

Lærervejledning til Isolering og identifikation af nye cellulaseproducerende bakterier Version 9.0 – 9/3-09

Som testgymnasier (Ordrup gymnasium og Nørre G) har vi kørt forsøget igennem og deltaget i den sidste korrektur af øvelsevejledningen. Her i lærervejledningen har vi skrevet om de nyttige erfaringer vi har gjort os undervejs. Vi kan varmt anbefale projektet, der opfylder mange af de faglige mål samt behandler kernestof og supplerende stof fra læreplanen i biA:

- formulere og analysere biologiske problemer med sikker anvendelse af biologiske fagudtryk såvel i kendte som i nye sammenhænge
- gennemføre selvstændige observationer og undersøgelser og tilrettelægge eksperimenter såvel i laboratoriet som i felten, herunder vurdere risikomomenter og de sikkerhedsmæssige foranstaltninger ved omgang med biologisk materiale, apparatur og kemikalier
- analysere og bearbejde data fra eksperimentelt arbejde samt bearbejde og formidle resultater fra biologiske undersøgelser
- observere og forklare levende organismers struktur og funktion og sammenholde dette med organismernes livsbetingelser
- forklare, hvordan levende organismer opretholder stabile indre miljøer, og vurdere betydningen af samspillet mellem levende organismer og deres omgivelser
- vurdere omfattende økologiske problemstillinger og disses betydning på globalt plan på grundlag af kendskabet til den nære natur
- forklare forskellige evolutionsmekanismer.
- analysere og vurdere artikler med biologisk indhold, herunder engelsksprogede artikler
- opsøge og vurdere information vedrørende miljø, sundhed, medicin og bioteknologi
- formulere sig struktureret såvel mundtligt som skriftligt om biologisk faglige emner, herunder inddrage etiske/holdningsmæssige forhold
- have faglig baggrund for stillingtagen og handlen i forbindelse med egne og samfundsmæssige problemer med biologisk indhold.

2.2 Kernestof:

- virus og pro- og eukaryote cellers opbygning og funktion
- opbygning og biologisk betydning af kulhydrater, fedtstoffer, proteiner og nukleinsyrer.
- kulhydraternes intermediære stofskifte
- udvalgte dele af menneskets fysiologi, herunder hormonelle og neurologiske reguleringsystemer
- menneskets immunforsvar, herunder vaccination
- enzymers opbygning og funktion
- genetikens molekylære og cellulære grundlag, herunder proteinsyntesen
- eksempler på anvendt bioteknologi
- nedrivningsmønstre belyst ved eksempler fra planter, dyr og mennesker
- evolutionsteori, herunder betydningen af samspillet mellem arv og miljø
- populationsbiologi
- respiration, fotosyntese og gæring
- økologi, herunder undersøgelse af et økosystem
- succession, energistrømme og stofkredsløb i udvalgte økosystemer, herunder C- og N-kredsløb
- økotoksikologi
- eksempler på undersøgelses- og analysemetoder indenfor områderne fysiologi, genetik, evolution, biokemi, immunologi og økologi.

Faglige mål og kernestof er citeret fra biA læreplan, men eksperimenterne er også egnede til biB, eventuelt i uddrag.

En vigtig motivation i projektet er at eleverne med rette oplever at de laver frontforskning. Det at eleverne selv skal ud og finde de nye bakterier, der aldrig før har været fundet og det at sekvensanalyserne foregår på en højteknologisk virksomhed som Novozymes og at eksperimentvejledningerne og artiklerne er udarbejdet af elitestuderende på DTU, er den reelle baggrund for elevernes oplevelse.

For at eksperimenterne skal fungere, er det vores erfaring, at det er vigtigt at der forud for eksperimenterne sker en detaljeret planlægning, se eventuelt sidste side med overslag over tidsforbrug. Lærerbemærkninger til de enkelte skridt i eksperimenterne er indsat undervejs i vejledningen.

