



Biotechnology Explorer®

Green Fluorescent Protein (GFP)

Oprensningsskit

Katalognummer
166-0005-EDU

www.bio-rad.com



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)

4006099

**Oversat og bearbejdet af Birgit Sandermann Justesen,
Nærum, juli 2005**

Kopiering 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>

Tjekliste

Kittets dele

Modul 2 – oprensning

| | | |
|--|-------------|--------------------------|
| Ampicillin frysetørret | 1 glas | <input type="checkbox"/> |
| Arabinose frysetørret | 1 glas | <input type="checkbox"/> |
| LB-medium tabletter | 1 tablet | <input type="checkbox"/> |
| Podenåle | 2 pakker | <input type="checkbox"/> |
| Sterile plastpasteurpipetter | 40 | <input type="checkbox"/> |
| Eppendorfrør – 2mL klar plast | 30 | <input type="checkbox"/> |
| Kulturrør, sterile 15 mL | 1 pk med 25 | <input type="checkbox"/> |
| Opsamlingsrør, 5mL, polystyren | 25 | <input type="checkbox"/> |
| TE buffer (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8,0 steril) | 1 flaske | <input type="checkbox"/> |
| Lysozym – frysetørret | 1 glas | <input type="checkbox"/> |
| Bindingsbuffer (4M (NH ₄) ₂ SO ₄)/TE/pH8,0) | 1 flaske | <input type="checkbox"/> |
| Ligevægtsbuffer (2M (NH ₄) ₂ SO ₄)/TE/pH 8,0) | 1 flaske | <input type="checkbox"/> |
| Vaskebuffer (1,3M (NH ₄) ₂ SO ₄)/TE/pH 8,0) | 1 flaske | <input type="checkbox"/> |
| HIC kromatografi søjler | 8 | <input type="checkbox"/> |
| Søjler og hætter | 1 pose | <input type="checkbox"/> |
| Skumholder | 8 | <input type="checkbox"/> |

Nødvendigt udstyr

| | | |
|---|---------|--------------------------|
| Plader med transformerede bakterier fra pGLO transformations kittet | | <input type="checkbox"/> |
| UV-lampe | | <input type="checkbox"/> |
| Mikrobølgeovn | | <input type="checkbox"/> |
| 1L erlenmeyerkolbe eller BlueCap | 1 | <input type="checkbox"/> |
| 250 mL erlenmeyerkolbe eller BlueCap | 1 | <input type="checkbox"/> |
| 100 mL og 250 mL målecylindere | 1 | <input type="checkbox"/> |
| Destilleret eller demineraliseret vand | 2 liter | <input type="checkbox"/> |
| Varmeskab 37°C | | <input type="checkbox"/> |
| Termometer | 1 | <input type="checkbox"/> |
| Centrifuge | 1 | <input type="checkbox"/> |
| Bægerglas med vand til at rense pipetter | 1 | <input type="checkbox"/> |
| Klor | | <input type="checkbox"/> |
| Sakse | 8 | <input type="checkbox"/> |
| Farvepenne | 8 | <input type="checkbox"/> |
| Bagepapir | 8 stk | <input type="checkbox"/> |
| Køleskab | | <input type="checkbox"/> |
| Fryser | | <input type="checkbox"/> |
| Eventuelt et rystebord | | <input type="checkbox"/> |

Oversigt over undervisningsforløbet

1. lektion:

Indledende teori om søjleoprensning

2. lektion

Podning og vækst af cellekulturer

For at eleverne kan gå i gang, har de brug for 2 plader med cellekulturer hhv. en LB/amp/ara og en LB/amp plade fremstillet ved forsøget ”pGLO transformations kit”

3., 4 og 5. lektion

Oprensning af GFP - forsøgsgange

De bakterier, der indeholder GFP, isoleres fra pladen og opformeres i LB næringsmedium. Ved hjælp af en simpel teknik, hvor der bruges kromatografisøjler, er det nu muligt at adskille kontaminerende bakterieproteiner fra GFP. Hvis GFP skal bruges i videre forskning skal det testes.

