

Biotechnology Explorer™

pGLO™ Transformationskit

Katalognummer
166-0003-EDU

explorer.bio-rad.com

Dette kit skal opbevares ved stuetemperatur

Kopiering af enhver del af dette dokument er kun tilladt til undervisningsbrug



Brugen af dette kit til undervisningsbrug skal varetages af en biologilærer, som har en biologisk uddannelsesbaggrund, der mindst svarer til biologi som sidefag med mikrobiologi og som har gennemført en af Arbejdstilsynet godkendt efteruddannelse i eksperimentel genteknologi.

Ved brug i forbindelse med tværfagligt samarbejde skal det præciseres, at genteknologiske forsøg altid skal ske under ledelse af den ansvarlige biologilærer, som også er den lærer, der underskriver indberetningsskemaet sammen med rektor/forstander.

Indberetningen skal sendes til UVM SENEST 3 uger forud for arbejdet med eksperimenterne.

Links:

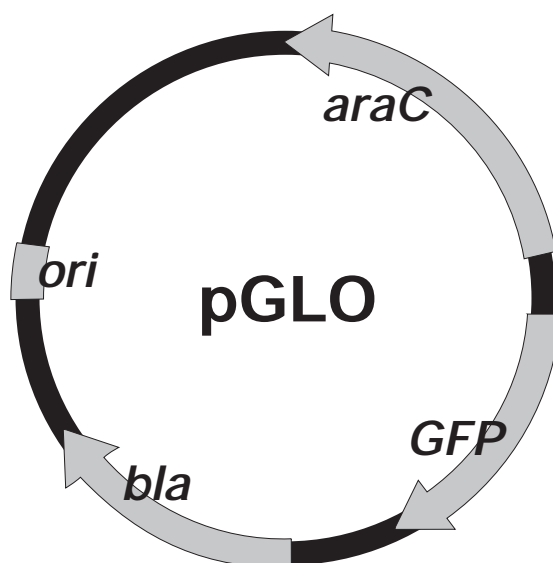
Indberetningsskema:

<http://us.uvm.dk/gymnasie/almen/projekter/biologi/Indbskema.pdf>

Indberetningsskema bilag:

<http://us.uvm.dk/gymnasie/almen/projekter/biologi/Bilag123.pdf>

pGLO systemet:



Med pGLO-transformationskittet kan eleverne på en simpel måde transformere bakterier med et gen, der koder for Grønt Fluorescerende Protein (GFP). Genet stammer oprindeligt fra den lysende gøple *Aequorea victoria*, hvor GFP får gøplen til at fluorescere og lyse i mørke. Ved at følge forskriften for transformationen vil bakterierne blive i stand til at udtrykke det optagne gen fra gøplen og producere det fluorescerende protein, der får dem til at lyse med glansfuld grøn farve under en UV-lampe.

Gennem denne øvelse lærer eleverne om processen, der bruges til at flytte gener fra en organisme til en anden ved brug af et plasmid. Ud over et stort kromosom indeholder bakterier et eller flere små cirkulære stykker DNA kaldet plasmider. Plasmid DNA indeholder gener for en eller flere egenskaber, der kan være gavnlige for bakteriernes overlevelse. I naturen kan bakterier udveksle plasmider, hvorved de kan dele disse gavnlige gener. Derved kan bakterierne tilpasse sig nye omgivelser. Den nyligt opståede resistens mod antibiotika hos bakterier skyldes udveksling af plasmider.

Bio-Rad's enestående pGLO-plasmid indeholder genet for GFP og resistensgenet mod antibiotikaet ampicillin. Desuden indeholder pGLO også et specielt system af reguleringsgener, der kan bruges til at

styre udtrykket af det fluorescerende protein i de transformerede celler. Genet for GFP kan på en ganske simpel måde tændes og slukkes ved at tilføre sukkerstoffet arabinose til næringssubstratet. Udvælgelsen af celler, der er blevet transformerede med pGLO DNA, foretages ved dyrkning på agarplader med antibiotika. Transformerede celler vil forekomme lyse på agarplader uden arabinose og grønt fluorescerende på de agarplader, der indeholder arabinose. Denne enestående måde at konstruere pGLO-plasmidet på, gør det muligt for lærere og elever for første gang at udforske mekanismen for genregulering og genetisk udvælgelse (se Appendiks D) på en ganske simpel måde. Hele processen kan gøres synlig ved brug af en billig langbølget UV-lampe.

