

**Biotechnology Explorer**

**Ligerings- og  
transformationsmodul  
inklusive  
plasmidoprensning og  
restriktionsanalyse**

**Katalog nr. 166-5015EDU**



**[explorer.bio-rad.com](http://explorer.bio-rad.com)**

**Kopiering kun tilladt til undervisningsbrug**

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

**Oversat og bearbejdet af  
Birgit Sandermann Justesen  
Nærum Gymnasium, september 2009**

Brugen af dette kit til undervisningsbrug skal varetages af en gymnasielærer, som har en biologisk uddannelsesbaggrund mindst svarende til de af VTU udstukne faglige mindstekrav i biologi. og som har gennemført et af Arbejdstilsynet godkendt kompetencegivende kursus af 2 dages varighed i eksperimentel genteknologi.

Når eksperimenter, som er omfattet af aftalen, gennemføres i forbindelse med enkeltfaglig eller tværfaglig undervisning, har gymnasielæreren ansvar for at forsøgene gennemføres efter de gældende retningslinjer.

Aftalen vedrører undervisning i genteknologi i biologi, bioteknologi A , teknikfag og teknologi A i STX (det almene gymnasium), HTX og HF

De genteknologiske forsøg må kun udføres, dersom der senest 3 uger forud for arbejdet med forsøgene (herunder forarbejdet) er sendt en indberetning til Undervisningsministeriets fagkonsulent i biologi på det indberetningsskema, der indgår som en del af aftalen

Ved indberetning **indsendes altid en udfyldt forside og mindst ét udfyldt bilag.**

Indberetningsskemaets forside skal underskrives af både den for forsøgenes udførelse ansvarlige lærer og skolens rektor/leder og sendes til Undervisningsministeriets fagkonsulent i biologi 3 uger inden forarbejdet påbegyndes.

Link til indberetningsskemaet:

<http://www.uvm.dk/Uddannelse/Gymnasiale%20uddannelser/Fagenes%20sider/Fag%20A-F/Biologi%20-%20stx.aspx>

## Kit tjekliste

### I kittet:

T4 DNA ligase 10 $\mu$ L	1
Ligerings reaktionsbuffer (2x konc.) 100 $\mu$ L	1
Proofreading polymerase, 10 $\mu$ L	1
pJet 1.2 blunted vector – plasmid, 10 $\mu$ L	1
Sterilt vand, 1 mL	1
BgI II restriktionsenzym, 50 $\mu$ L	1
10x konc. BgI II reaktionsbuffer, 1mL	1
Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG) 1M 0,1mL	1
Transformationsreagens A 1,25 mL	1
Transformationsreagens B 1,25 mL	1
C-vækstmedie, 30 mL	1
Mikrocentrifugerør – klare - 1,5 mL	30
Mikrocentrifugerør – blandede farver – 2mL	120

### Nødvendigt udstyr og materialer:

Dækpapir	
Kitler	
Handsker – latex	
Beholder til brugte pipettespidser m.m.	1 pr. gruppe
PCR-produkt fra tidligere forsøg	1 pr. team
Mikrobielt dyrkningsmodul (Kat. nr 166-5020EDU)* som indeholder følgende:	
LB broth tabletter (hver til 50mL LB medium)	12
LB agarpulver eller tabletter til i alt 500 mL	
Ampicillin	
E.coli HB 101 K12, frysetørret	1 glas
kulturrør 15 mL – sterile	75
Petriskåle 6 cm – sterile	40
Podenåle – sterile	80
Ultracentrifuge	
Rystevandbad	
Vandbad e.l. til 70°C	
Mikropipetter	
0,5 - 20 $\mu$ L (0,5 – 10 $\mu$ L)	
2-200 $\mu$ L	
20-1000 $\mu$ L	
Spidser til ovennævnte pipetter	
Isbad	
Parafilm eller malertape	
Mærketush	

Almindeligt udstyr og kemikalier til mikrobiel dyrkning kan bruges. Andre E.c oli typer kan også benyttes, blot de er egnede og **godkendte** til transformation.

### Smart at have:

Vortexer

## Vakuum

Agarose elektroforeseudstyr – inkl. agarose, TAE-buffer, Sample loading Dye, Fast Blast farve og EZ Load 500bp molekylær lineal  
pGLO plasmid, 20mg (166-0405EDU)  
GAPDH PCR modul (166-5010EDU)  
PCR-oprensningsmodul (732-6300EDU)  
Plasmidoprensningsmodul (fx 732-6400EDU)  
Sekventerings og bioinformatik-modul (166-5025EDU)

Refill:

Der kan købes refill til de forskellige kit-dele.