Lærerens forberedelsesoverblik:

| Hvad skal der gøres | Hvornår | Tidsforbrug |
|----------------------------------|----------------------------|---------------|
| Læse vejledningen | Straks | 1 time |
| Fremstilling af medier | 2-5 dage før 1. forsøgsdag | 15 minutter |
| Klargøring af elevarbejdspladser | Inden forsøgsstart | 5 min pr gang |

Oversigt side 5 i engelsk manual indsættes her

Lærerens forberedelse

I dette afsnit beskrives lærerens forberedelser op til de enkelte forsøgslektioner

Lektion 2:

Hvad skal der gøres:

- Fremstille vækstmedium
- Gøre klar til forsøget

Vigtigt: Arbejd sterilt.

Klargøring af ampicillin og arabinoseopløsningerne:

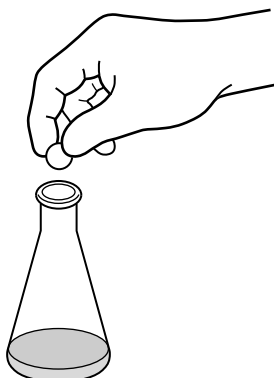
Ampicillin og arabinose sendes tørret i små glas. Efter at de er blevet rehydreret skal de begge tilsættes til den smeltede agar og til vækstmediet. Ampicillin er et antibiotika, der hæmmer væksten af kontaminerende bakterier, som måtte komme fra omgivelserne. Arabinose er en sukker, som påvirker promotoren og dermed starter dannelsen af GFP i de klonede celler. Se appendiks A og B

- Med en steril pipette overføres 3 mL TE buffer direkte til glasset med ampicillin. Luk glasset og bland grundigt – brug evt. en vortexer.
- Med en ny steril pipette overføres 3 mL TE buffer til arabinosen og også dette glas blandes grundigt. Det tager ca. 10 minutter for arabinosen at blive opløst.

Fremstilling af LB-medium, næringsmedium

Vigtigt: Der skal arbejdes sterilt, når LB-mediet fremstilles

- Tilsæt 55 mL demineraliseret vand til en 250 mL erlenmeyerkolbe eller BlueCap flaske. Varm op til kogepunktet.
- Læg 1 LB-tablet i flasken og lad tabletten ligge i vandet i adskillige minutter.
- Opvarm til kogepunktet – fx 30 sekunder ad gangen i mikrobølgeovnen, indtil tabletten er opløst og blandingen klar.
- Afkøl til 50°C og tilsæt de resterende 0,5 mL ampicillin og 0,5 mL arabinose til flasken
- Overfør med en steril pipette 2mL af LB-mediet til hvert af de 16 kulturrør. Opbevar kulturrørene i køleskab indtil brug.
- Fyld evt. nogle ekstra kulturrør med LB-medium



Hvad skal der gøres:

- Elevarbejdspladsene klargøres. Hver gruppe skal bruge 2 stk 15 mL's kulturrør med 2mL LB-medium
- Udstyr: rystebord eller rystevandbad

Lektion 3

Hvad skal der gøres:

Rehydrering af lysozym: Tilsæt 1 mL TE buffer til glasset med lysozym. Bland grundigt. Stil på is eller i køleskab indtil brug.

Elevarbejdspladserne klargøres

Lektion 4 og 5

Hvad skal der gøres:

Elevarbejdspladserne klargøres

Om de enkelte trin/lektioner i forsøget

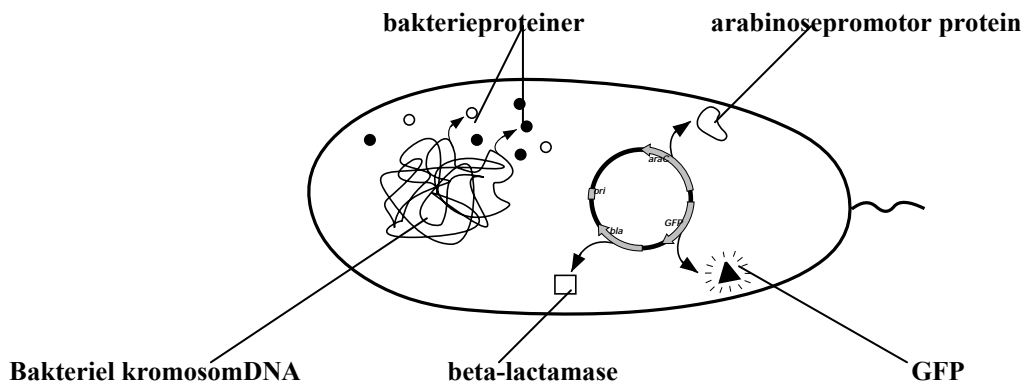
Pipetten

De medfølgende sterile engangsplastpasteurpipetter har inddeling som vist på figuren

PIPETTEBILLEDE

Selektion med antibiotika

pGLO-plasmidet, som indeholder GFP genet, indeholder også genet for beta-lactamase, som gør bakterierne resistente mod antibiotikaet ampicillin. Det vil sige, at kun transformerede bakterier kan vokse på medier indeholdende ampicillin.



