel styring
 Protease (til forsøget med hårfolliklen), 1,3 mL
 Mikrocentrifuge
 Agarose
 TAE-buffer 50x

Hvis der laves agarosegelelektroforese

Fast Blast DNA farve 100 mL
 Elektroforeseudstyr

Hvis der benyttes polyacrylamidgeler og lodret elektroforese

Vertikalt elektroforeseapparat
 10% TBE readyGel precast geler
 TBE-buffer 10x
 Fast Blast DNA farve
 Gelpåsætningspidser

Bemærk: Det er vigtigt, at de forskellige dele opbevares ved den angivne temperatur (se de enkelte kemikalier!).

Arbejdes der med polyacrylamidgeler, skal man være opmærksom på, at de **kun** kan opbevares i 3 måneder, hvorfor de først indkøbes, når man kender forsøgsdatoen.

Der kan købes refill til dette kit – se kataloget

I den medfølgende manual såvel som i adskillige lærebøger kan man læse om PCR-teknikken. Her vil kun dele af teorien blive taget med, hvorfor der henvises til manualen og andre kilder.

Om GMO-kittet

Med dette kit er det muligt at teste madvarer fra supermarkedet for indhold af GMO. GMO-kittet tester for to forskellige GMO-relaterede sekvenser: 35S promotoren i blomkåls mosaikvirus (CaMV 35S) og terminatoren på nopalinsyntasegenet i *Agrobacterium tumefaciens*. Enten den ene eller den anden af disse sekvenser vil være til stede i de fleste GMOfødevarer, der sælges i USA, asien og Europa. Kittet efterligner de metoder forskerne bruger for at undersøge for GMO. Det meste af det planteDNA, der udtrækkes fra planter testes ydermere ved hjælp af PCR for en tredje Dna-sekvens, nemlig grønkorn II chloroplast gen. Fuldkommenheden af PCR-reaktionen testes ved at mangedoble 35S promotoren og fotosystem II genet direkte fra den Dna-skabelon, der følger med kittet. Sideløbende testes BioRads non-GMO kontrol, så man kan se, at der ikke foregår en kontaminering af de prøver, der skal analyseres.

Agarose eller polyacrylamidgeler?

Da de DNA stykker der skal adskilles er meget små kan det være en fordel at bruge polyacrylamidgeler, idet der her fås tydeligere båndadskillelse og klarere bånd. Har man ikke udstyr til at køre polyacrylamidgeler, kan man køre agarosegelelektroforese på en 3 % agarosegel. Begge metoder vil blive omtalt i vejledningen

Lidt om PCR

PCR teknikken blev udviklet i 1983 af Kary Mullis ved Cetus Corporation. PCR, der betyder **polymerase chain reaction**, har virkelig sat skub i molekylærbiologien som et videnskabeligt redskab. Inden man opfandt PCR-teknikken var det ofte svært at få materiale nok, når man arbejdede med DNA. PCR-teknikken har især haft betydning inden for de fire områder, genkortlægning, kloning, DNA-sekventering og DNAanalyser.

I dag bruges PCR som et medicinsk diagnostisk redskab, bl.a. ved undersøgelser af specifikke mutationer, som kan være årsag til genetiske sygdomme, ved kriminelle retsgenetiske sager og ved analyser af det humane genom. Desuden benyttes teknikken som i dette kit til fødevarekontrol – her test for fødevarers indhold af genmodificerede organismer.

PCR og bioteknologi – hvad er det? Og hvorfor har metoden revolutioneret et helt videnskabeligt område?

Ved PCR-teknikken kan man producere en særlig stor mængde af et specifikt DNA, blot man har en lille smule udgangsmateriale, en ”skabelon”. Udgangsmaterialet kan være alle former for dobbeltstretet DNA. Selv små mængder fx en dråbe blod, et lille stykke plante, en enkelt hårfollikel er nok til at blive mangedoblet ved hjælp af PCR. Netop det, at man kun behøver så ufatteligt små mængder af udgangsmaterialet, har betydet et stort skridt fremad ikke mindst inden for retsgenetikken.

I dette kit benyttes metoden til at teste fødevarer for deres indhold af GMO. I sig selv er PCR-teknikken simpel og relativt billigt. Alt, hvad der er brug for, er en reaktionsbuffer, de fire baser, DNA-polymerase, to primere og små mængder af det udgangsmateriale, som man ønsker at undersøge.

I PCR benyttes to principper fra molekylærgenetikken:

1. Hybridisering af komplementære Dna-streng
2. Syntetisering af Dna-streng ved hjælp af DNA-polymerase

Man udnytter altså det, at to komplementære streng vil gå sammen, Det DNA, der skal kopieres, udvælges vha. primers. Primers (eller proberne) består af syntetisk fremstillet oligonucleotider (korte Dna-stykker). Proberne sætter sig på de to DNA streng og afgrænser det Dna-stykke eller segment, der skal mangfoldiggøres. Man siger, at de to DNA streng fungerer som skabelon for syntesen af en komplementær DNA streng.

PCR trin for trin

PCR involverer en række gentagne cykler, der hver består af følgende tre trin: Denaturering, primer påsættelse og forlængelse af den påhæftede primer ved hjælp af *Taq* DNA polymerase.

Før selve DNA amplifikation påbegyndes skaffes der prøver af de fødevarer, der skal testes for GMO-indhold.

Efter at prøverne er gjort klar blandes skabelon DNA, primers (oligonucleotider), termostabil DNA-polymerase (*Taq*), de fire baser (T, A, G og C) og reaktionsbuffer i et eppendorfrør. Eppendorfrøret placeres i termocykleren eller de nødvendige vandbade klargøres.

Termocykleren indeholder en aluminiumsblok, hvori prøverne placeres. Denne aluminiumsblok kan lynhurtigt afkøles og opvarmes til meget forskellige temperaturer – dette kaldes termal cykling.

I en cyklus opvarmes først til 94 °C, hvorved Dna-strengene vil denaturere eller adskilles. Dette kaldes denatureringstrinnet.