## SIKKERHED

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 alt 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
- 

**Transformations reagens B** indeholder dimethylsulfoxid (DMSO) - et organisk opløsningsmiddel. og bør derfor **KUN håndteres af læreren**. Udvis forsigtighed ved omgang med stoffet og undgå kontakt med øjne, hud og tøj. Bær derfor sikkerhedsbriller, kittel og handsker ved arbejde med stoffet. Hvis der kommer DMSO på handskerne, så skift handsker! idet DMSO kan passere gennem latexhandsker.

Vær opmærksom på, at ampicillin kan forårsage allergiske reaktioner. Personer, der allerede ved, at de er allergiske overfor ampicillin eller andre antibiotika, bør undgå kontakt med stoffet. Andre bør bære kittel og handsker

# TEORI

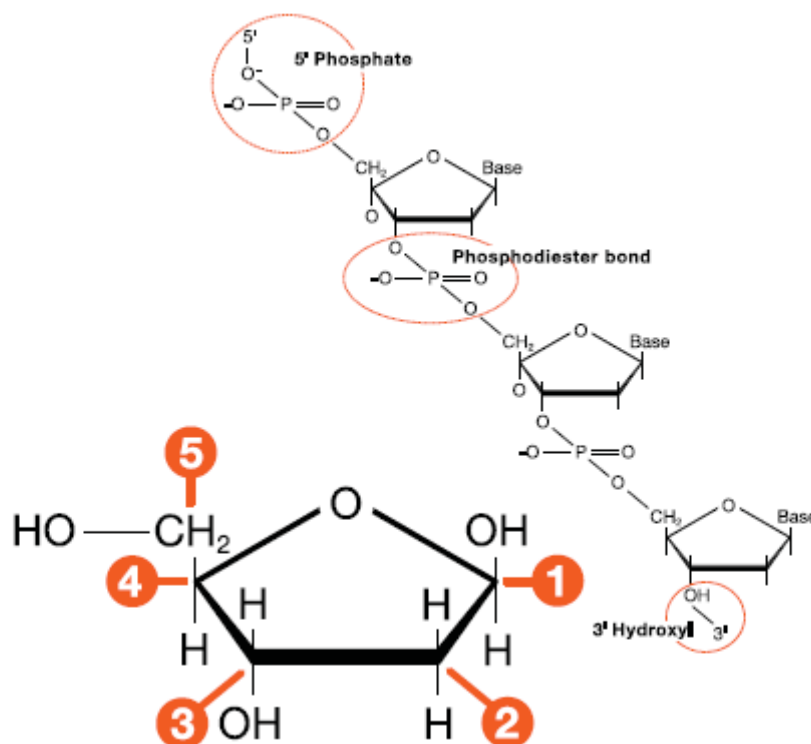
## DNA ligering – sammensætning

Ved ligeringen sættes to stykker lineært DNA sammen ved hjælp af DNA-ligase. DNA-ligase katalyserer dannelsen af fosfordiesterbindinger mellem 3'hydroxyl og 5'-phosfatenderne i DNA.

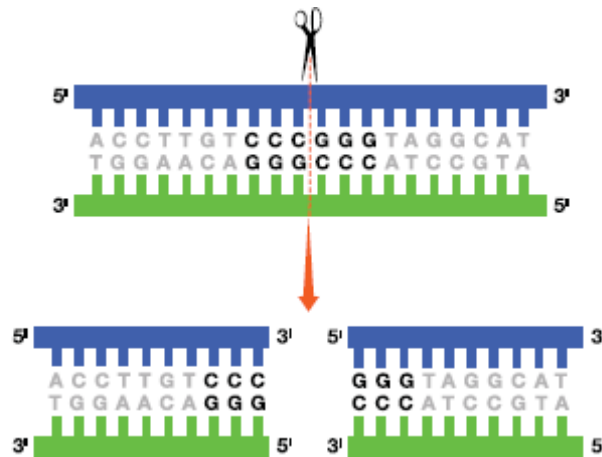
Den mest almindelig benyttede DNA ligase er T4-DNA-ligase (navnet henviser til, at den oprindeligt er dannet i en bakteriofag med navnet T4). Der findes mange måder, hvorpå man kan optimere ligeringen. Først og fremmest skal man sikre, at enzymet har optimale betingelser for at kunne virke. Det vil i dette tilfælde sige:

- T4 DNA-ligase har brug for ATP og magnesiumioner for at kunne virke
- Koncentrationen af såvel vektoren (plasmidet) og det DNA, der ønskes indsat, skal være høj
- Molariteten af det DNA, der ønskes indsat og vektor-DNA skal være næsten ens, selv om det optimale forhold ikke er 1:1

På figuren er forfordiesterbindingerne markeret



Der findes to typer af DNA ligering – enten hvor DNA-enderne er skåret 'skævt over', - de såkaldte 'sticky-ends' eller hvor DNA er skåret lige over – de såkaldte stumpe ender eller på engelsk blunted ends.



