

---



# Biotechnology Explorer™

## Regnskovens hemmelighed

**Katalognummer  
166-0006-EDU**

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

4006098

**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 1 – kloning og screening*

Bakterier frysetørrede	1 glas	<input type="checkbox"/>
LB-agar tabletter	5	<input type="checkbox"/>
Petrisåle 60mm sterile	20	<input type="checkbox"/>
Podenåle, pakke med 10	1 pakke	<input type="checkbox"/>
Sterile plastpasteurpipetter	10	<input type="checkbox"/>

#### *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 <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )/TE/pH8,0)	1 flaske	<input type="checkbox"/>
Ligevægtsbuffer (2M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )/TE/pH 8,0)	1 flaske	<input type="checkbox"/>
Vaskebuffer (1,3M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )/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

UV-lampe		<input type="checkbox"/>
Mikrobølgeovn		<input type="checkbox"/>
1L erlenmeyerkolbe	1	<input type="checkbox"/>
250 mL erlenmeyerkolbe	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		
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 case og teori.

Case:

På sin tur i regnskoven i Andesbjergene for at finde nye midler mod kræft opdager og plukker Tisha nogle grønne blade, som hun bringer med tilbage til laboratoriet. Her opdager forskerne, at bladene indeholder et grønt fluorescerende protein (GFP)

2. og 3. lektion

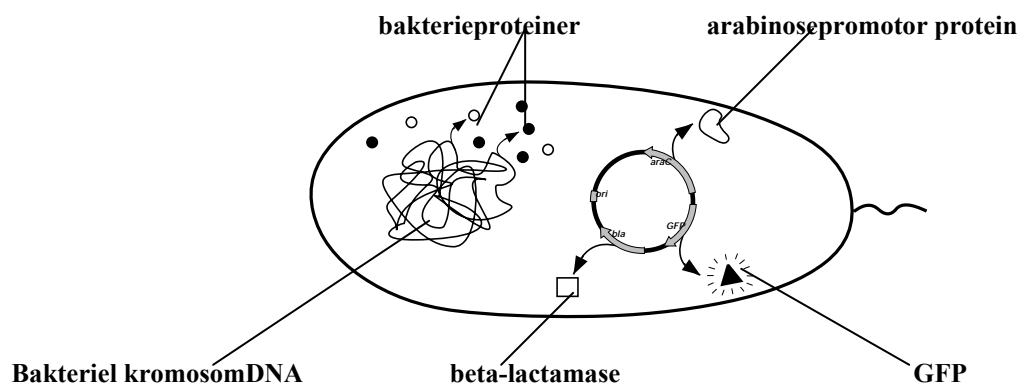
### Overførsel af GFP til bakterier. Forsøgsgange

DNA fra bladene klippes med restriktionszymer og vha. plasmider overføres DNA til bakterier. Kun de bakterier, der indeholder GFP vil efterfølgende lyse grønt, når de holdes under UV-lampen.

Figuren viser processen:

FIGUR (s3)

For at finde de modificerede bakterier skal eleverne foretage pladestrygning. Bakterierne spredes på LB-agarplader (næring for bakterier).



4., 5. og 6. 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 yderligere

Lektion 7

### Afprøvning og blindtest

I denne lektion afprøves proteinets sikkerhed

### Afslutning

Etik og økonomi

Der afsluttes med etisk og økonomisk debat over emnet fremstilling af nye medicintyper. Rollespil, dilemmaspil mm

### Lærers forberedelsesoverblik:

#### Hvad skal der gøres

Læs vejledningen igennem  
Fremstilling af agarplader  
Fremstilling af medier  
Rehydrere bakterier  
Klargøring af elevarbejdspladser

#### Hvornår

straks  
2-5 dage før 1. forsøgsdag  
2-5 dage før 1. forsøgsdag  
på forsøgsdagen  
Inden forsøgsstart

#### Tidsforbrug

1 time  
1 time  
15 minutter  
5 minutter  
5 min pr gang

Oversigt side 7 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 agarplader
- Fremstille vækstmedium
- Rehydrere bakterierne
- 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.