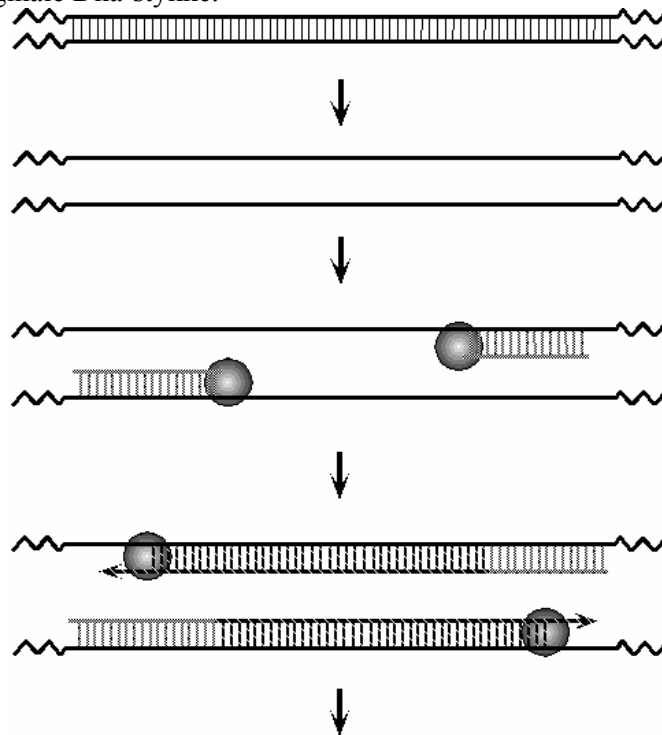
Derefter afkøles lynhurtigt til 60 °C, hvorved primeren bindes til de enkelte skabelon-DNA-streng. Dette kaldes vedhæftningstrinnet. De to oprindelige Dna-streng vil eventuelt samle sig igen eller konkurrere med primerens komplementære bindingssteder. Men der tilsættes i dette forsøg så megen primer, at den originale Dna-streng ”udkonkurreres”.

Til sidst opvarmes til 72 °C hvorved *Taq* DNA polymerase forlænger de komplementære DNA streng med start fra primeren og den endelige færdige kopi af Dna-dobbelstreng kan dannes. Dette trin kaldes forlængelsestrinnet.

Taq polymerasen arbejder mest effektivt ved 72°C, hvorfor det er vigtigt at ramme præcis denne temperatur.

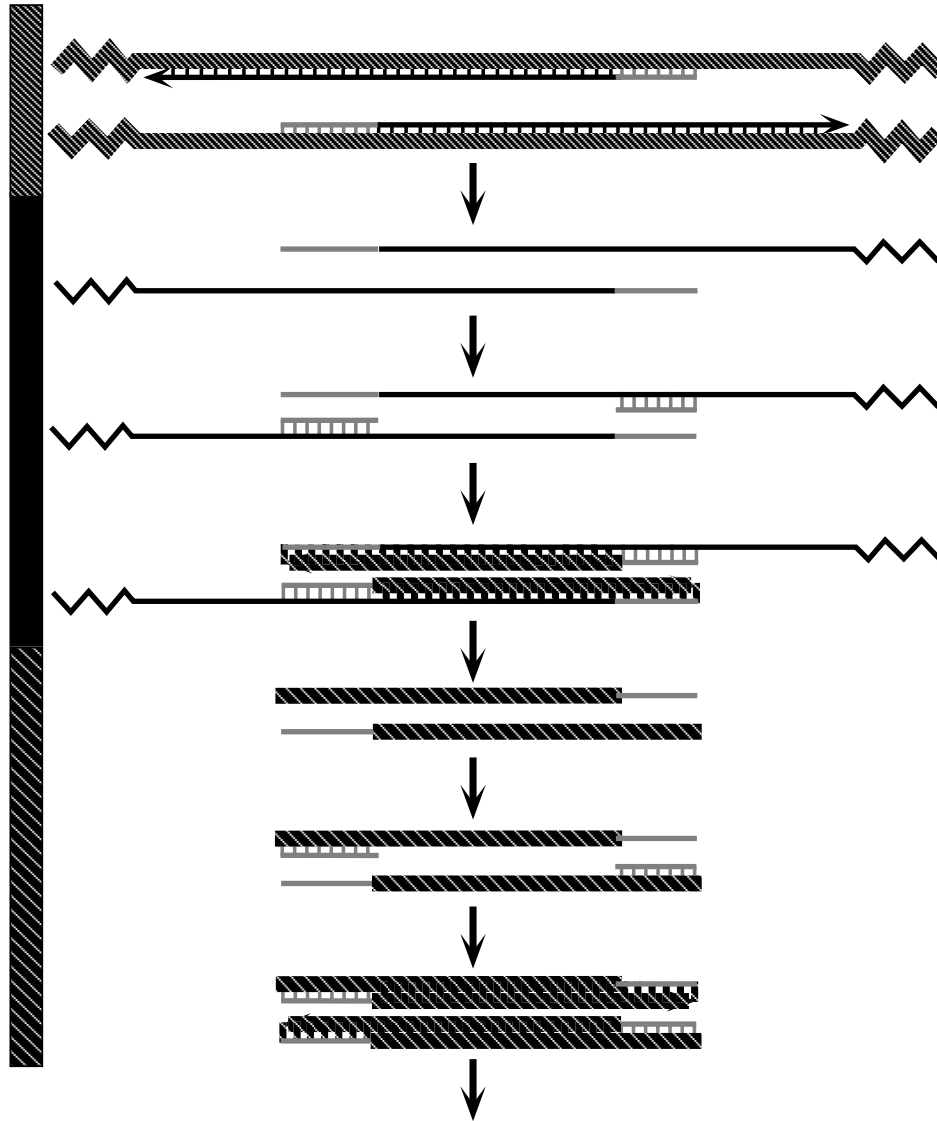
En cyklus = denaturering + vedhæftning + forlængelse

De to nye sæt dobbelstreng Dna, der er dannet nu, danner dernæst udgangspunkt for næste cyklus og på denne måde mangedobles Dna-streng antallet efterhånden. Ved 40 cykler dannes over en milliard kopier af det originale Dna-stykke.



Normalt køres der 40 cykler. Ved hver cyklus fordobles antallet af Dna-streng. Efter 40 cykler vil der således være $1,1 \times 10^{12}$ ekstra kopier af den oprindelige stump DNA.