I dette forsøg arbejdes der med stumpe ender. Fordelen ved at arbejde med blunt ends er at alle DNA-ender er kompatible med alle andre ender – med andre ord er der ikke brug for at klippe såvel vektor som det DNA, der ønskes indsat med restriktionsenzymmer.

De plasmider, der benyttes til blunt-end limering, er blevet fremstillet ved hjælp af 'genetic engineering' således, at de har en række en blunt-ends enzymtilpassede områder i deres såkaldte 'multiple cloning site' (MCS).

I den forudgående PCR har Taq-polymerasen placeret en enkelt nukleotid på 3'enden af PCR-produktet, - som regelen A (adenin). Dette A vil forstyrre limeringen, hvorfor det er vigtigt først at behandle PCR-produktet med en DNA-polymerase, der fjerner dette A. Derved sikrer man sig, at PCR-produktet har blunted-ends – stumpe ender.

### Om pJet1.2 blunted plasmid

Det plasmid, der benyttes her, pJet1.2 blunted plasmid, har følgende fordele:

- Plasmidet er specielt designet til blunt-end kloning og er allerede lineært.
- I dens MCS er der desuden restriktionsenzymområder, der kan bruges ved senere Dna-manipulation
- Plasmidet indeholder  $\beta$ -lactamase genet, *amp<sup>r</sup>*, som betyder ampicillinresistens
- Det indeholder *eco47IR* genet, som gør at man senere let kan identificere transformanterne. Genet koder for Eco47I restriktionsenzymet og når dette gen udtrykkes er det giftigt for *E. coli*. Når det pågældende gen ødelægges ved, at der indsættes DNA på kloningsstedet, kan genet ikke længere udtrykkes og de transformerede celler vil kunne gro på selektive medier.
- Plasmidet er 2974 bp og man kan let få adgang til data for plasmidet.

### Om limeringsprocessen

Limering er i princippet en meget ineffektiv metode og samtidig kan der komme mange forskellige resultater ud af en limering med et plasmid som pJet1.2 blunted vektor:

- Plasmidet limerer med sig selv. Dermed er det ovenfor nævnte Eco47I restriktionsenzym aktivt og vil slå *E. coli* ihjel
- Der kan ske en limering mellem plasmidet og primer-dimere fra PCR reaktionen

- hvis ikke molaritetsforholdene er i orden (se tidligere) kan man få mange plasmider og Dna-stykker til at sætte sig sammen.
- DNA-stykkerne der ønskes indsat kan ligere med sig selv og hinanden
- Det ønskede: At det ønskede DNA-stykke sætter sig korrekt ind i plasmidet

### **Transformation**

Der henvises her til gængse lærebøger samt til den medfølgende manual.

### **Efter transformationen**

Efter transformationen skal man analysere resultatet. Dette gøres ved i første omgang at foretage en plasmidoprensning ved hjælp af søjler og efterfølgende analysere det pågældende plasmid ved hjælp af en restriktionsanalyse.

## **PRAKSIS**

### **Lærerens forberedelser**

Læs manualen grundigt igennem og planlæg forsøget nærmere.

Det er umiddelbart lettest at transformationen foretages umiddelbart efter ligationen, men har man ikke mulighed derfor kan det lade sig gøre, at **opbevare ligeringsproduktet ved 4°C eller -20 °C til transformationen skal udføres**. Bør fryses, hvis der går mere end et døgn.

Det forudsættes, at eleverne har lavet nukleinsyreekstraktion på planter og efterfølgende foretaget PCR på disse og endelig oprenset PCR-produktet forud for ligation og transformation.

### **Forberedelse før ligation:**

Tø de medfølgende reagenser ”2x ligerings reaktionsbuffer”, proofreading polymerase, T4 DNA-ligase, plasmidet pJet1.2 blunted, de oprensede PCR-produkter og sterilt vand op. Opbevar efterfølgende alle reagenserne på is.

Lige før brug knipses på rørene og der centrifugeres kortvarigt for at få produkterne til at ligge i bunden.

De forskellige reagenser leveres i så små mængder, at det **ikke kan anbefales** at fordele til grupperne på forhånd – eleverne skal gå til en fælles plads, for at **hente** reagenserne.

**Bemærk:** Der er materiale nok til 12 ligationer og 24 transformationer – sørg for at tilpasse dette med antal grupper m.v.