Karin Frykman og Grete Hansen

Vigtigt

Arbejdstilsynet har i forbindelse med godkendelsen af øvelsen understreget at følgende regler skal overholdes, og fundet at gennemførelsen således er forsvarlig såfremt:

- **Der er en grundig undervisning af eleverne, førend øvelserne påbegyndes, hvor der gøres opmærksom på farerne ved jordprøvetagningen, de forskellige anvendte kemikalier samt håndteringen af centrifuger og PCR-maskinen.**
- **Det er kun elever på 3.g niveau og lærere, der må håndtere centrifuger og støbe agarosegeler.**
- **Eleverne er undergivet tilsyn af en underviser under øvelsernes udførelse.**
- **Det må ikke være muligt, at der er adgang for alle og enhver til de mobile laboratorier.**

Isolering og identifikation af nye cellulaseproducerende bakterier

Denne øvelse går ud på at opsamle en jordprøve eller lignende fra området omkring gymnasiet. Fra prøven isoleres herefter cellulaseproducerende bakterier ved hjælp af screening. Bakteriernes DNA, der koder for 16S ribosomalt RNA opformeres med brug "polymerase chain reaction" (PCR) og sendes derefter til sekventering hos Novozymes A/S. Ved hjælp af et online software-program vil der herefter kunne opbygges fylogenetiske træer af sekvenserne. I det der foreligger en database med bakterier, hvis 16S ribosomalt RNA allerede er sekventeret, vil det være muligt at se, hvor de fundne bakterier er placeret i forhold til andre, og dermed bestemme. Det vil også være muligt at sammenholde sekvenserne mod verdens største samling af DNA data, og således artsbestemme den isolerede bakterie.

Det anbefales, at teorimaterialet, der hører til dette eksperiment, læses forud for eksperimentet. Det er desuden en god ide at læse og forstå alle instruktioner før forsøget startes. Eksperimentet er designet til, at der arbejdes i grupper á 3-5 personer, hvor hver elev indsamler sin egen jordprøve. Undervejs i eksperimentet, kan det være, at nogle af de oprindeligt indsamlede prøver ikke kan benyttes. Derfor er det godt, at hver gruppe arbejder med flere prøver. Det kan f.eks være, at der ikke er nogen cellulaseproducerende bakterier i en prøve, eller at et af trinene i eksperimentet mislykkes, og der derfor ikke er noget PCR-produkt til sidst. Hvis en gruppe skulle ende ud med ikke at have noget PCR-produkt, anbefales det at de benytter en af de andre gruppers sekvensfiler til den sidste del, hvor der skal opbygges fylogenetiske træer.

Vær opmærksom på at der maksimalt kan være 25 rør af gangen i PCR maskinen.

Det kan anbefales desuden, at der trænes med brugen af pipetterne, hvis man ikke har arbejdet med disse før, således at man er fortrolig med dem inden øvelsen starter. Specielt er det en god ide at arbejde med de små volumener, da resultatet af PCR reaktionen er meget afhængig af at de angivende volumener pipetters korrekt.

Rigtig god fornøjelse!

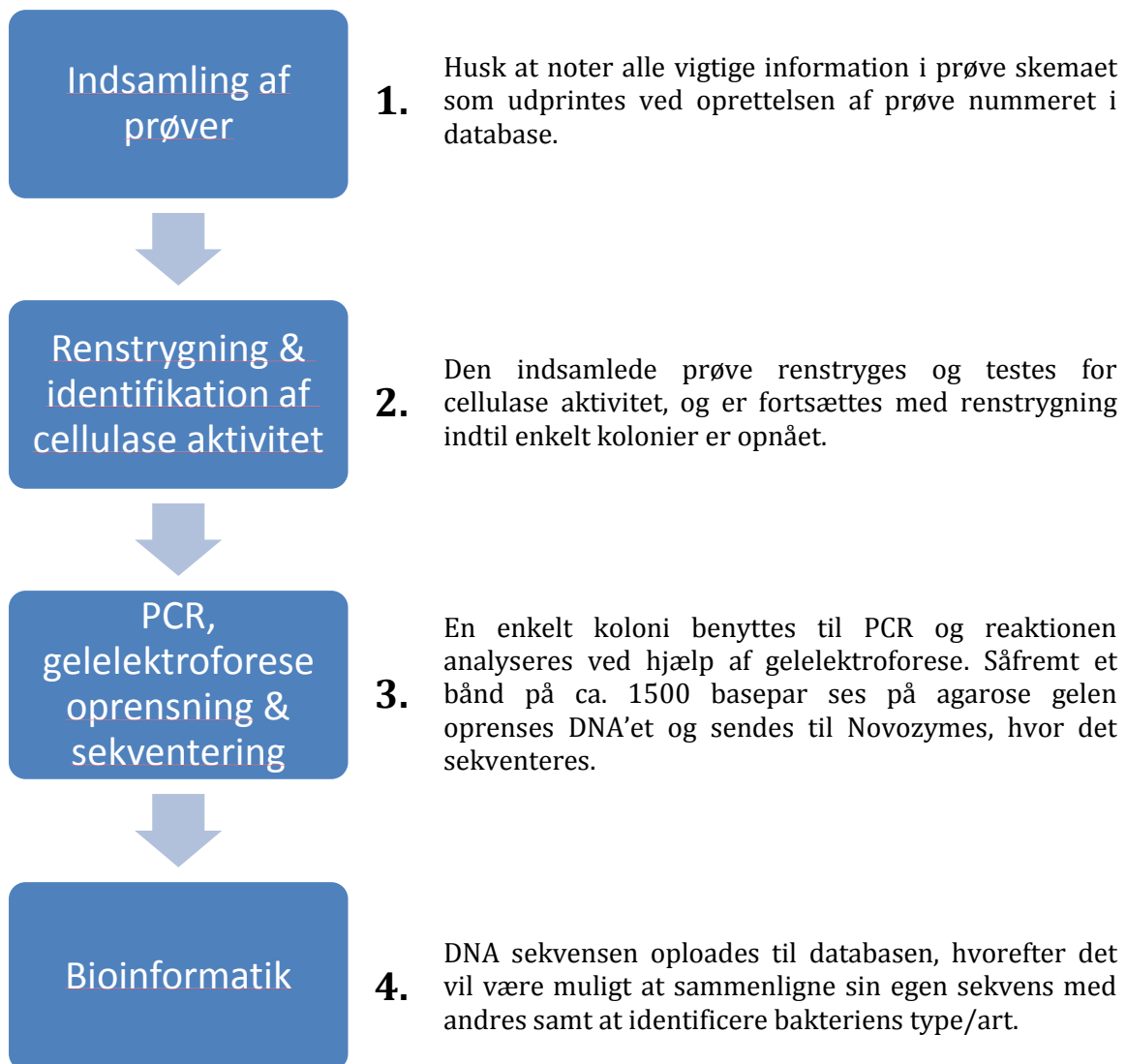
Vi prøvede det!