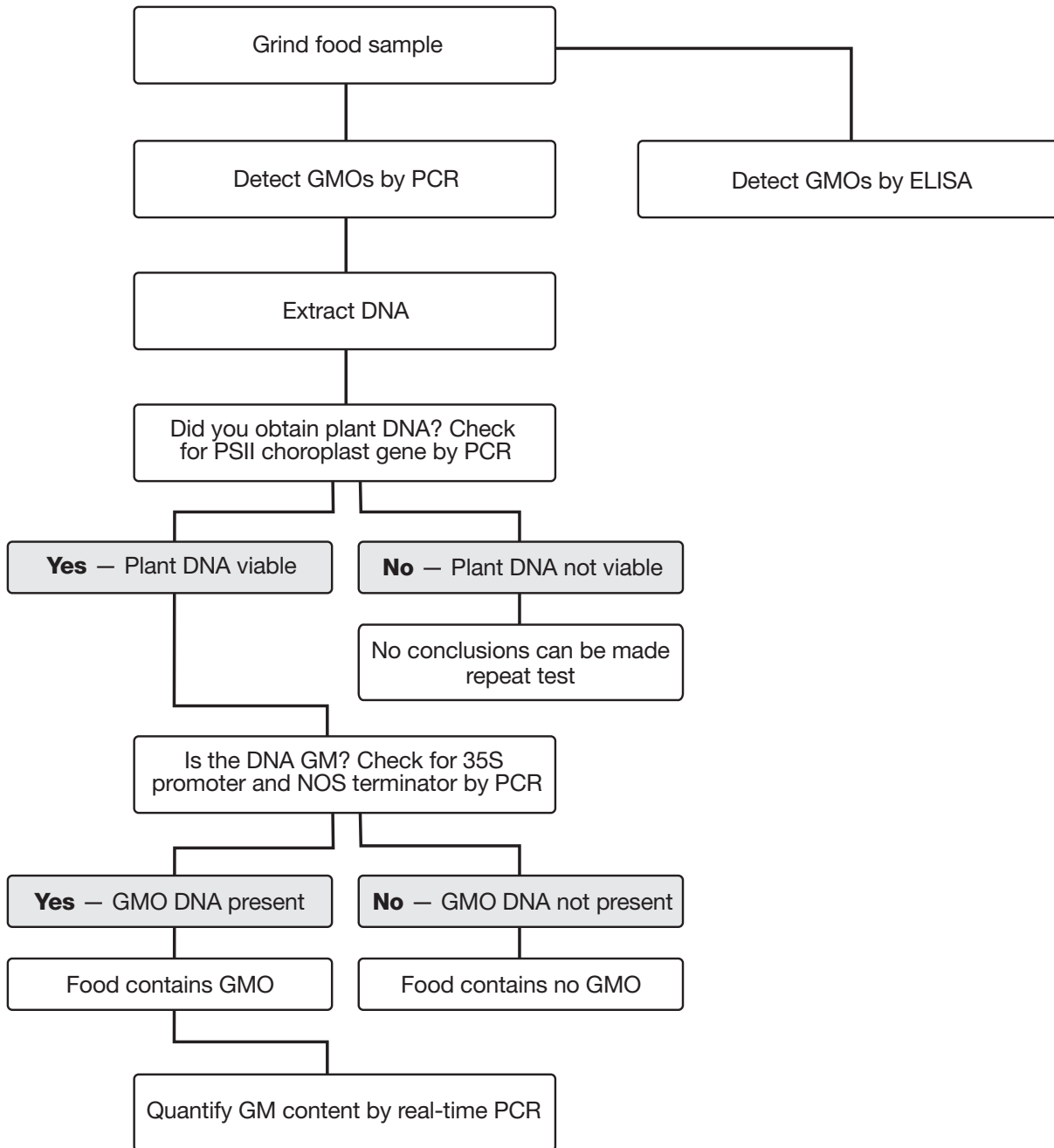
PCR laver DNA med eksakte længder og sekvenser. I den første cyklus vedhæftes de to primere til Dna-udgangsmaterialet i hver sin ende på de to komplementære streng. Efter den første fuldendte cyklus er der dannet to nye streng, der er kortere end det oprindelige DNA, men længere end det specifikke Dna-stykke, som man ønsker at mangedoble. Først efter 3. cyklus er man oppe på fuld længde – se figur 5.



Når man således har fået den præcise længde på DNA påbegyndes ved de næste cykler den eksponentielle fordobling (X^n , hvor X er antallet af udgangsmaterialet og n er antallet af cykler). Der vil altid være et sæt originalt udgangs-DNA-materiale, som ikke er fuldt kopieret. Dette betyder dog ikke noget, når der køres et tilstrækkeligt antal cykler

Hvordan kan man teste fødevarer for GMO indhold?

Der er i hovedtræk to metoder, der benyttes til dette – dels ELISA, hvor der testes for tilstedeværelsen af specifikke proteiner, der kun produceres af GMO-organismer. Den anden metode er PCR, hvor de DNA-sekvenser, der er indsat i organismen findes og analyseres.



Tips til kittet

Tjek om DNAekstraktionen var god nok

Kittet indeholder et sæt primere, der er specifikt rettet mod GMO-sekvenser, men også et sæt primere (grønne), som identificerer planteDNA uanset om det er GMO eller ej. Det andet primersæt fortæller således idenrekte om et negativt GMO-resultat skyldes mangel på GMO eller om det simpelthen skyldes, at der ikke blev ekstraheret nok Dna

Sammenlign med GMO-frie prøver

Kittet indeholder GMO-fri madprøver, som analyseres sideløbende. Viser disse prøver positivt resultat er der sket en kontaminering undervejs.

Sørg for at PCR-reaktionen arbejder som ønsket

I kittet findes en skabelon for plante og GMO-sekvenser. Denne prøve virker som kontrol mod falske negativer

”Duplex” PCR

I dette kit arbejdes der med ”duplex PCR”, hvilket vil sige at to bestemte sekvenser amplificeres simultant – det drejer sig om hhv. 203bp fragment af CaMV 35S promotoren og et 225bp fragment af NOS-terminatoren. Ved at bruge disse samtidig vil 85% af alle GMO-fødevarer kunne afsløres

Forberedelser op til selve forsøget:

Arbejdsgang:

Læsning af manual

Indkøb af fødevarer

Forberedelse til laboratorieøvelserne (½-3 timer pr. gang)

50-minutters lektioner:

Lektion 1. DNA ekstraktion

Lektion 2: Gøre klar til PCR

PCR kører derefter – fx om natten

Lektion 3: Elektroforese og farvning af geler

Lektion 4: Tolkning af resultater.

Ved moduler på fx 90 minutter slås lektionerne sammen 1+2 og 3+4

ADVARSEL

Selv om den benyttede farve ikke er giftig eller carcinogent anbefales det, at der bæres handsker for at undgå at blive farvet blå. Tilsvarende er det en fordel at bære kittel, så der ikke kommer blå farve på ens tøj.

Skulle der komme farve på tøj eller bordplader e.l., tørres dette let af med sprit.

Pipetten

De medfølgende engangsplastpipetter har inddeling som vist på tegning og kan fint benyttes, såfremt man ikke råder over mikropipetter.

Mortere og pistiller

Mortere og pistiller skal være ekstra rene inden forsøget. Og de bør afvaskes med klor mellem forskellige grupper brug.