### **Forberedelse før transformation**

Eleverne skal nu føre det ligerede DNA ind i E. coli (se nærmere i ovenstående teoridel). I princippet er det en følsom proces at overføre et ligeringsprodukt til en bakterie, hvorfor det er vigtigt at bede eleverne om at være ekstraordinært grundige og omhyggelige. Det kan anbefales at eleverne som kontrol sideløbende laver en transformation, hvor der indføres pGLO plasmid i bakterierne – til dette skal eleverne bruge en ekstra LB-amp –IPTG-plade pr. gruppe

## Behandling af affald

Alle opløsninger, pipettespidser og andet dekontamineres lettest 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.

1.

**Mindst 5 dage før forsøget skal der fremstilles følgende plader pr. gruppe:**

1 LB plade til startkulturen

2 LB-amp IPTG plader med en slutkoncentration på 50µg/mL ampicillin og 0,2mM IPTG til udpladning af transformanter

5 mL flydende LB-medium til startkulturen

25 mL LB-amp-medium med en koncentration på 50µg/mL ampicillin til miniprep

Alle plader og medier kan opbevares i køleskabet i op til én måned.

2.

**Mindst 2 dage før forsøget:**

Podning af startkultur

Med en podenål stryges en startkultur på en LB-plade (1 pr. gruppe). Sørg for at stryge således, at der dannes enkeltkolonier. Når der først er god vækst på pladerne kan de pakkes i plastikfolie og opbevares i køleskabet i op til 2 uger.

**Dagen før forsøget – højst 24 timer før!:**

Pod 2-5mL LB medium med en koloni fra startkultur-pladen. Inkuber i rystevandbad ved 37 °C.

*Der kan også tages en koloni direkte fra startkulturpladen.*

3.

Lige før forsøget:

Stil 2 LB-amp-IPTG-plader pr. gruppe i varmeskabet ved 37 °C

Til hver gruppe afpipetteres 1,5mL C-vækstmedie i et 15 mL kulturrør og dette inkuberes ved 37 °C 10 minutter før transformationen.

**Et tip:**

Hvis man vil spare tid under forsøgsgangen udføres punkt 2. og 3. i elevvejledningen 1 time før transformationsdelen starter. Det betyder at læreren overfører 150µL frisk startkultur til hvert gruppes kulturrør med vækstmedium



# ELEVVEJLEDNINGER

## LIGERING

### Materialer – fælles:

Isbakke med reagenser:

1. ”2x liggering reaktionsbuffer”
2. sterilt vand
3. proofreading polymerase
4. pJet1.2 plasmid
5. T4 DNA-ligase

Vandbad 70 °C

Ultracentrifuge

### Materialer pr. gruppe:

Dækpapir

Gruppens PCR-produkter

mikrocentrifugerør

Mikropipette til 10 $\mu$ L

Mikropipettespidser til ovennævnte pipette

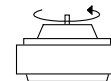
Beholder til brugte pipettespidser

Isbad

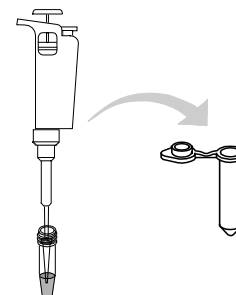
Mærketush

*Først skal enderne på DNA gøres stumpe (blunted ends). Dette gøres ved hjælp af polymerasen. Forklar hvad der sker.*

1. Mærk et mikrocentrifugerør med jeres initialer, plantenavn og L for **liggering**
2. Knips og bank på røret med ”2x liggerings-reaktionsbufferen” og proofreading polymerase. Derved sikres det at indholdet ligger i bundet af rørene. Centrifuger evt. kortvarigt. **Bemærk:** Der arbejdes med meget små mængder her, hvorfor enhver afpipettering skal være meget nøjagtig. Sørg for at pipettespidsen er tømt ved at trække pipettespidsen op langs mikrocentrifugerøret mens der afpipetteres – og husk af kassere den brugte spids.



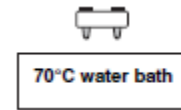
3. Gør klar til at afstumpe DNA ved at blande følgende	
<b>Reagens</b>	<b>Mængde</b>
”2x liggerings-reaktionsbuffer” (1.)	5,0 $\mu$ L
Oprensat PCR-produkt	2,5 $\mu$ L
Sterilt vand (2.)	1,0 $\mu$ L
Proofreading polymerase (3.)	0,5 $\mu$ L
<b>I alt</b>	<b>9,0<math>\mu</math>L</b>



4. Luk låget og bland godt ved at knipse.  
Centrifuger i kort (10 sekunder) så indholdet samles i bunden af røret.



5. Inkuber røret ved 70 °C (vandbad) i 5 minutter



70 °C vandbad

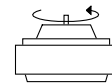
*Hvad betyder den pågældende temperatur for reaktionen? Forklar.*