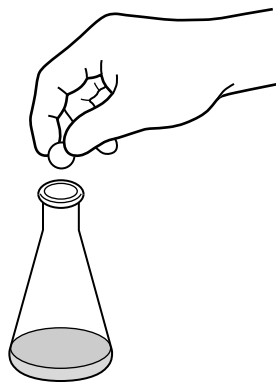
FIG

#### Støbning af agarplader

Denne del af forberedelsen skal foretages mindst 2 dage før forsøgsdagen.

Agarpladerne bliver bedst, hvis de står 2 dage ved stuetemperatur efter støbningen. Hvis pladerne ikke skal bruges efter 2 dage, men først senere, kan de opbevares i køleskab i op til 3 måneder. Stak pladerne og læg dem i en plastpose. Stil pladerne med bunden i vejret.

- Tag en 1L erlenmeyerkolbe eller BlueCap flaske og tilsæt 260mL demineraliseret vand. Opvarm til kogepunktet.
- Tilsæt 5 LB-agar tabletter og lad dem ligge i det varme vand i 20 minutter.



- Opvarm til kogepunktet – brug en mikrobølgeovn, men opvarm kun 30 sekunder ad gangen. Den smeltede agar koger let over. Gentag indtil blandingen er klar. Slutvolumet skulle gerne være 250mL.
- Afkøl agaren til 50 °C (hvis temperaturen er højere vil ampicillin og arabinosen ødelægges)
- Med en steril pipette overføres 2,5 mL ampicillinopløsning til agaren
- Med en steril pipette overføres 2,5 mL arabinoseopløsning til agaren.
- Støb 20 agarplader. Husk at agaren størkner ved 27°C. Petriskålene fyldes ca. 1/3 op (10-12 mL). Læg låg på og lad pladerne størkne (ca. 20 minutter)
- Lad pladerne stå ved stuetemperatur i 2 dage. Derefter kan de opbevares i køleskab med bunden i vejret og forsejlet i en plastpose.

- Mærk pladerne ”LB/amp/ara”

FIGUR m. plader (s.11)

Den overskydende mængde ampicillin og arabinose skal bruges ved fremstillingen af næringsmedium.

### **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

### **Klargøring af bakterierne**

Bakterierne rehydreres først umiddelbart før forsøgsstart for at mindske risikoen for kontaminering.

- Tilsæt 250 µL TE buffer til glasset med bakterier. Bland forsigtigt. Bakterierne vil bundfældes hurtigt, hvorfor det er vigtigt at blande igen, før der tages prøver til udpladning

### **Lektion 3**

**Hvad skal der gøres:**

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

### **Lektion 4**

**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 5 og 6**

**Hvad skal der gøres:**

Elevarbejdspladserne klargøres

## **Om de enkelte trin/lektioner i forsøget**

### **Pipetten**

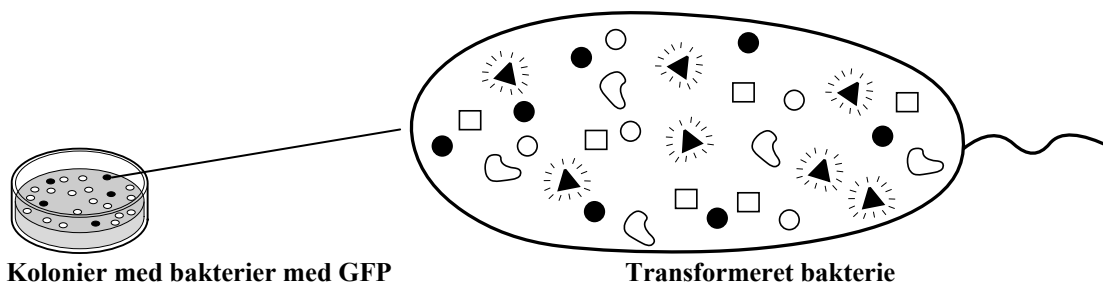
De medfølgende sterile engangsplastpasteurpipetter har inddeling som vist på figuren

PIPETTE

### **Udstrykning af bakteriesuspension på agarplader.**

Sørg for at eleverne følger vejledningen grundigt. Instruer eleverne i, at podenålshovedet skal være tomt for bakteriesuspension, når de er færdige med udstrykningen.