Genregulering – operonmodellen

Hvorvidt genet for GFP udtrykkes afhænger af arabinosepromotoren. Det betyder, at kun såfremt der er arabinose i mediet, vil der dannes fluorescerende bakterier, som lyser grønt. Dette kan ses på LB/amp/ara-pladerne. På plader, der kun indeholder LB og ampicillin vokser bakterierne, men lyser ikke grønt. Se appendiks D

I dette kit udnyttes denne egenskab, idet man kan se, at såfremt hvide kolonier dyrkes i LB/amp/ara medium vil bakterierne tænde for GFP-genet. Eleverne vil vække det sovende GFP-gen.

Tilsvarende dyrkes også grønne fluorescerende bakterier i LB/amp/ara medium og her forbliver GFP "vågent". Begge steder vil der kunne observeres lysende grønt.

Isolering af en enkelt bakteriekoloni

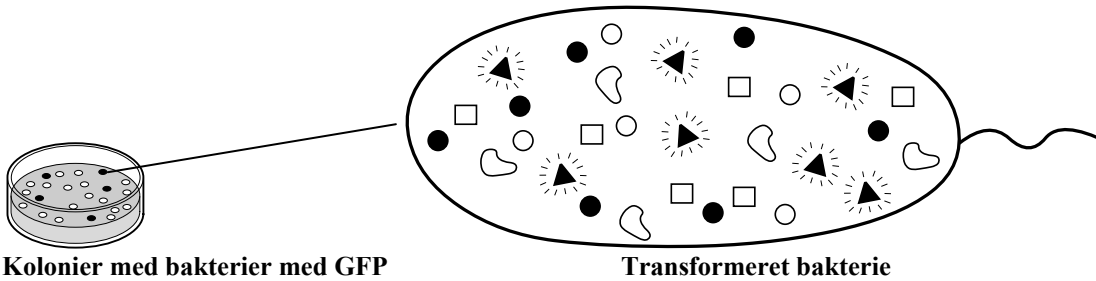
I lektion 3 skal eleverne isolere én enkelt grønt fluorescerende koloni fra deres agarplade. Det er vigtigt, at der arbejdes sterilt og at de er helt sikre på, at den isolerede koloni ikke har berøring med andre kolonier.

Bakteriekolonien overføres til et kulturrør med LB-medium og vokser videre der.

Bakterierne sorteres fra

I lektion 2 skal bakterierne sorteres fra vækstmediet. Dette gøres ved centrifugering.

Efter centrifugeringen ses bakterierne som pellet i bunden af centrifugerøret. Hvis man eksponerer pellet for UV-lys, vil det lyse fluorescerende grønt.

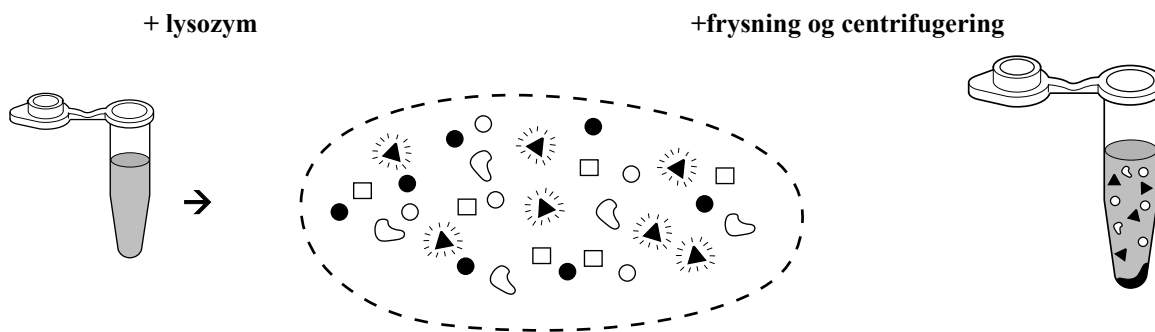


Behandling af bakterierne med lysozym, således at GFP kan frigøres til proteinkromatografi.