En forudsætning, for at eleverne får mest muligt ud af eksperimentet, er, at de har kendskab til gener og sammenhængen mellem gener og proteiner. En mere uddybende forklaring på disse og andre basale molekylærbiologiske begreber og termer kan findes i forskellige lærebøger og Appendiks B

pGLO-transmutationskittet giver desuden mulighed for et forsøg med at oprense det rekombinante fluorescerende protein fra transformerede bakterier ved brug af GFP-kromatografikittet (se kataloget # 166-0005EDU)

Checkliste

Dette afsnit opremser de dele, der findes i bakterie transformationskittet. Desuden angives det nødvendige ekstraudstyr. Hvert kit indeholder materiale nok til at udstyre 8 eleverarbejdspladser. Brug checklisten til at opgøre indholdet i din leverance før forsøget startes. Alle dele i kittet kan opbevares ved stuetemperatur indtil det skal bruges.

Dele i kittet

1. E. coli HB101 K-12, frysetørret	1 glas	<input type="checkbox"/>
2. Plasmid (pGLO), frysetørret, 20 µg	1 glas	<input type="checkbox"/>
3. Ampicillin, frysetørret, 30 mg	1 glas	<input type="checkbox"/>
4. L(+) Arabinose, frysetørret, 600 mg	1 glas	<input type="checkbox"/>
5. Transformationsopløsning (50 mM CaCl ₂ , pH 6,1) steril, 15 mL	1 flaske	<input type="checkbox"/>
6. LB næringsboullion, steril, 10 mL	1 flaske	<input type="checkbox"/>
7. LB næringsagarpulver, steril, (til fremstilling af 500 mL)	1 pose	<input type="checkbox"/>
8. Pipetter, sterile, pakket separat	50 stk	<input type="checkbox"/>
9. Podenåle, sterile, 10 µL, pakker med 10 podenåle	8 pakker	<input type="checkbox"/>
10. Petriskåle, 60 mm, sterile poser med 20 stk	2 pakker	<input type="checkbox"/>
11. Eppendorfrør, 2 mL (10 af hver: gul, grøn, blå, orange, lilla, pink)	60	<input type="checkbox"/>
12. Skumplastholdere til eppendorfrør	8	<input type="checkbox"/>
13. Øvelsesmanual	1	<input type="checkbox"/>

Nødvendigt ekstraudstyr – Findes ikke i kittet

1. UV-lampe – lang bølgelængde (katalog # 166-0500EDU)	1 kræves	<input type="checkbox"/>
2. Stopur eller ur der kan måle 50 sekunder	1 kræves	<input type="checkbox"/>
3. Mikrobølgeovn	1 kræves	<input type="checkbox"/>
4. Varmeskab (37 ° C)	1 kræves	<input type="checkbox"/>

5. Termostatreguleret varmebad	1 kræves	<input type="checkbox"/>
6. Termometer (op til 100° C)	1 kræves	<input type="checkbox"/>
7. 1L-flaske	1 kræves	<input type="checkbox"/>
8. 500 mL gradueret cylinderglas	1 kræves	<input type="checkbox"/>
9. 500 mL destilleret vand	1 kræves	<input type="checkbox"/>
10. Knust is og isoleret beholder	1 kræves	<input type="checkbox"/>
11. 10 mL blegevand (Klorin)	1 kræves	<input type="checkbox"/>
12. Spritpen med vandfast skrift	1 kræves	<input type="checkbox"/>

Laboratorieteknik

Bemærk, at levende bakterier, der indeholder genteknologisk fremstillede plasmider ikke må slippes ud i naturen. Følgende sikkerhedsforskrifter SKAL derfor overholdes:

Arbejd kun på pladser med dækpapir

- Bær kittel
- Opsaml al affald
- Al affald skal destrueres efter forskrifterne
- Rapporter straks ved eventuelt uheld
- Arbejd stille og roligt
- Mad og drikkevarer må ikke indtages i laboratoriet
- Vask hænder, når laboratoriet forlades