Før lektion 1:

Det er ikke lige let at udtrække DNA fra alle fødevarer, men følgende giver ofte godt resultat:

Frisk majs, frisk papaja, majs brød, majsmandekagepulver, sojamel, tortilla chips (med eller uden smag), majs snack, burgers med sojaprotein, sojabaserede drikke eller pulver

Materialer:

Skruelågsrør	16
Bægerglas med dem. Vand	8
Engangsplastpipetter	8-16
InstaGene matrix	1 flaske
Vandbad 95-100°C	1

Hvad skal der gøres:

1

Tilsæt 500µL InstaGene matrix til hvert af de 16 skruelågsrør.

Bemærk: Sørg for hele tiden at blande InstaGene matrix'en ved at suge op og ned med pipetten inden afpipettering

2

Til mindst 25mL demineraliseret vand i hvert bægerglas

3

Tænd vandbadet 30 minutter før forsøget

4

Forbered eventuelt den GMO-fri kontrolprøve

5.

Gør elevarbejdspladserne klar

Materialer på elevarbejdspladserne:

Skruelågsrør med 500µL InstaGene matrix	2
Bægerglas med demineraliseret vand	1
Pipetter	2
Morter og pistil	1
Fødevareprøver	1-8
Mærkepen	

Fælles:

Vandbad 95-100 °C

Microcentrifuge

Vægt og vejeskåle

Før lektion 2:

Materialer	i alt	pr. gruppe
Skruelågsrør	26	
PCR-rør	48	
Adaptorer til PCR-rør (eppendorfrør uden låg)	48	
Mastermix		
GMO primere (rød)		
Plante PSII primere (grøn)		
GMO-positiv DNA-skabelon		
Elevprøverne fra forrige lektion		
Pipetter 2-20µL	8	1
Spidser – med aerosolbarriere	8 æsker	1 æske
Isbad	8	1
Holdere til rørene	8	1
Mærkepenne	8	1

Forberedelse – tager ca. 45 minutter

Bemærk: Tilsæt først primere til mastermixen og fordel først blandingen når der er mindre end 30 minutter til lektionens start. Blandingerne opbevares på is indtil start.

1

Tø den GMO-positive DNA-skabelon og pulse-spin (Udvs. Kort centrifugering) for at samle materialet i bunden af røret.

Overfør 50 μ L af GMO-positive DNA-skabelon til hvert af de 8 skruelågsrør mærket ”+”. Dette kan evt. udføres tidligere idet rørene kan opbevares ved -20°C i 1-2 måneder.

2

Tø såvel mastermix som primere og pulse-spin for at få indholdet til at samle sig på bunden. **Stil straks rørene på is**

3

Mærk skruelågsrørene:

9 mærkes ”PPM” (Plant mastermix)

9 mærkes ”GMM” (GMO mastermix)

4

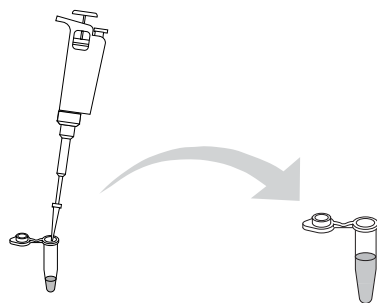
Overfør 600 μ L mastermix til ét PPM-rør og 600 μ L mastermix til ét GMM rør.

Pulse-spin rørene primer-rørene igen inden næste punkt.

5

Tilsæt 12 μ L af den grønne primer (Plante PSII-primer) til mastermixen i PPM-røret. Bland.

Stil på is.



6

Tilsæt 12 μ L af den røde primer (GMO-primer) til mastermixen i GMM-røret. Bland.

Stil på is.

7

Overfør 70 μ L af blandingen i PPM-røret til hvert af de 8 resterende PPM-rør.

8

Overfør 70 μ L af blandingen i GMM-røret til hvert af de 8 resterende GMM-rør.

9

Fordel rørene med ét PPM-rør, ét GMM-rør og et ”+” rør til hver gruppe

10

Programmer PCR-maskinen (thermalcyckler)

Trin	Funktion	Temperatur	Varighed	Antal cykler
Denatureringsstart	Denaturerer	94°C	2 minutter	1
Thermalcykling	Denaturerer	94°C	1 minut	40

	Påhæfter	59°C	1 minut	
	Forlænger	72°C	2 minutter	
Afslutning	Forlænger	72°C	10 minutter	1
Stabilisering	stabiliserer	4°C	Lang tid	1

Før lektion 3:

Elektroforese af PCR-produkterne

De DNAfragmenter, der amplificeres fra 35S-promotoren og NOS-terminatoren er på hhv. 203 og 225 basepar. PCR-produktet fra fotosystem II er på 455 bp. Disse små størrelser kræver enten en 3% agarosegel eller en polyacrylamidgel for at blive adskilt godt nok. Hvilken man vælger vil afhænge af de muligheder man har. Polyamidgeler kræver lodret elektroforese, hvorimod agarosegelerne kan køres i de traditionelle elektroforesekar.

Polyacrylamidgelerne vil give de bedste bånd og de bedste bånd-adskillelser. Polyacrylamidgelerne købes færdigstøbte kort tid før forsøgets udførelse.

Begge metoder beskrives her, men i øvrigt henvises der til den engelske manual.

Materialer:

Orange G loading farve 1 glas

PCR molekylær lineal

Flip-top mikrotestrør

Pipette 2-20µL

Spidser til pipetten – nogle med aerosolbarriere

Strømforsyning

Fast Blast DNA-farve

500mL's flaske til farven

Demineraliseret vand

Gelfarvningskar

Elektroforeseudstyr (se nedenfor)

Fremgangsmåde:

1

Tø Orange G loading farven og PCR molykylælinealen. Pulse-spin for at få materialet ned i bunden

2

Tilsæt 40µL Orange G loadingfarve til PCR molykylælinealen. Bland godt med pipetten og centrifuger kortvarigt.

3

Mærk flip-top testrørene:

8 mærkes "LD" og 8 mærkes "MWR"

4

Overfør 70µL Orange G loadingfarve til hvert af rørene mærket "LD". Dette punkt kan udføres op til 2 måneder før forsøget, hvorefter rørene stilles i køleskab.

5

Overfør 25µL PCR molykylælineal til hvert af rørene mærket "MWR". Dette punkt kan udføres op til 2 måneder før forsøget, hvorefter rørene stilles i køleskab.

6

Gør klar til elektroforesen – geler, elektroforesebuffer og udstyr klargøres.