6. Stil røret på is i 2 minutter



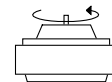
*Herved fortættes vanddampen og volumen forbliver intakt.*

7. Efter afkølingen centrifugeres kortvarigt for at samle indholdet. Lad derefter røret stå ved stuetemperatur.



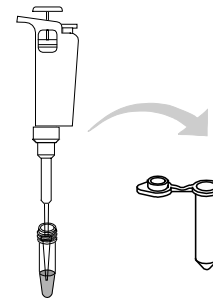
*Derefter gøres klar til liggeringen, hvorved PCR-produktet bliver sat ind i plasmidet pJet1.2 – dvs. ind i en vektor. Forklar dette nærmere.*

8. Centrifuger de to rør med henholdsvis pJet1.2 plasmidet og med T4-ligasen i 5 sekunder. Dette gøres for at sikre at indholdet er samlet i bunden af rørene.

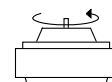


9. Gør klar til ligeringsreaktionen ved at tilsætte følgende:

<b>Reagens</b>	<b>Mængde</b>
Blunted reaktion (er allerede i)	9,0µL
T4 DNA-ligase (4.)	0,5µL
pJet1.2 blunted vektor plasmid (5.)	0,5µL
<b>I alt</b>	<b>10,0µL</b>



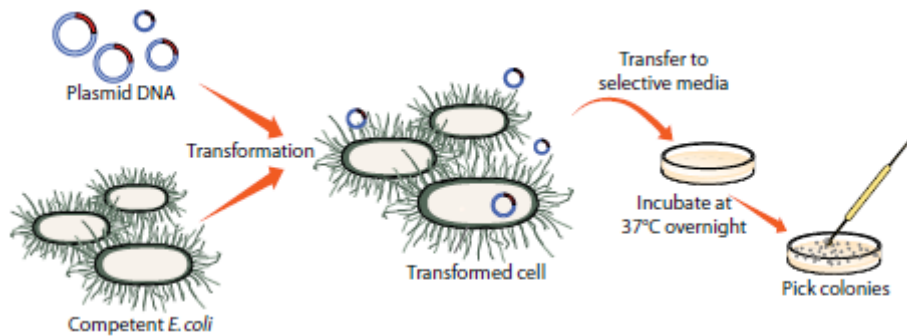
10. Luk låget og bland godt ved at knipse.  
Centrifuger kort for at samle det hele i bunden.



11. Inkuber i 5-10 minutter ved stuetemperatur.

12. Opbevar det færdige produkt ved -20 °C, med mindre du skal bruge det til transformation straks efter. I sidstnævnte tilfælde mærkes røret "TF" og det stilles på is.

# TRANSFORMATION



Princippet i transformationen.

## Materialer – fælles:

vandbad eller varmeskab 37 °C  
Ultracentrifuge (med køling hvis muligt)  
Isbad ved siden af centrifugen  
Vortexer (hvis muligt)  
Autoklave

## Materialer pr. gruppe:

Dækpapir  
Kitler  
Handsker – latex  
Beholder til brugte pipettespidser foret med en  
Autoklavepose m.m. 1 pr. gruppe  
Materiale fra ligeringsreaktionen 10µL  
Evt. kontrolplasmid (fx pGLO) 2-3µL  
mikrocentrifugerør 1,5mL 4  
15mLs kulturrør med 1,5mL C-vækstmedium 1  
Transformationsreagens A 250µL  
Transformationsreagens B 250µL  
Sterile podenåle 2  
Frisk forvarmet LB-amp-IPTGplade 2  
Mikropipette 2-200µL  
Mikropipette 20-1000µL  
Spidser til mikropipetterne  
Mærketush  
Parafilm eller malertape til at forsegle petriskålene med  
Isbad

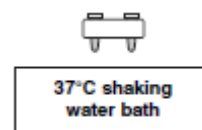
## Klargøring af de kompetente celler

1. Mærk to LB-amp-IPTG-plader **i bunden** med jeres initialer og henholdsvis "TF" og "Kontrol" og stil dem i varmeskabet ved 37 °C

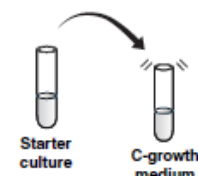
**37 °C**

Hvis punkt 2 og 3 er udført af læreren forinden springes videre til punkt 4

2. Tag kulturrøret med de 1,5mL C-vækstmedium og mærk det med jeres initialer. Stil røret i vandbadet. Sørg desuden for at jeres E.coli startkultur ligeledes står i rystevandbadet ved 37°C



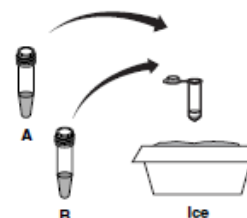
3. Overfør 150µL frisk startkultur (podet dagen før) til det forvarmede C-vækstmedium og stil røret tilbage i rystevandbadet. Inkuber i 40-60 minutter i vandbadet