De enkelte bakterier vil danne kolonier og disse kolonier kan efter 24 timer indeholde op til flere millioner identiske celler.



Kolonier med bakterier med GFP

Transformeret bakterie

Kittet indeholder 4 ekstra plader, som kan bruges til at demonstrere udstrygningen

### 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 4 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.

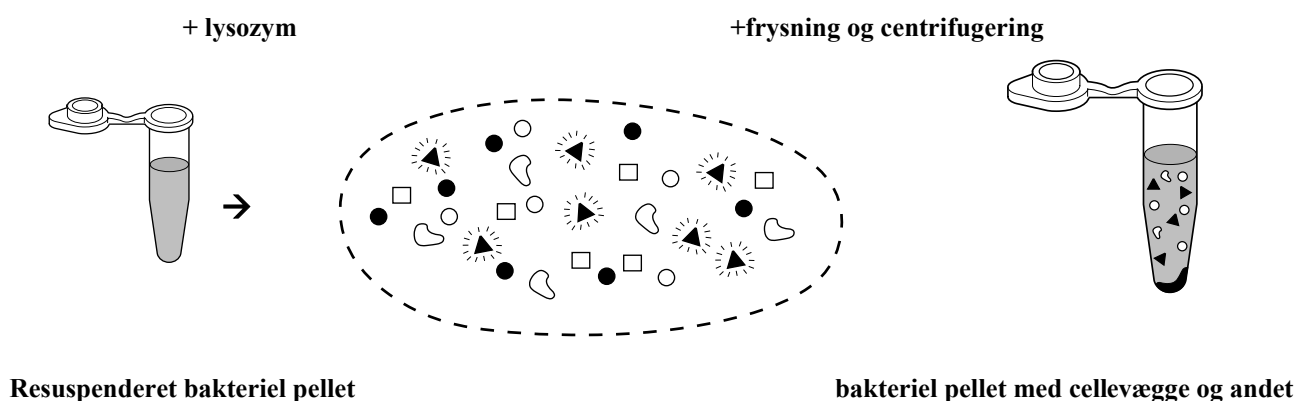
FIGUR (s14)

### Behandling af bakterierne med lysozym (lysering af bakterierne), således at GFP kan frigøres til proteinkromatografi.

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

Frysning og lysozymet ødelægger tilsammen cellevæggene, dvs. lyserer bakterierne.

Lysozymet ødelægger 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 vaskes ud af søjlen

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

### Vigtige tricks:

1

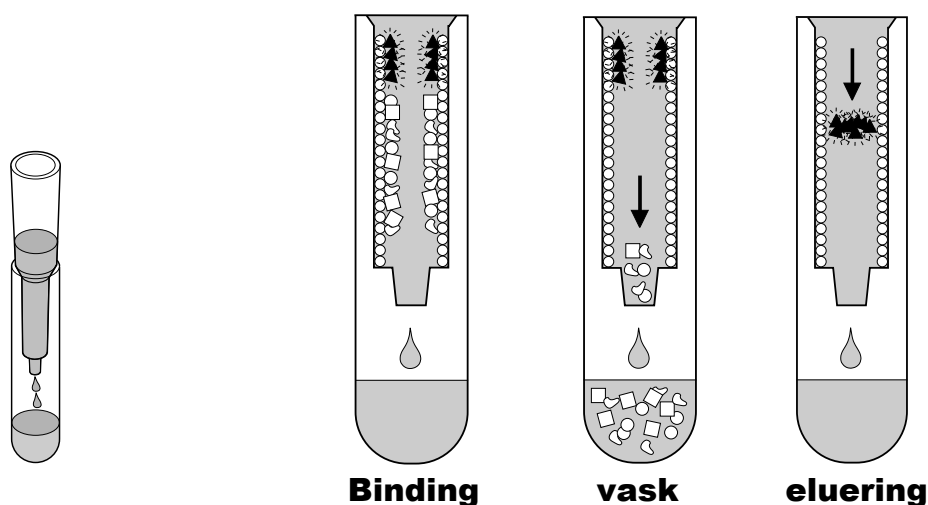
Placer forsigtigt søjlen i et opsamlingsrør. Søjlen og opsamlingsrøret må ikke lukke for tæt sammen, da det vil forhindre væskestrømmen. Sæt evt. et lille stykke papir mellem de to.