Det er vigtigt, at hele pellet resuspenderes i TE buffer.

Frysning og lysozymet ødelægger tilsammen cellevæggene

Lysozymet ødelægger, lyserer, bakteriernes cellevægge, hvorved cellens indhold frilægges og det er fra denne blanding at GFP skal adskilles. GFP er meget mindre end de andre cellekomponenter og vil derfor befinde sig i supernatanten efter centrifugering. Med en steril pipette overføres supernatanten til et nyt eppendorfrør.



Resuspenderet bakteriel pellet

bakteriel pellet med cellevægge og andet

Proteinkromatografi

Bakterierne indeholder tusindvis af forskellige proteiner og GFP skal nu adskilles fra de andre proteiner.

Hydrofobisk Interaktions kromatografi (HIC):

GFP har en stærkt hydrofob overflade og denne egenskab udnyttes ved kromatografien. I søjlerne befinder der sig tæt pakkede hydrofobe perler. Når disse perler befinder sig i saltvand vil hydrofobe proteiner som GFP hæfte sig fast til perlerne, hvorimod andre proteiner vil passere uhindret gennem søjlen. Når saltvandet efterfølgende fjernes vil GFP-strukturen ændres, så de ikke længere er så hydrofobe, hvorfor de vil slippe taget og køre ud af søjlen.

Der benyttes 4 forskellige buffere for at få denne proces til at køre:

Ligevægtsbuffer: Sørger for at der er ligevægt i søjlen før brug

Bindingsbuffer: Tilsættes til bakterie GFP-proteinblandingen, så der opnås samme saltkoncentration som i ligevægtsbufferen

Vaskebuffer: Sørger for at ikke bundne eller svagt bundne proteiner vaske ud af søjlen

Udvasknings buffer (elueringsbuffer): Løser GFP fra søjlens materiale, så GFP kan opsamles.

Vigtige tricks:

1

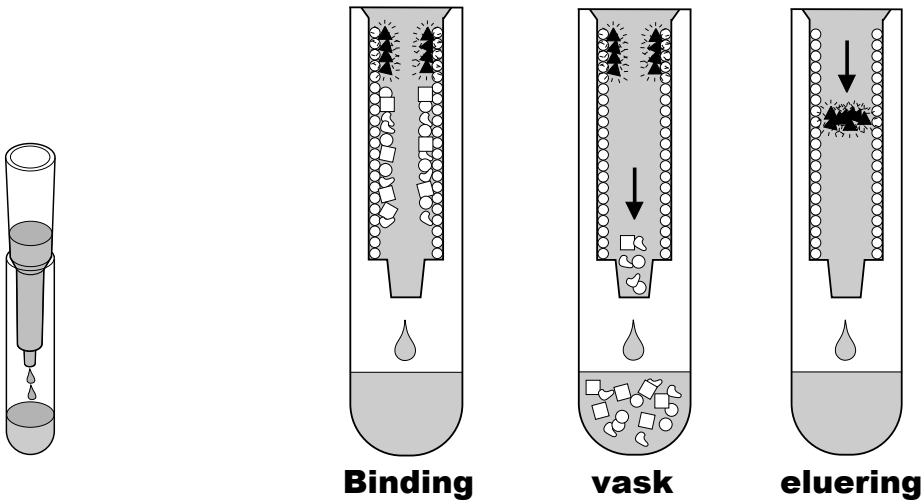
Placer forsigtigt søjlen i et opsamlingsrør. Søjlen og opsamlingsrøret må ikke lukke for tæt sammen, da det vil forhindre væskestrømmen. Sæt evt. et lille stykke papir mellem de to.

2

Flowhastigheden ved elution (udvaskningen) af GFP kan øges ved at sætte top-låget tæt fast på søjlen. Derved opstår der et tryk, der presser væsken igennem

3

Søjlerne er designet til at dryppe roligt. Hele kromatografiprocessen bør tage 20-30 minutter. Det er vigtigt at der **ikke** flyttes på søjlerne, når processen er i gang



Efter forsøget

Alle materialer, der har haft berøring med bakteriekulturene skal efter forsøget destrueres. Brugte pipettespidser mm. autoklaveres. Bakteriekulturene kan slås ihjel ved at blive lagt i klor-bad 1-2 dage.