4. Mærk et mikrocentrifugerør på 1,5mL med jeres initialer og '**kompetente celler**'.

### TAG HANDSKER PÅ!

5. Gør transformationsbufferen klar ved at blande 250µL transformationsreagens A med 250µL transformationsreagens B i et mikrocentrifugerør mærket "TF-buffer". Bland godt ved at knipse og benyt evt. vortexeren. Stil straks på is

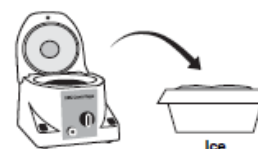


Bemærk: Denne transformationsbuffer skal benyttes **samme dag**, som den blandes!

6. Når startkulturen i vækstmediet (punkt 3) har inkuberet i 30-40 minutter overføres hele indholdet til mikrocentrifugerøret, der er mærket "kompetente celler" (fra punkt 4)



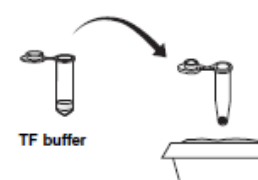
7. Centrifuger ved 12.000 rpm i et par minutter og stil derefter straks røret på is.



8. Med en 20-1000µL mikropipette fjernes supernatanten forsigtigt – undgå at røre pellet. Opbevar røret med pellet på is.



9. Overfør 300µL iskold transformationsbuffer og pipetter **meget forsigtigt** op og ned i væskefasen



**uden at røre pellet!**

*Herved dannes der bevægelse i væsken og pellet, som indeholder bakterierne resuspenderes.*



*Hvilken funktion har transformationsbufferen? Forklar nærmere*

10. Inkuber de resuspenderede bakterier i 5 minutter på is

11. Centrifuger ved 12.000 rpm i 1 minut. Sørg for at bakterierne er på is lige indtil centrifugeringen og straks efter.

Hav derfor et isbad klar ved siden af centrifugen.

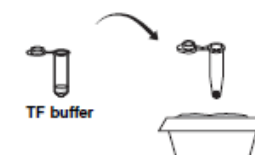


12. Med en 20-1000µL mikropipette fjernes supernatanten forsigtigt.

Fortsæt med at have røret på is.



13. Tilsæt 120µL iskold transformationsbuffer. Resuspender cellerne ved at suge op og ned. Opbevar røret på is.



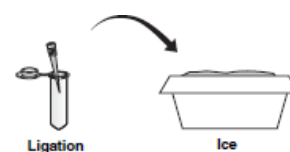
14. Inkuber de resuspenderede bakterier i 5 minutter på is. Cellerne er nu kompetente og klar til at blive transformerede.

*Selve transformationen påbegyndes nu.*

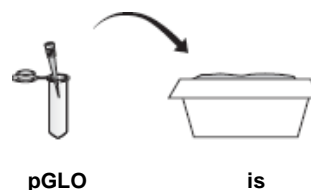
15. Mærk et mikrocentrifugerør med jeres initialer og "TF" (for transformation) – eller hent jeres "TF" rør fra ligeringsdelens punkt 12.

16. Overfør jeres ligeringsprodukt til transformationsrøret. (Hvis I lige har foretaget ligering er dette punkt allerede udført – se punkt 12 i ligeringsdelen).

Stil røret på is.



17. Hvis I også skal lave positiv kontrol (anbefales) overføres 2-3 $\mu$ L pGLO-plasmid til et mikrocentrifugerør mærket "Kontrol".



18. Skift pipettespids. Overfør 50 $\mu$ L kompetente bakterier direkte til det iskolde "TF"-rør med ligeringsprodukt.  
Pipetter op og ned et par gange for at blande.



19. Skift pipettespids. Overfør 50 $\mu$ L kompetente bakterier til det iskolde "Kontrol"-rør med pGLO-plasmidet.  
Pipetter op og ned et par gange for at blande



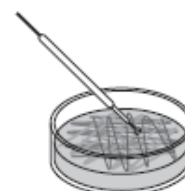
20. Inkuber transformationerne 10 minutter på is.



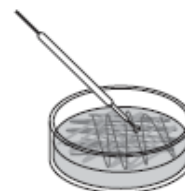
21. Hent LB-amp-IPTG pladerne i varmeskabet – hent evt. en plade ad gangen.

*Der gøres nu klar til spredning. Vær opmærksom på at bakterierne stadig er meget skrøbelige, hvilket betyder, at selve spredningen på pladen ikke må tage mere end 10 sekunder.*

22. Tag først "TF" røret og tøm hele rørets indhold ud på den lune (37 °C) LB-amp-IPTG plade, der er mærket "TF". Dette gøres lettest ved at suge indholdet op med en mikropipette.  
Tag en steril podenål og spred med rolig hånd indholdet på pladen.  
Luk pladen.