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 bakteriekulturerne skal efter forsøget destrueres. Brugte pipettespidser mm. autoklaveres. Bakteriekulturerne kan slås ihjel ved at blive lagt i klor-bad 1-2 dage.



# Elevvejledning

## Opformering af bakterier – bakterievækst- lektion 2

1

Hold glasset med bakteriesuspensionen lodret. Dyb en steril podenål i glasset. Fyld øjet i podenålen.

2

Åbn petriskålen og spred bakterierne på pladen ved med bløde bevægelser at tegne på agaroverfladen som vist på tegningen

3

Roter pladen 45° og stryg igen. Lad podenålen hente bakterier fra de første stryg igen

4

Gentag punkt 1-4 med den anden LB/amp/ara plade, men med samme podenål

5

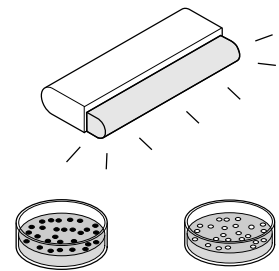
Inkuber pladerne ved 37°C til næste dag. Stil pladerne med bunden i vejret i varmeskabet

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

1

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

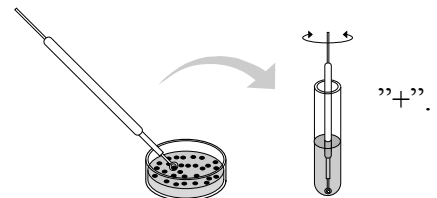


2

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

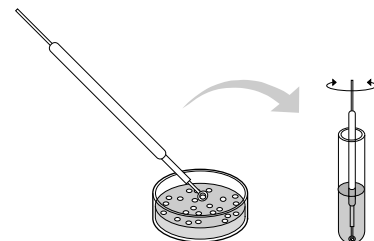
3

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

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

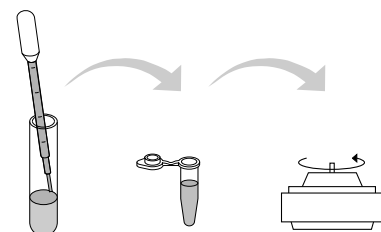
→ 32°C

## Opkoncentrering af bakterier – klargøring til oprensning af GFP

1

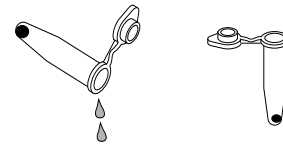
Mærk et eppendorfrør med ”+” samt dit navn.

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



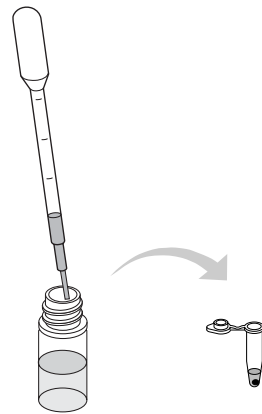
2

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

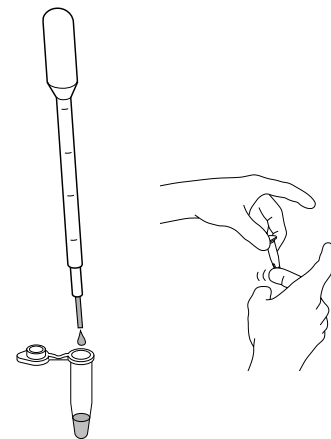


3  
Hæld supernatanten fra og observer pellet under UV-lys

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.