Elevvejledning

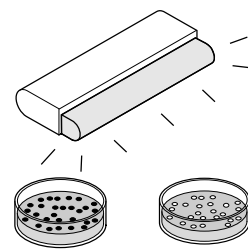
Screening af bakteriekulturene og videre vækst i flydende medium – lektion 3:

1

Tag pladerne ud af varmeskabet og tjek resultatet vha. UV-lampen.

Find på LB/amp/ara pladen grønne fluorescerende kolonier, der ikke rører andre kolonier. Mærk disse kolonier med en tusch på pladens bund.

Mærk med en anden farve tilsvarende flere hvide kolonier på LB/amp-pladen



2

Tag 2 kulturrør med LB-medium. Mærk de to rør hhv. ”+” og ”-”.

3

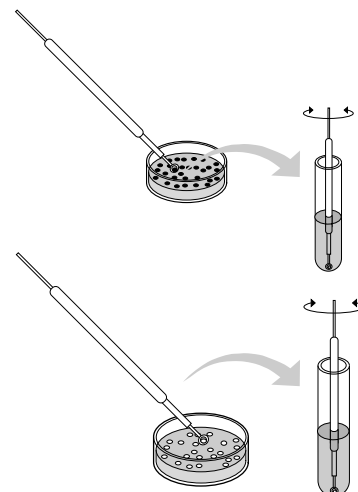
Overfør med en steril podenål en grøn koloni til kulturrøret mærket ”+”.

”+”.

Lad podenålen sno mellem dine fingre, så hele kolonien overføres til glasset.

4

Overfør med en **ny** steril podenål en hvid koloni til røret mærket ”-”. Lad podenålen sno mellem dine fingre, så hele kolonien overføres til glasset.



5

Luk rørene og stil rørene i rystevandbad ved 32°C og inkuber i 24 timer eller inkuber ved stuetemperatur i 2 dage, helst på rystebord

→ 32°C

Opkoncentrering af bakterier – klargøring til oprensning af GFP

1

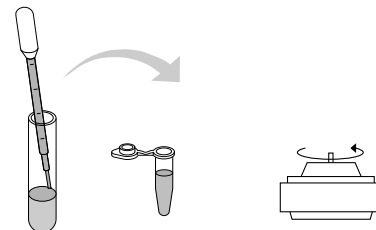
Mærk et eppendorfrør med ”+” samt dit navn.

Tag kulturrørene fra rystebadet og se på rørene i UV-lys. Noter resultatet.

2

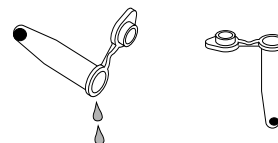
Overfør 2 mL fra røret mærket ”+” til eppendorfrøret mærket ”+”.

Centrifuger i 5 minutter ved 10000rpm. Rens pipetten med vand og brug den i de følgende trin



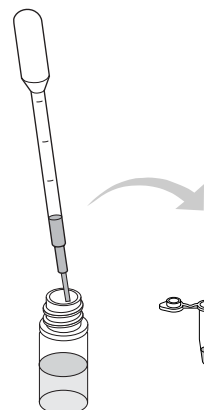
3

Hæld supernatanten fra og observer pellet under UV-lys



4

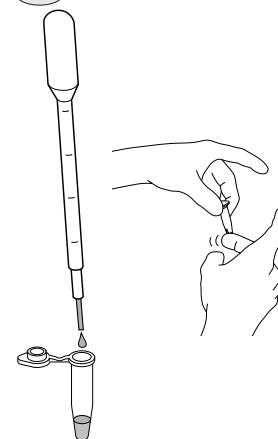
Overfør 250µL TE buffer. Resuspender pellet grundigt ved at suge op og ned med pipetten



5

Med en ren pipette tilsættes 1 dråbe lysozym til det resuspenderede pellet. Bland indholdet grundigt ved at knipse på røret.

Kig på røret under UV-lys.



6

Put røret i fryseren indtil næste gang. Den lave temperatur får cellerne til hurtigt at gå i stykker i cellemembranen

Frys

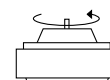
Andet trin i klargøringen til oprensning af GFP – bakteriel lysering

1

Tag eppendorfrøret fra fryseren og tød det ved at holde det i hånden.