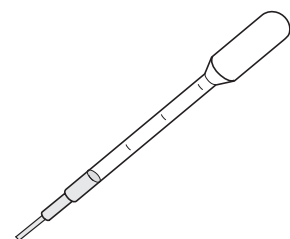
Steril teknik

Ved al mikrobiologisk arbejde er det meget vigtigt, at der ikke sker en kontaminering undervejs. Da der findes kontaminerende bakterier overalt fx på fingrene, bordplader osv. er det vigtigt at undgå dette. Dette kan undgås ved at bordene er dækket, der bæres handsker og kitler og i det hele taget arbejdes sterilt. At arbejde sterilt vil sige hele tiden at bruge sterilt udstyr eller løbende sterilisere det udstyr, der bruges fx podenåle og drigalskispotter.

Brug af de medfølgende pipetter

Inden forsøget påbegyndes gennemgås pipetterne med eleverne. Såvel 250 µL samt 1mL inddelingerne skal benyttes under forsøget.

Har man andre mikropipetter til rådighed kan disse benyttes. Det kræver sterile spidser.



100 og
dog

At arbejde med E. coli

Kittets værtsorganisme er en E.coli K-12 streng . Plasmidet, der bruges, indeholder et rekombineret GFP-protein. Den transformerede organisme er ikke patogen. Det er foreskrevet at ovennævnte sikkerhedsregler overholdes.

Behandling af affald

Alle opløsninger, pipettespidser og andet dekontamineres lettes ved autoklavering. Brug autoklaveposer til opsamling af affaldet, det letter processen.

Har man ikke en autoklave til rådighed kan man benytte et kar med en klorinopløsning. Lad det stå mindst en time eller mere. Efter klorbadningen kan affaldet behandles som normalt affald

UV-lampen

Bemærk UV-lys kan være skadeligt for hud og øjne. Brug kun langbølget UV og bær beskyttelsesbriller

Praktiske råd og vink

Overførsel af bakteriekolonier fra agarpladen til eppendorfrøret

Det kan ofte være svært at afgøre, hvad der er én koloni, men tager man en koloni/bakterieklump på 1mm i diameter har man rigeligt

Overførsel af plasmid

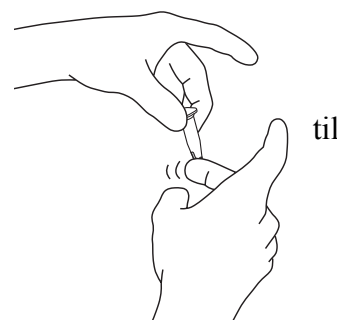
Vær opmærksom på, om eleverne har helt styr på, at der virkelig er en "film" af plasmidopløsning inde i podenålsøjlet!

Varme og kuldechok

Det er vigtigt, at det angivne tider overholdes ellers er der fare for lavere succesrate.

Udpladning af transformanter og kontrol

Eftersom bakterierne nemt samler sig i bunden af eppendorfrøret er det vigtigt, at der knipses på røret inden der skal overføres transformanter petriskålen



LB-mediet

LB mediet og LBagar fremstilles ud fra gærekstrakt og trypton eller pepton (enzymatisk fremstillet kød-biprodukt, der indeholder en blanding af kulhydrater, aminosyrer, nucleotider, salte og vitaminer). Såfremt mediet skal være fast tilsættes agar.

Selektion ved hjælp af antibiotika

pGLO-plasmidet som indeholder GFP genet indeholder også genet for beta-lactamase, som bevirker antibiotikaresistens. Beta-lactamasen inaktiverer den ampicillin, der er i LB-agaren og dette bevirker at bakterierne vokser. Det betyder at kun de transformerede bakterier kan gro på de plader, der indeholder ampicillin.

Transformationsopløsning – CaCl₂-opløsningen

Man mener at vide, at Ca²⁺ ionen neutraliserer de negative ladninger på fosfatribben i DNA og på cellemembranens fosfolipider, med det resultat at DNA kan passere cellemembranen og trænge ind i cellen.

Varmechok

Varmechokket øger cellens permeabilitet for DNA. Man kender ikke mekanismen, men ved at den tid varmechokket varer er af stor betydning.

Lærerens forberedelse

Hvad skal der gøres

Tidsforbrug

Hvornår?