6  
Put røret i fryseren indtil næste gang. Den lave temperatur  
får cellerne til hurtigt at gå i stykker i cellemembranen

**Frys**

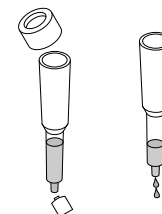
*Andet trin i klargøringen til oprensning af GFP*

1  
Tag eppendorfrøret fra fryseren og tød det ved at holde  
det i hånden.  
Centrifuger i 10 minutter ved 10.000 rpm

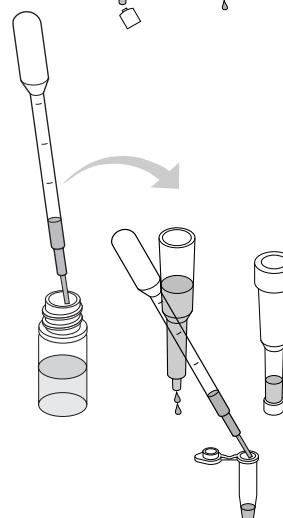
**Tød**



2.  
Gør søjlerne klar: Fjern toppen og knæk bunden af. Lad al  
væske løbe ud af søjlen. Det tager ca. 3-5 minutter

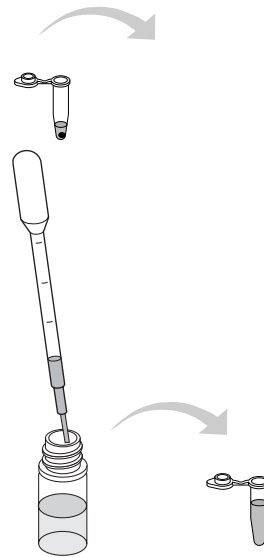


3  
Gør søjlerne klar ved at tilsætte 2mL ligevægts buffer.  
Tilsæt 1 mL ad gangen. Lad bufferen løbe igennem indtil  
den øverste kant når 1mL mærket.  
Sæt bund og top på søjlen.  
Opbevar søjle ved stuetemperatur indtil næste gang



4

Når centrifugeringen er færdig tjekkes eppendorfrøret med UV-lys. Overfør med en ny pipette 250 $\mu$ L af "+" supernatanten til et nyt eppendorfrør.



5

Med en rensed pipette overføres nu 250 $\mu$ L bindingsbuffer til eppendorfrøret med "+" supernatanten. Luk røret og stil det i køleskab til næste gang

### *Proteinoprensning med søjlekromatografi*

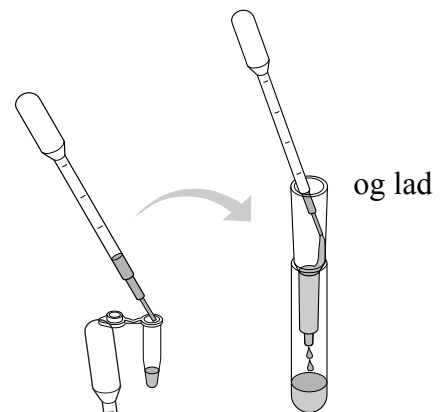
1

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



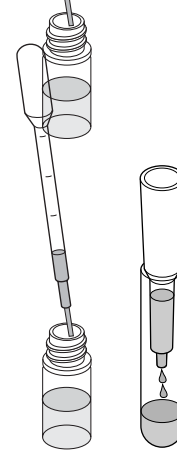
2

Med en ny pipette overføres forsigtigt og roligt 250  $\mu$ L fra "+" supernatanten til søjlen. Hold pipettespidsen langs siden af søjlen supernatanten glide ned langs siden. Undersøg søjlen vha. UV-lys. Når det ikke drypper mere flyttes søjlen til opsamlingsglas 2



3

Med en rensed pipette tilsættes 250  $\mu$ L vaskebuffer. Lad hele indholdet løbe igennem. Undersøg atter søjlen med UV-lys. Flyt søjlen til opsamlingsglas 3



4

Med en rengjort pipette tilsættes 750  $\mu$ L 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