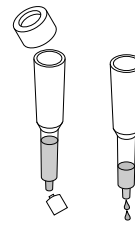
Centrifuger i 10 minutter ved 10.000 rpm

Tød →



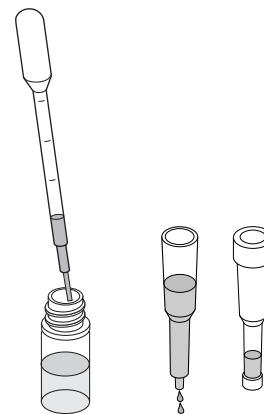
2.

Gør søjlerne klar: Fjern toppen og knæk bunden af. Lad al væske løbe ud af søjlen. Det tager ca. 3-5 minutter



3

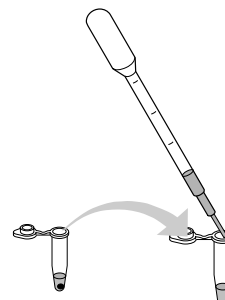
Gør søjlerne klar ved at tilsætte 2mL ligevægts buffer. Tilsæt 1 mL ad gangen. Lad bufferen løbe igennem indtil den øverste kant når 1mL mærket. Sæt bund og top på søjlen. Opbevar søjle ved stuetemperatur indtil næste gang



4

Når centrifugeringen er færdig tjekkes eppendorfrøret med UV-lys.

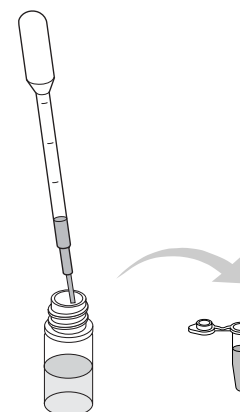
Overfør med en ny pipette 250 μ L af ”+” supernatanten til et nyt eppendorfrør.



5

Med en rensset pipette overføres nu 250 μ L bindingsbuffer til eppendorfrøret med ”+”supernatanten.

Luk røret og stil det i køleskab til næste gang



Proteinoprensning med søjlekromatografi

1

Mærk 3 opsamlingsrør med 1, 2 og 3. Stil dem i en holder.

Fjern bunden fra søjlen og stil den i opsamlingsglas 1.

Når det sidste buffer når til søjlematrix, fortsættes til næste punkt



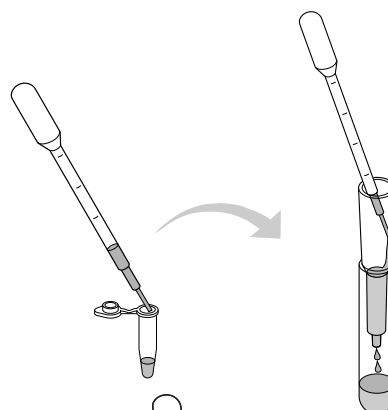
2

Med en ny pipette overføres forsigtigt og roligt 250 μL fra ”+” supernatanten til søjlen.

Hold pipettespidsen langs siden af søjlen og lad supernatanten glide ned langs siden.

Undersøg søjlen vha. UV-lys.

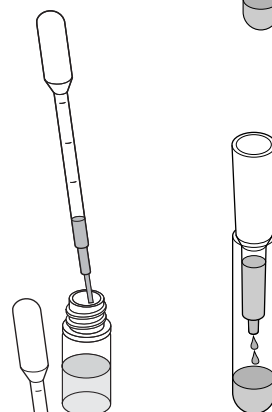
Når det ikke drypper mere flyttes søjlen til opsamlingsglas 2



3

Med en rensset pipette tilsættes 250 μL vaskebuffer. Lad hele indholdet løbe igennem. Undersøg atter søjlen med UV-lys

Flyt søjlen til opsamlingsglas 3

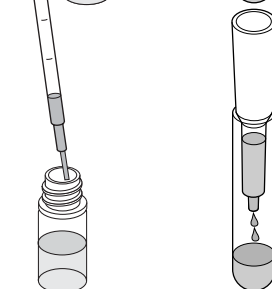


4

Med en rengjort pipette tilsættes 750 μL TE-buffer (udvaskningsbuffer eller elueringsbuffer) til søjlen.

Lad hele indholdet løbe igennem.

Undersøg søjlen med UV-lys.



5

Undersøg igen alle 3 søjler med UV-lys.

Noter resultatet.

Luk rørene med parafilm og opbevar dem i køleskab til næste gang