1:		
Støbning af agarplader	1 time	3-7 dage for forsøgets start
2:		
Opløsning af E.coli	2 minutter	24-36 timer før start
Udstrygning af E.coli på agarplader	15 minutter	
Opløsning af plasmid DNA	2 minutter	
3:		
Fordeling af opløsninger	10 minutter	Lige for forsøgets start
Klargøring af gruppearbejdspladser	15 minutter	

3-7 (14) dage for forsøget:

1. Agaren klargøres (bemærk – den skal ikke autoklaveres)

Agaren skal klargøres mindst 3 dage før eleverne skal udføre forsøget.

Efter at agaren er klargjort stilles pladerne ved stuetemperatur i 2 døgn, og derefter i køleskab indtil de skal bruges

Tag en 1 L erlenmeyer kolbe/konisk kolbe og hæld 500 mL demineraliseret vand i.

Tilsæt al agaren (LB Agar Packet).

Ryst kolben for at opløse agaren og opvarm den til kogning i en mikrobølgeovn. **PAS PÅ** – det kan nemt koge over.

Gentag opvarmning og rystning indtil al agaren er opløst – dvs. indtil væsken er helt klar.

Når al agaren er opløst, lader man kolben afkøle, indtil den er håndterbar – dvs. ca. 50°C . Vær opmærksom på, at køles agaren for meget, vil den begynde at størkne.

Imens agaren køles, gøres hhv. arabinosen og ampicillinen klar.

Bemærk: Det er muligt her at dele kittet i 2. Tag fx en steril blue-cap flaske og gem halvdelen af agaropløsningen i denne.

Og vær herefter opmærksom på, at nedenstående mængder hele tiden skal deles i to

2. Pladerne mærkes

De 40 plader mærkes i bunden med en tusch. 16 plader mærkes ”LB”, 16 plader mærkes ”LB/amp” og 8 plader mærkes ”LB/amp/ara”.

3. Klargøring af hhv. arabinose og ampicillinopløsninger

Bemærk: Det tager op til 10 minutter at opløse arabinosen – udvis tålmodighed!

Arabinosen forsendes som tørt pulver i et lille glas (vial).

Tag en ny steril pipette

Tilsæt 3 mL Transformation Solution direkte til arabinosen

Bland grundigt til arabinosen er opløst helt (brug evt. en reagensglasmixer)

Ampicillinen er også tørt pulver i et lille glas.

Tag en ny steril pipette

Tilsæt 1 mL Transformation Solution direkte

Bland grundigt til ampicillinen er opløst

Bemærk: Til opløsning af såvel arabinosen som ampicillinen kan der også benyttes sterilt vand. Her benyttes ”Transformation Solution”, da den allerede er steril og klar til brug.

Har man delt kittet i to, kan arabinoseopløsningen gemmes i køleskab til senere brug og tilsvarende kan ampicillinopløsningen gemmes i fryseren.

Vigtigt: Er agaren over 50°C varm, vil det ødelægge såvel arabinosen som ampicillinen. Derfor er det vigtigt at holde øje med agarens temperatur inden disse stoffer tilsættes.

Omvendt størkner agaren ved 27°C, så man skal heller ikke vente for længe.

Kommer der bobler i agarpladerne, kan disse fjernes ved forsigtig opvarmning med en bunsenbrænder. Når alle agarpladerne er hældt op, skal de forblive stående, indtil de er størknet

4. Støbning af agarpladerne

Først hældes der agar i de plader, der er mærket "LB"

Hver petriskål fyldes med ca. 12 ml agar. Sæt straks låget på og lad pladen stå.

Derefter tilsættes det opløste ampicillin til agaren – bland godt.

De petriskåle, der er mærket "LB/amp" fyldes med ca. 12ml agar med ampicillin. Sæt straks låget på og lad pladen stå.

Til sidst tilsættes det opløste arabinose til LB-amp-agaren

De petriskåle, der er mærket "LB/amp/ara" fyldes med ca. 12 ml. agar. Sæt låg på og lad pladerne stå stille, indtil de er størknet.

5. Opbevaring af pladerne

Når pladerne er størknet, stakkes de og man lader dem stå ved stuetemperatur i 2 dage. Herefter kan stakkene puttes i forseglede plastposer og stilles i køleskab indtil brug. VIGTIGT: I køleskabet skal de stå med bunden i vejret for at undgå kondensproblemer.