7

Gør DNAfarven klar

8

Fordel materialer til eleverarbejdspladserne:

Gel	1
Prøver fra forrige lektion	6
Elektroforesebuffer	350 mL
Orange G loading farve	1
PCR molekylærlineal	1
Pipette 2-20 μ L	1
Pipettespiser med aerosolbarriere	1

Fælles:

Elektroforeseapparat

Strømforsyning

Farve

Kar til farvning

Elektroforese med agarosegel:

Materialer

Agarose	10,5g
50x TAE	60 mL
Målebægre	
Mikrobølgeovn	
1L's BlueCap flaske eller erlenmeyerkolbe	
50 mL's flaske	
Vandbad 60°C	
Gelstøbningskar	
Kam	
Tape til gelstøbning	
Vandret elektroforesekar	

A. Fremstilling af elektroforesebuffer:

Bufferen laves som en 50x koncentreret buffer. Til støbning af gelen skal bruges en 1x TAE buffer, ligesom det er en 1x TAE buffer der skal bruges under selve elektroforesen.

Fremstil 3L 1x TAE buffer: Tag 60 mL 50x koncentrat og tilsæt 2,94L demineraliseret vand.

B. Fremstilling af 3% agarose-opløsning:

Til 3g agarose tilsættes 100mL 1x TAE buffer. Til 8 geler bruges der ca 350 mL agaroseblanding.

Gelen kan enten fremstilles i en 1L's erlenmeyerkolbe på en varmeplade eller gelen kan fremstilles i mikrobølgeovnen. Sørg for at al agarosen er opløst – blandingen skal være helt klar!

Bemærk: Varm agaroseopløsning kan let skolde. Brug handsker e.l. til beskyttelse.

Støbning af geler:

- Forsegl enderne af gel-holderen med tape. Vær sikker på at tapen er tæt og glat. Malertape kan fint benyttes
- Sørg for at gel-holderen står vandret.
- Sæt kammen i ca. 2cm fra den ene ende
- Tag 1% agaroseopløsningen
- Lad den afkøle til ca. 60°C
- Hæld den varme gel op og lad den størkne i ca. 20 minutter
- Fjern forsigtigt kammen fra gelen ved at vippe den frem og tilbage, mens den løftes lodret op
- Fjern tapen
- Gelen kan opbevares indpakket i plastikfilm, plasticpose eller dypet i TAE-buffer i op til 2 uger i køleskab

Selve elektroforesen

- Sæt gelholderen med gelen i elektroforesekarret
- Fyld elektroforeseapparatet med TAE buffer til 2mm over gelen
- Sært prøverne på – noter rækkefølgen
- Lad gelen køre i 30 minutter ved 100V. Sørg for at den orange farve ikke løber ud af gelen.
- Farv gelen med Fast Blast DNA-farve

Forberedelse af Dna-farve:

Farven leveres som en 500x koncentreret opløsning som det er nødvendigt at fortynde før brug. Farven kan, såfremt den kun er fortyndet til 100x opløsning (100 mL 500xopløsning fortyndes med 400 mL demineraliseret vand) bruges til hurtig farvning af gelerne. Her kan resultatet ses allerede efter ca. 15 minutter.

Eller man kan fortynde farven til 1x-opløsning (1mL 500xopløsning fortyndes med 499 mL demineraliseret vand) og lade farveprocessen vare natten over.

Når gelen dækkes med farveopløsningen vil de positivt ladede farvemolekyler binde sig til de negativt ladede fosfatgrupper i de Dna-molekyler, der er bundet i gelen. Dermed bliver Dna-båndene synlige og elevernes båndmønstre kan identificeres og sammenlignes med Dna-standarderne.

Den farve, der benyttes er let at arbejde med, ikke giftig og et mere sikkert alternativ end ethidiumbromid, som man traditionelt har arbejdet med. Dna farves dybt blå og efterfølgende kan gelen rimelig nemt gemmes.

ADVARSEL

Selv om den benyttede farve ikke er giftig eller carcinogent anbefales det, at der bæres handsker for at undgå at blive farvet blå. Tilsvarende er det en fordel at bære kittel, så der ikke kommer blå farve på ens tøj.

Skulle der komme farve på tøj eller bordplader e.l., tørres dette let af med sprit.

Bemærkninger:

Til en gel på 7x10 cm bruges ca. 120mL farveopløsning. Det vigtigste er, at gelen er helt dækket med farveopløsning.

Inden farvningen tages gelen ud af elektroforeseapparatet og lægges forsigtigt over i et lille kar. Gelen er meget glat, hvorfor dette punkt skal udføres med forsigtighed, så gelen ikke går i stykker.

Ved langsom farvning, hvor gelen står natten over, kan det anbefales at benytte et rystebord, da de mindste bånd har en tendens til at diffundere væk, hvis der ikke rystes.

Affarvningen sker med varmt vandhanevand, men kan forbedres med affarvning ca. 5 sekunder med 70 % sprit.

Såfremt, man benytter den langsomme farvning, er affarvning ikke nødvendig.

Elektroforese med polyacrylamidgeler

Materialer:

TBE færdigstøbte geler (katalognr. 161-1110EDU)

10x TBE-buffer

Måleglas

Lodret elektroforeseapparat

Specialspidser til påsætning af prøver (lange spidser)

skalpel

Gelerne indkøbes først 2-3 uger før forsøget. Efter modtagelse opbevares de i køleskab (**ikke fryser**). De TBE-geler der bruges til DNA-analyser er ikke de samme som de 15% SDS-geler, der benyttes til proteinanalyser.

Åbn gel-pakken over en vask og lad den overskydende buffer dryppe af. Brug en skalpel e.l. til at skære langs den sorte linje nederst på gel-kassetten. Tjek at hele gelens bund er fri for tape, således at hele bunden kan føre strømmen.

Klargøring af det lodrette elektroforesekar:

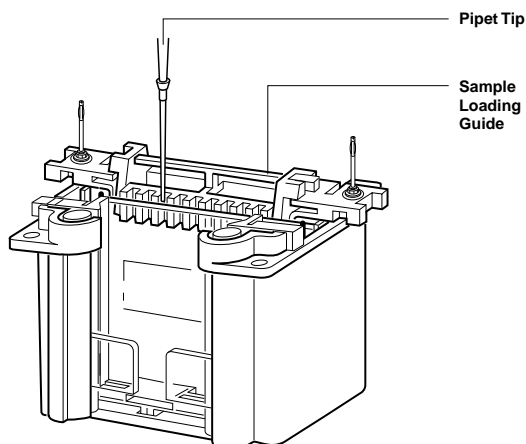
(Læs nærmere i Appendiks G i den engelske manual)