23. Skift pipettespids og gentag proceduren med "Kontrol"-røret og overfør indholdet til den lune "Kontrol"-pladen og spred forsigtigt med en ny steril podenål.  
Luk pladen



24. Forsegel pladerne med parafilm eller malertape

25. Stil dem straks med bunden i vejret i varmeskab ved 37 °C og inkuber til næste dag

**37 °C**

26. Analyser resultaterne næste dag – eller hvis dette ikke er muligt: Fjern pladerne fra varmeskabet og læg dem i en plastikpose i køleskabet indtil, der skal arbejdes videre med plasmidoprensning og restriktionsanalyse.

### **Analyse af resultaterne**

Tæl antallet af kolonier på de to plader. Tæl kun hovedkolonierne – ikke de små satellitkolonier.

<b>Transformation</b>	<b>Antal kolonier</b>
Ligering af eget plante-genom	
Kontrolplasmid	

# PLASMIDOPRENSNING

## Materialer:

Dækpapir

Handsker – latex

Beholder til brugte pipettespidser foret med en

Autoklavepose m.m.

1 pr. gruppe

25 ml LB-amp medium

Kulturrør – 15 mL – 4 stk

Sterile podenåle

LB-amp-IPTG-plade med kolonier fra transformationen af ligeringsproduktet

Mikropipetter

Sterile pipettespidser

Rystevandbad 37 °C

Plasmidoprensningsskit (fx Aurum™ Plasmid Mini Purification Module (kat. Nr. 732-6400EDU))

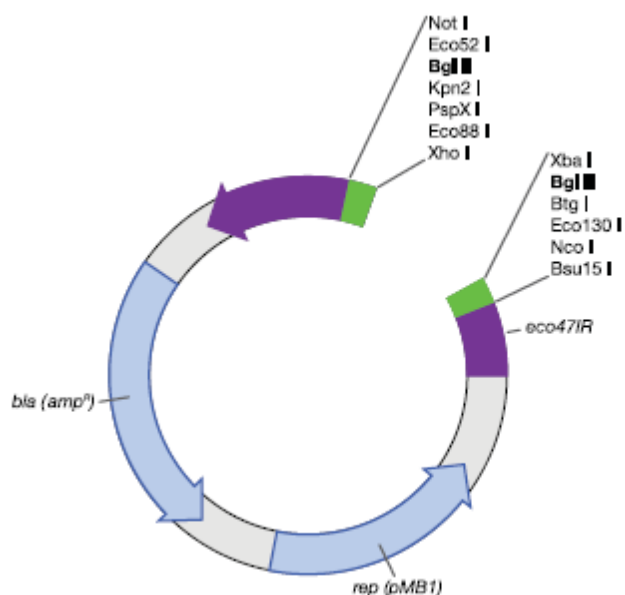
## Fremgangsmåde:

1. Hent LB-amp-mediet
2. Mærk 4 15 mL kulturrør ”pJet” og numrene 1, 2, 3 og 4
3. Idet der benyttes sterilteknik overføres med en steril pipettespids 5mL LB-amp-medium til hvert af de 4 kulturrør.
4. Dagen før at plasmidoprensningen skal udføres podes én stor koloni \*(ikke en satellitkoloni) til mediet i kulturrøret. Gentag proceduren med alle fire rør.
5. Inkuber rørene i rystevandbadet ved 37 °C natten over.
6. Foretag en plasmidoprensning idet den tilgængelige metodes vejledning følges.

\*Hvis et hold ikke har kolonier lånes af et andet hold.



# RESTRIKTIONSANALYSE



## Indledning

I kittet finder man desuden restriktionsenzymet BgI II samt en reaktionsbuffer hvilket muliggør en nærmere analyse af plasmidet, der er benyttet i transformationen. For at kunne udføre forsøget skal man selv supplere med elektroforeseudstyr og kemikalier til elektroforesen. Plasmidet pJet1.2 er 2974bp og efter klipningen og den efterfølgende elektroforese vil man kunne se bånd på ca. 3kb og mindre.