Kan opbevares i op til 2 uger i køleskabet.

24-36 timer før forsøget:

1. Opløsningen af bakterierne

De frysetørrede bakterier E. coli HB 101 opløses ved med en steril pipette at tilsætte Transformation Solution direkte til det lille glas.

Luk glasset og lad opløsningen stå ved stuetemperatur i 5 minutter

Ryst glasset

Bakterierne kan nu udstryges på LB-plader

Opbevares i køleskab indtil de skal bruges

2. Udstrygning på plader – for at få enkeltkolonier på agarpladerne.

Hver gruppe har brug for en plade med bakteriekolonier på. De 8 af de ovenfor fremstillede LB plader skal således bruges til bakterieudstrygning..

Efter at bakterierne er strøget inkuberes pladerne i 24-36 timer ved 37 °C

Tag en steril podenål.

Stil podenålen ned i glasset med bakteriopløsningen. (se tegningen)

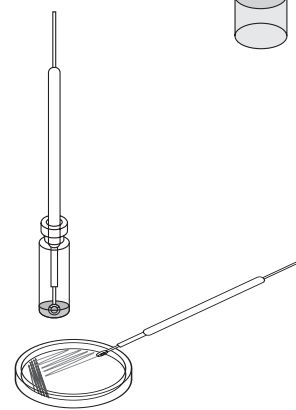
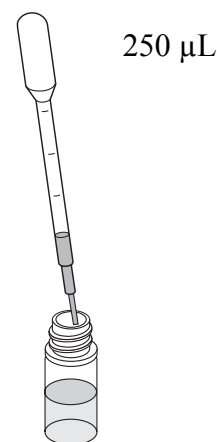
Stryg pladen som vist på tegningerne.

Som det er illustreret på figuren stryges i 4 forskellige kvadranter, dermed opnås en fortynding, som gør det muligt at få enkeltkolonier

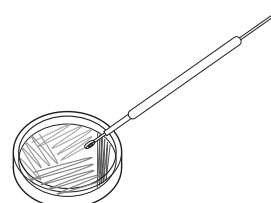
Fremstil så mange plader som det antal grupper du har.

Luk straks pladerne efter udstrygningen

Placer pladerne med bunden opad i varmeskabet og lad dem inkubere



frem.



24-36

timer ved 37 °C.

Undgå at skulle stille pladerne i køleskab før brug

Lige før forsøget:

1. Klargøring af plasmidopløsningen:

Tag en steril pipette

Tilsæt 250 µL Transformation Solution til det lille glas med frysetørret pGLO plasmid DNA (glasset med plasmidet kan synes tomt, det skyldes blot den lille mængde)

Plasmid opløsningen blandes grundigt.

Opløsningen opbevares i køleskab indtil eleverne skal bruge den.

2.

Fordel til hver gruppe 1 ml Transformation Solution (CaCl₂) og 1 ml LB-medium i de forskelligtfarvede eppendorfrør, der følger med kittet. HUSK at mærke rørene.

3. Materialer

Hver gruppe skal have:

1 LB-plade med bakteriekolonier på

Agarplader (1 LB, 2 LB/amp og 1 LB/amp/ara)

LB-medium

1 pakke sterile podenåle

pipetter (5)

1 flamingoflyder

1 bakke med is

tusch til mærkning

Fælles:

pGLO-plasmid

Varmeskab 37 °C

Vandbad 42 °C

Elevejledning pGLO transformation

Introduktion til transformation

I denne øvelse skal du lære fremgangsmåden ved genetisk transformation. Husk på, at et gen er et stykke DNA, der indeholder informationer om (koder for), hvordan et protein skal opbygges. Dette protein giver en organisme en speciel egenskab. Genetisk transformation betyder bogstavelig talt en ændring forårsaget af gener, og involverer indsættelsen af et gen i en organisme for at ændre dens egenskaber. Genetisk transformation bruges på mange områder indenfor bioteknologien. Inden for landbrugsvidenskaben kan man genetisk transformere planter med egenskaber, der giver resistens mod frost, skadedyr og fordærv. Inden for bioremediering kan man transformere bakterier med gener, der gør dem i stand til at nedbryde olieudslip. Indenfor medicin er man begyndt at behandle sygdomme forårsaget af defekte gener med genterapi; dvs. at man transformerer en syg persons celler med raske kopier af det defekte gen, der forårsager sygdommen.