1

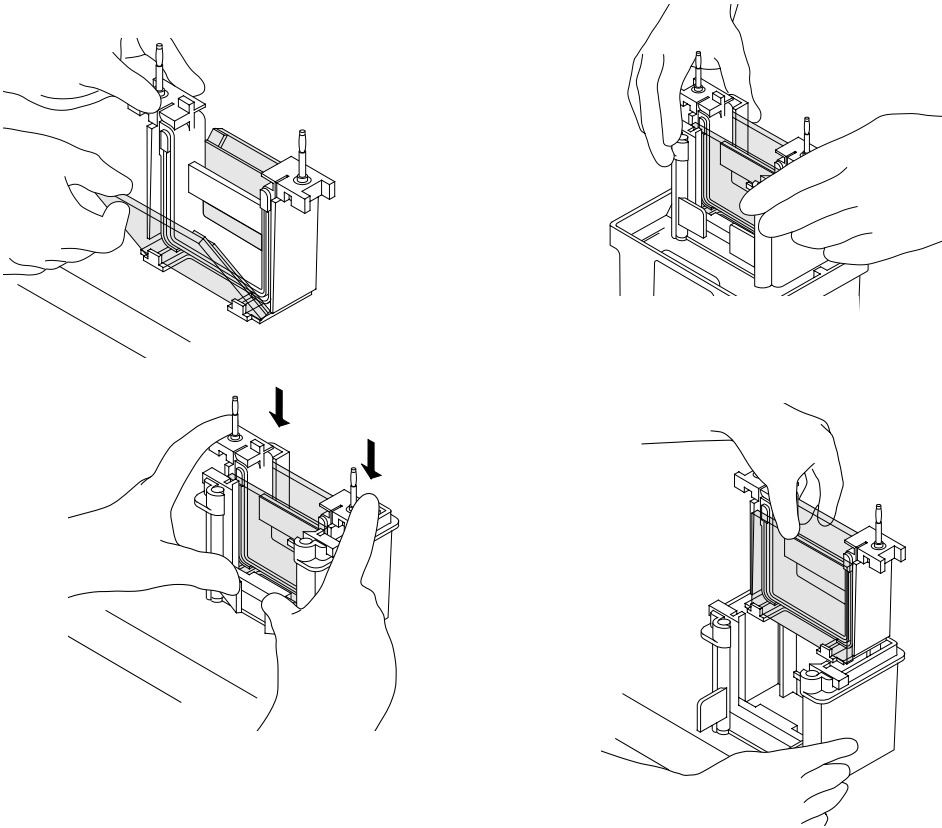
Fjern kammen fra den færdigstøbte gel og skær og fjern tapen langs kassetten bund, som beskrevet ovenfor.

2

Hvis der skal køre 2 geler samtidig i et elektroforesekar placeres kassetterne på hver side af elektrodesamlingen. Hvis der kun skal køre én gel placeres denne på den ene side af elektrodesamlingen og med bufferområdet til den anden side. Sørg for at der står "BUFFER DAM" mod indersiden



Hvordan det lodrette kar samles ses på nedenstående figurer. I øvrigt henvises til den engelske manual.



Påsætning af prøver og selve elektroforesen

1

Hvis man har en gul prøvepåsætningshjælper sættes denne på toppen af elektroforeseapparatet. Den hjælper med at styre pipetten til den korrekte position ved prøvepåsætning

2

Brug særlige Prot/Elec spidser til prøvepåsætningen. Disse meget tynde lange spidser kan smyge sig ned mellem gelpladerne og sikre at prøverne havner i brønden. Hvis man ikke har de særlige spidser holdes spidsen direkte over brønden således at prøver falder lodret ned i brønden.

3

Gelen kører ved 200V i 30 minutter. Hvis den røde farve når ned 2cm fra bunden stoppes elektroforesen

4

Sluk for strømforsyningen og fjern ledningerne. Løft elektrodedelen ud.

5

Hæld bufferen fra. Fjern gelen/erne fra kassetten.

6

Bær handsker!

Læg gelkassetten fladt på bordet med den korte plade opad. Skær langs siderne af gelkassetten. Adskil forsigtigt pladerne, eventuelt ved brug af en spatel. Gelen vil oftest klæbe til den ene af pladerne.

Flyt den plade, hvor gelen klæber til et farvekar med 1x Fast Blast Dna-farve. Væske vil bevirke at gelen slipper den anden plade. Gelen ligger nu i farveopløsningen.

Farvning af polyacrylamidgeler

Farven fortyndes til 1x-opløsning (1 mL 500xopløsning fortyndes med 499 mL demineraliseret vand). Selve farveprocessen varer 30 minutter.

Når gelen dækkes med farveopløsningen vil de positivt ladede farvemolekyler binde sig til de negativt ladede fosfatgrupper i de Dna-molekyler, der er bundet i gelen. Dermed bliver Dna-båndene synlige og elevernes båndmønstre kan identificeres og sammenlignes med Dna-standarderne.

ADVARSEL

Selv om den benyttede farve ikke er giftig eller carcinogent anbefales det, at der bæres handsker for at undgå at blive farvet blå. Tilsvarende er det en fordel at bære kittel, så der ikke kommer blå farve på ens tøj.

Skulle der komme farve på tøj eller bordplader e.l., tørres dette let af med sprit.

Før lektion 4:

Tørring og opbevaring af gelerne:

Gelerne kan opbevares hvis de bliver placeres mellem 2 OH-transparanter. Inden man gemmer gelerne fx i køleskabet kan de fotokopieres, så alle får en kopi af deres resultater.

Der kan også købes specielle cellofan-ark, som kan bruges til tørring og opbevaring af gelerne. Se mere herom i den engelske manual.

Resultater:

Typiske resultater:

PCRprøve

Spor 1: Non-GMO fødevarer med planteprimere
 Spor 2: Non-GMO fødevarer med GMO-primere
 Spor 3: Fødevaretest med planteprimere
 Spor 4: Fødevaretest med GMO-primere
 Spor 5: GMOpositiv skabelon med planteprimere
 Spor 6: GMO-positiv skabelon med GMO-primere
 Spor 7: PCR molekylærlineal