## For at klippe og analysere 4 plasmider har hver gruppe brug for følgende:

Dækpapir	
Handsker – latex	
Beholder til brugte pipettespidser foret med en Autoklavepose m.m.	1 pr. gruppe
Mikrocentrifugerør	4-8
BgI II restriktionsenzym	4 $\mu$ L
10x BgI II reaktionsbuffer	8 $\mu$ L
Sterilt vand	30 $\mu$ L
1 % agarosegel	
Elektroforesebuffer	
Loading dye	50 $\mu$ L
Molekylærvægt lineal	10 $\mu$ L
Mikropipette 2-20 $\mu$ L	
Spidser til mikropipetten	
Elektroforeseudstyr	

## Om forsøget

Op til forsøget er der foretaget en transformation med et plasmid indeholdende det ligerede DNA og sidenhen er plasmidet hentet ud fra bakterier, der voksede på det selektive medie. Restriktionsanalysen skal nu vise os, hvorvidt det indsatte DNA-stykkets længde.

Ved hjælp af restriktionsenzymet klippes det indsatte stykke ud af plasmidet. De to bånd man vil kunne se på agarosegelen vil have størrelsen som det indsatte DNA-stykke samt som resten af plasmidet (2974bp).

Hvis man får andre resultater, hvad kan årsagen da være?

Forberedelse op til forsøget:

1. Mærk et mikrocentrifugerør med jeres initialer og "BgI II master mix"
2. Klippingen med restriktionsenzymet vil blive udført på hver miniprep (oprenset plasmid) på 20µL med 10µL plasmidDNA
3. Gør restriktionsenzymblandingen klar. Husk at skifte pipettespids mellem hver reagens!

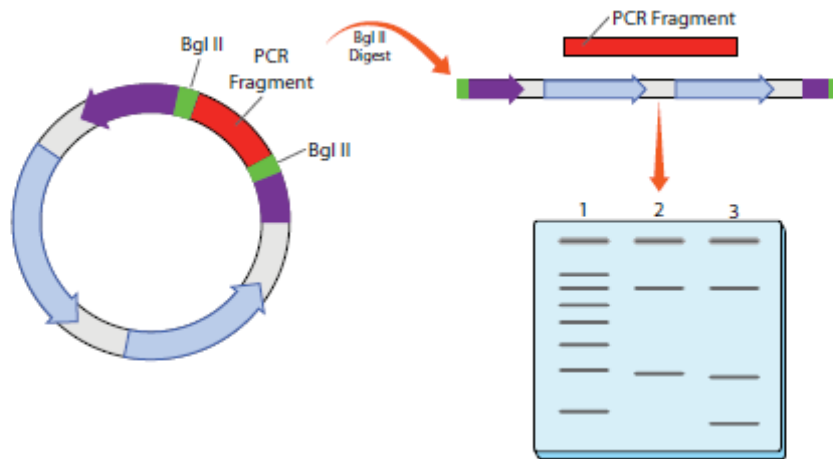
<b>Reagens</b>	<b>til 1 reaktion</b>	<b>til 5 reaktioner</b>
10x BgI II reaktionsbuffer	2µL	10µL
Sterilt vand	7µL	35µL
BgI II restriktionsenzym	1µL	5µL
<b>I alt</b>	<b>10µL</b>	<b>50µL</b>

#### **Fremgangsmåde ved klipping med restriktionsenzymet**

1. Mærk et mikrocentrifugerør for hvert oprenset plasmid
2. I hvert af de dertil mærkede mikrocentrifugerør blandes 10µL af den ovenfor fremstillede blanding med 10µL af det på røret nævnte plasmid
3. Bland godt – og centrifuger kortvarigt (5 sekunder) for at samle alt i bunden af røret.
4. Inkuber ved 37 °C i 1 time. Såfremt der ikke fortsættes direkte med elektroforesen kan materialet gemmes ved -20 °C.

#### **Elektroforesen**

1. Placer agarosegelen korrekt i elektroforesekarretµL og fyld op med elektroforesebuffer til gelen er dækket
2. Planlæg rækkefølgen af prøverne, der skal sættes på gelen
3. Tilsæt 5µL loading dye til hver prøve. Bland ved at suge op og ned et par gange med pipetten.
4. Tilsæt 20µL prøve til brøndene idet I følger jeres plan
5. Tilsæt også gerne DNA, der ikke er blevet klippet af restriktionsenzymet til en brønd.
6. Tilsæt 10µL molekylærvægt-lineal til mindst 1 brønd pr. gel
7. Kør elektroforesen ved 100V i 30 minutter
8. Analyser resultaterne



**Resultatet af en restriktionsanalyse af plasmid DNA.** Det cirkulære plasmid DNA oprenset fra bakterier klippes med restriktionsenzymet Bgl II , hvorved der dannes mindst 2 lineære fragmenter – plasmid DNA og PCR-fragmentet (brønd 2). Disse fragmenter synliggøres efterfølgende ved en elektroforese. Hvis PCR-fragmentet har et Bgl II-restriktionssite, vil der ses 3 bånd (brønd 3). Udfør brønd 1 ses 500bpmolekylærvægtlinealen.