Du vil i denne øvelse komme til at transformere bakterier med et gen, der koder for Grønt Fluorescerende Protein (GFP). Genet stammer oprindeligt fra den bioluminescerende gøple *Aequorea victoria*. Grønt Fluorescerende Protein får goplen til at fluorescere og lyse i mørket. Ved at følge proceduren for transformation, kan bakterierne udtrykke det nyerhvervede gen fra goplen og producere det fluorescerende protein, der får dem til at lyse med en skinnende grøn farve under en UV-lampe.

I denne øvelse vil du lære hvordan man flytter gener fra en organisme til en anden ved hjælp af et plasmid. Ud over et stort kromosom indeholder bakterier et eller flere små cirkulære stykker DNA kaldet plasmider. Plasmid DNA indeholder gener for en eller flere egenskaber, der kan være gavnlige for bakteriernes overlevelse. I naturen kan bakterier udveksle plasmider, hvorved de kan dele disse gavnlige gener. Derved kan bakterierne tilpasse sig nye omgivelser. Den nyligt opståede resistens mod antibiotika hos bakterier skyldes udveksling af plasmider.

Bio-Rad's enestående pGLO-plasmid indeholder genet for GFP og resistensgenet mod antibiotikaet ampicillin. Desuden indeholder pGLO også et specielt system af reguleringsgener der kan bruges til at styre udtrykket af det fluorescerende protein i de transformerede celler. Genet for GFP kan på en ganske simpel måde tændes og slukkes ved at tilføre sukkerstoffet arabinose til næringssubstratet. Udvælgelsen af celler der er blevet transformerede med pGLO DNA foretages ved dyrkning på agarplader med antibiotika. Transformerede celler vil forekomme lyse på agarplader uden arabinose og grønt fluorescerende på de agarplader, der indeholder arabinose.

Du får stillet værktøj, materialer og vejledning til rådighed med henblik på at udføre genetisk transformation af bakterier.

Din opgave bliver nu:

1. At udføre den genetiske transformation
2. At bestemme i hvilken grad du har været i stand til at ændre en organisme genetisk.

Elevejledning

Materialer

Hver gruppe skal have:

1 LB-plade med bakteriekolonier på

Agarplader (1 LB, 2 LB/amp og 1 LB/amp/ara)

LB-medium
1 pakke sterile podenåle
pipetter (5)
1 flamingoflyder
1 bakke med is
tusch til mærkning

Fælles:

pGLO-plasmid
Varmeskab 37 °C
Vandbad 42 °C

VIGTIGT – VIGTIGT - VIGTIGT

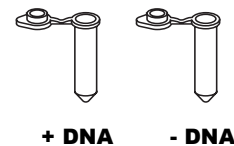
Bemærk, at levende bakterier, der indeholder genteknologisk fremstillede plasmider ikke må slippes ud i naturen. Følgende sikkerhedsforskrifter SKAL derfor overholdes:

Arbejd kun på pladser med dækpapir

- Bær kittel
- Opsaml al affald
- Al affald skal destrueres efter forskrifterne
- Rapporter straks ved eventuelt uheld
- Arbejd stille og roligt
- Mad og drikkevarer må ikke indtages i laboratoriet
- Vask hænder, når laboratoriet forlades
- Brug beskyttelsesbriller, når du bruger UV-lys

1.

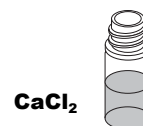
Mærk et lukket eppendorfrør ”+DNA” (eller ”+plasmid DNA”) og et andet ”-DNA” (eller ”-plasmidDNA”)
Mærk også rørene med jeres gruppes navn.
Stil rørene i flamingoholderen



2.

CaCl₂ åbner cellemembranen og gør cellerne kompetente:

Åbn rørene og overfør 250µL Transformation Solution (CaCl₂) til hvert rør



3.

Væsken køles, så den er kold, når bakterierne tilsættes.

Dermed er det lettere at arbejde sterilt

Placer rørene på isbadet.



4.

Overførsel af bakterier til eppendorfrør:

Tag en steril podenål.