Båndstørrelse

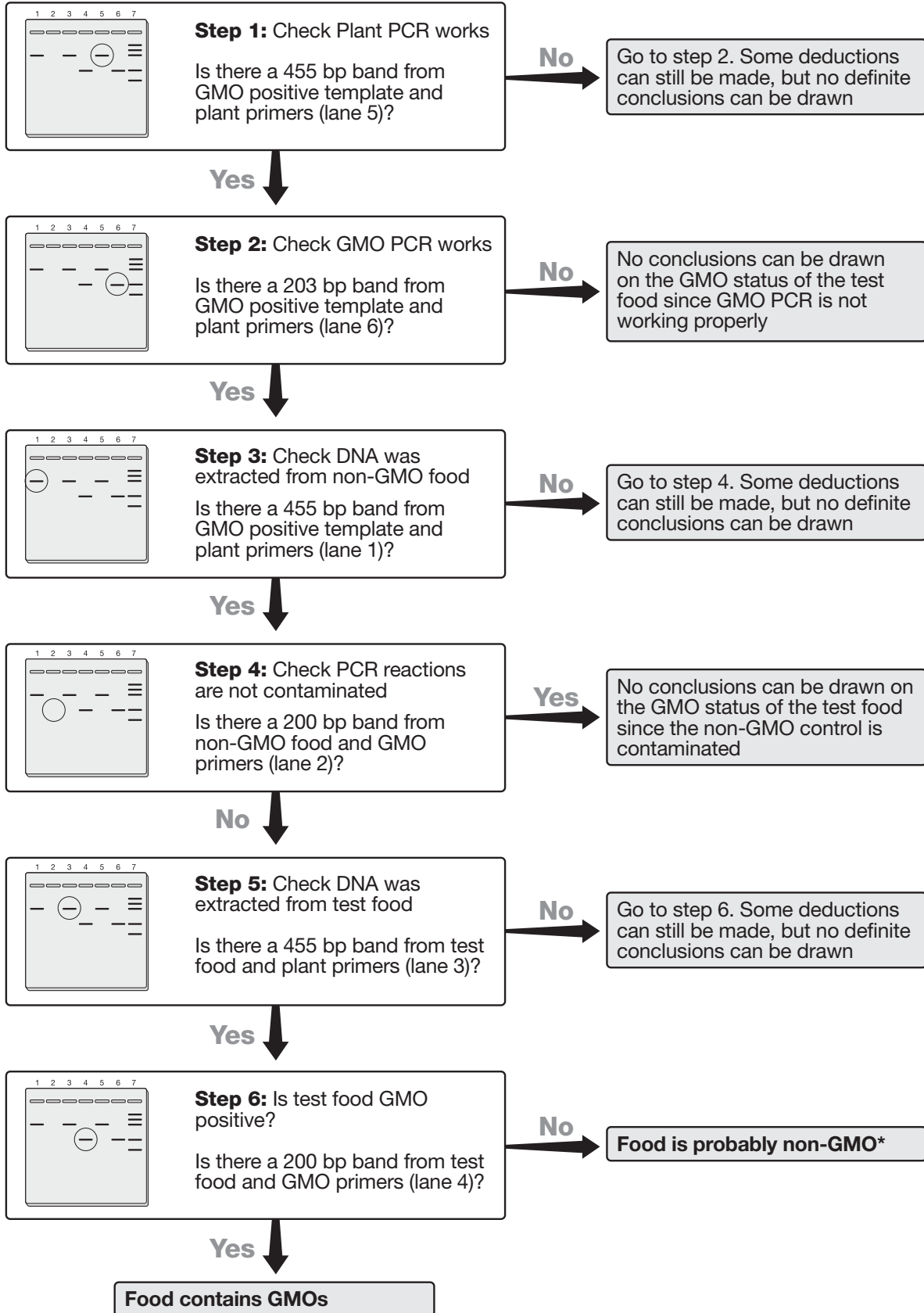
455 bp
 Ingen bånd
 455 bp
 200 bp eller ingen bånd
 455 bp
 200 bp
 1000, 700, 500, 200, 100 bp

Tilstedeværelsen eller fraværet af 200bp-båndet i bane 5 indikerer hvorvidt prøven indeholder GMO'er eller ej. Selve resultatet afhænger ikke desto mindre af resultaterne fra de andre PCR-reaktioner.

Planteprimerne bestemmer hvorvidt plante DNA blev ekstraheret fra prøven eller ej.

Non-GMO Fødevarekontrollen er indikator for hvorvidt der forekommer falske eller positive resultater. Hvis den viser sig som GMO-positiv (dvs. der kommer et bånd i spor 2) betyder det at PCR var kontamineret på en eller anden måde. Hvis den prøver, der testes også er GMO-positiv, kan man ikke stole på resultatet.

GMO-positiv skabelonkontrollen er indikator for falske negative. Hvis denne ikke amplificeres, er der problemer med PCR-reaktionen og man kan ikke stole på et GMO-negativt resultat fra prøven. Skemaet viser ovenstående i oversigtsform.



Elevvejledning

Lektion 1

Ekstraktion af DNA fra fødevareretests

Materialer på eleverarbejdspladserne:

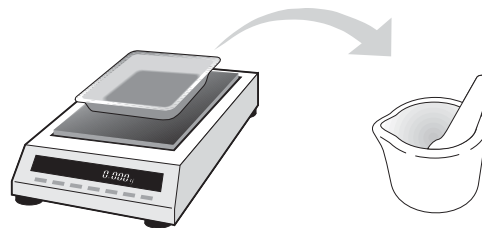
Skruelågsrør med 500µL InstaGene matrix	2
Bægerglas med demineraliseret vand	1
Pipetter	2
Morter og pistil	1
Fødevarerprøver med og uden GMO	1-8
Flamingoflyder	
Mærkepen	

Fælles:

Vandbad 95-100°C
Mikrocentrifuge
Vægt og vejeskåle

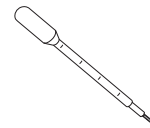
1
Find jeres skruelågsrør og mærk det ene ”non-GMO” og det andet ”test”

2
Afvej 0,5-2,0g non-GMO fødevarer og put det i morteren



3
Tilsæt 5 mL demineraliseret vand for hver gram fødevarer

Fødevarevægt = ____g x 5 = _____mL vand



4
Mos med pistillen prøven i mindst 2 minutter, så der dannes en grødagtig masse



5
Tilsæt samme mængde vand igen og mos videre indtil massen er flydende nok til at afpipettere.

6

Afpipetter 50µL af blandingen til skruelågsrøret, der er mærket ”non-GMO”. I dette rør er der allerede 500µL InstaGenemix.

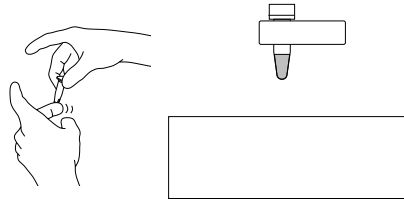


7

Gentag punkt 2-5 med den fødevare, der skal testes for indhold af GMO.

8

Overfør 50 µL af testblandingen til skruelågsrøret, der er mærket ”test”

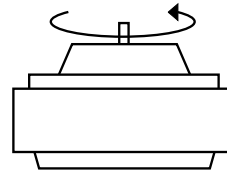


9

Ryst og knips på de to rør for at blande. Stil rørene i en flyder i vandbadet på 95°C i 5 minutter

10

Centrifuger rørene i 5 minutter ved max. hastighed (12.000 rpm). Sørg for at rørene sidder symmetrisk og afbalanceret i centrifugen.



11

Gem rørene i køleskabet til næste lektion

Lektion 2 PCR-reaktionen

Før lektion 2:

Materialer	i alt	pr. gruppe
Skruelågsrør	26	
PCR-rør	48	
Adaptorer til PCR-rør (eppendorfrør uden låg)	48	
Mastermix		
GMO primere (rød)		
Plante PSII primere (grøn)		
GMO-positiv DNA-skabelon		
Elevprøverne fra forrige lektion		2
Pipetter 2-20µL	8	1
Spidser – med aerosolbarriere	8 æsker	1 æske
Isbad	8	1
Holdere til rørene	8	1
Mærkepenne	8	1

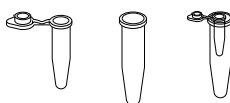
1

Nummerer PCR-rørene fra 1-6. Numrene refererer til følgende indhold:

PCR-rørnummer	Mastermix	DNA
1	20µL Plante MM (grøn)	20 µL non-GMO fødevarekontrol DNA
2	20 µL GMO MM (rød)	20 µL non-GMO fødevarekontrol DNA
3	20 µL Plante MM (grøn)	20 µL Fødevaretest DNA
4	20 µL GMO MM (rød)	20 µL Fødevaretest DNA
5	20 µL Plante MM (grøn)	20 µL GMO-positiv kontrol-DNA
6	20 µL GMO MM (rød)	20 µL GMO-positiv kontrol-DNA

2

Stil hvert PCR-rør i et eppendorfrør uden låg og placer rørene i en skumholder på is

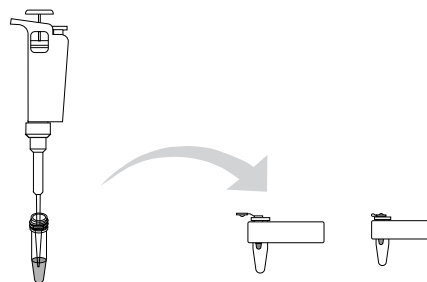


3

Idet I følger ovenstående oversigt tilsættes 20µL af den nævnte mastermix til hvert PCR-rør.

Luk PCR-rørene

Husk at skifte pipettespids for hvert nyt rør.



4

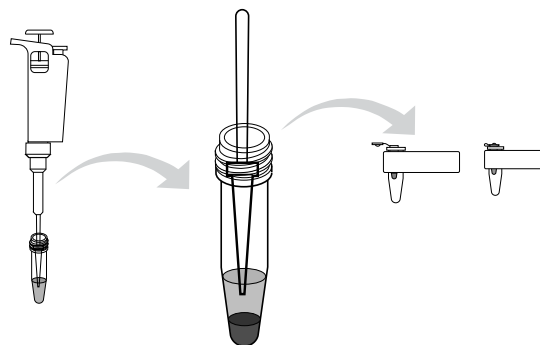
Idet I igen følger ovenstående oversigt tilsættes 20 µL af det nævnte DNA til hvert PCR-rør.

Husk at skifte pipettespids for hvert nyt rør.

Undgå at få InstaGene pellet fra bunden med op.

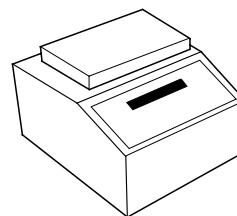
Bland forsigtigt ved at suge op og ned med pipetten.

Luk PCR-rørene.



5

Stil PCR-rørene i termalcyklere og start PCR-reaktionen.



Lektion 3

Elektroforese af PCR-produkterne

Fordel materialer til eleverarbejdspladserne:

Gel	1
Prøver fra forrige lektion	6
Elektroforesebuffer	350 mL
Orange G loading farve	1
PCR molekylærlineal	1
Pipette 2-20 μ L	1
Pipettespiser med aerosolbarriere	1

Fælles:

Elektroforeseapparat
Strømforsyning
Farve
Kar til farvning

1

Gør elektroforeseudstyret klar.

2

Tag jeres PCR-rør fra PCR-maskinen og placer hvert af rørene i et eppendorfrør uden låg.

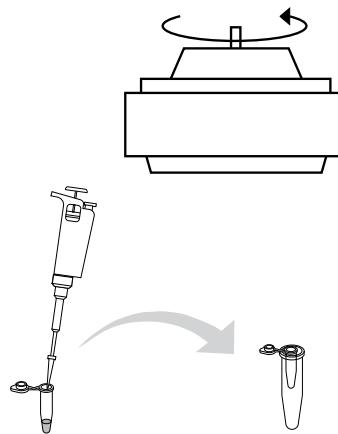
Centrifuger kort i 3 sekunder

3

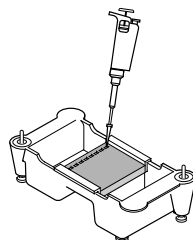
Idet der benyttes en **ny** pipettespids hver gang, tilsættes 10 μ L Orange G loading farve til hvert rør og bland godt.

4

Sæt prøverne samt molekylærlinealen på gelen idet følgende skema følges:

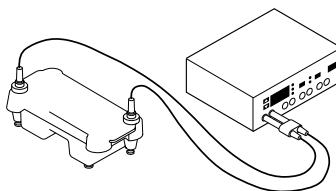


Spør	Prøve	Volumen
1	Prøve 1: Non-GMO fødevarer med planteprimere	20 μ L
2	Prøve 2: Non-GMO fødevarer med GMO-primere	20 μ L
3	Prøve 3: Fødevaretest med planteprimere	20 μ L
4	Prøve 4: Fødevaretest med GMO-primere	20 μ L
5	Prøve 5: GMO-positiv DNA med planteprimere	20 μ L
6	Prøve 6: GMO-positiv DNA med GMO-primere	20 μ L
7	PCR molekylærlineal	20 μ L
8	Tom brønd	



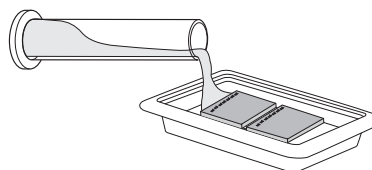
5

Start elektroforesen. Spænding og tid vil afhænge af den gelelektroforesetype der benyttes.



6

Farv med Fast Blast Dna-farve



7

Tolk resultatet og tør eventuelt gelen.