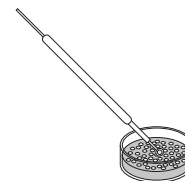
Saml én enkelt bakteriekoloni op.

Tag røret mærket ”+DNA” og overfør kolonien til røret.

Sno podenålen mellem dine fingre, til hele kolonien er opblandet

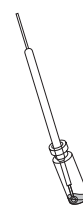
Stil røret tilbage i flamingoholderen.

Gentag med en ny koloni til røret ”-DNA”



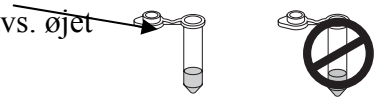
5.

Plasmidet undersøges og tilsættes:



Test pGLO plasmidopløsningen med UV-lampen
Noter resultatet.

Tag en ny steril podenål. Tag en loop-fuld plasmidopløsning (dvs. øjet



skal

være fyldt ud med væske)

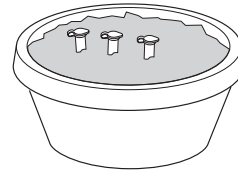
Tilsæt plasmidet til røret mærket ”+DNA”
+DNA - DNA Bland godt!

6.

Cellerne gøres klar:

Lad først rørene stå på is i 10 minutter.

Se efter at rørene virkelig er nede i isen



7.

Klargøring af pladerne:

Mens rørene står på is gøres agarpladerne klar.

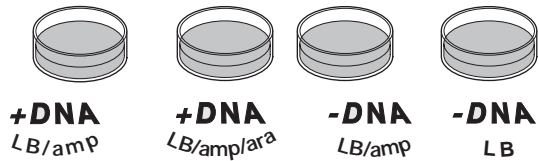
Mærk de 4 plader som følger:

1 LB/amp plade mærkes ”+ DNA”

1 LB/amp/ara plade mærkes ”+DNA”

1 LB/amp plade mærkes ”-DNA”

1 LB plade mærkes ”-DNA”



8.

Cellerne udsættes nu for et varmechok, der bevirker at membranerne åbnes:

Overfør flamingoholderen med rørene fra isbadet til varmebadet på 42 °C i **nøjagtig 50 sekunder**

Se efter at rørene virkelig er nede i varmebadet!

Før straks rørene tilbage til isbadet.

Lad rørene stå i isbadet i **præcis 2 minutter!**

IS → 42°C → IS

9.

Der tilsættes næringsmedium, for at hjælpe celle-væksten i gang.

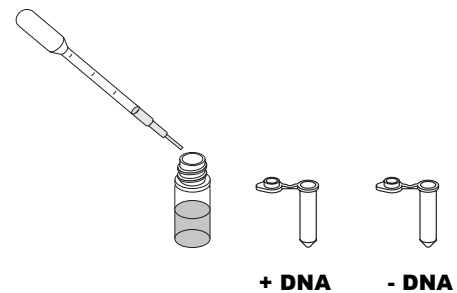
Tag flamingoholderen med rørene op af isbadet

og lad det stå ved stuetemperatur

Tag en steril pipette og tilsæt 250µL LB-medium til røret mærket ”+DNA”

Tag en ny steril pipette og tilsæt 250µL LB-medium til det andet rør.

Lad rørene inkubere i 10 minutter ved stuetemperatur.



10

Overførsel af bakterier til agarpladerne:

Knips på de lukkede rør for at blande godt

Tag en ny steril pipette til hvert rør og

Spred 100µL bakterierne på de rette mærkede plader

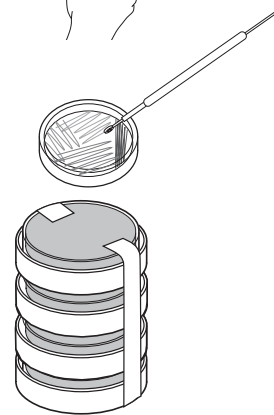


11.

Bakterierne spredes:

Tag en ny steril podenål for hver plade.

Med let hånd spredes bakterierne – se tegningen.



12.

Bakterievækst – bakterierne vokser bedst ved 37 grader:

Stak jeres plader og samle dem evt. med malertape.
Stil dem med bunden i vejret i varmeskabet ved 37°C
Lad dem inkubere til næste dag – evt. lidt længere.