På **biotechacademy.dk** findes, under menupunktet Lærerindgang, en side kaldet *Vi prøvede det!*. Her samler vi alle de kommentarer, som brugere af vore Biotech Academy projekter indsamler, bearbejder i forhold til de teoretiske og praktiske materialer. Tag derfor meget gerne et par digitale billeder under jeres arbejdsproces med øvelsen og send dem, sammen med jeres samlede erfaringer med projektet, til os på biotech@bio.dtu.dk. Herved vil jeres ris, ros og råd komme andre til gode landet over og I hjælper samtidig os i vore fortsatte bestræbelser på at udvikle og opdatere spændende, udfordrende og aktuelle undervisningsprojekter!

Fra Darwin til bioteknologi

Isolering af cellulaseproducerende bakterier

Flowdiagram over øvelsesforløbet



Før forsøget påbegyndes er det vigtigt at udarbejde en tidsplan for afviklingen som passer ind i klassens øvrige gøremål. Eksempelvis er det meget vigtigt at eleverne har mulighed for at kigge til renstrygningerne dagligt!

1. INDSAMLING AF JORDPRØVE (dag 1)

Inden start!

Først skal gruppen oprettes på hjemmesiden <http://biotechacademy.cbs.dtu.dk/>, hvor gruppen får tildelt et gruppe-ID og password, som begge er vigtige at huske. Notér derfor gruppe-ID og password på denne side.



Gruppe-ID: _____

Password: _____

Som lærer er det en god ide at samle informationerne sammen således at de ikke mistes!

Inden jordprøven opsamles, skal der udskrives et prøve-skema fra databasen!

Når gruppen er oprettet kan prøveopsamlingskemaet downloades ved at logge ind og derefter klikke på "Prøver". Under prøver klikkes på "Opret ny". Her er det muligt at taste data ind omkring prøven. For at få dette skema på papir, klikkes på "Vis udskrift" og prøveopsamlingskemaet udskrives.

Data skal senere indtastes på hjemmesiden. Del 1 på dette prøve-skema vil være gruppe-informationerne, der tidligere er indtastet. **Hvert skema følger én enkelt prøve.**

Prøve nummeret skal benyttes hele vejen gennem dette eksperiment, når plader mm. navngives. Dette er nødvendigt, for at der ikke opstår nogen tvivl om, hvilke jordprøver, stammer og PCR-produkter, der hører sammen.

Nu skal jordprøven indsamles!

Når prøven opsamles, skal man tænke på, at jordoverfladen bliver meget udsat for UV-stråling fra solen, og at ekstreme ændringer i temperatur og fugtighed gør jordoverfladen til et meget omskifteligt klima, sammenlignet med forholdene blot nogle få centimeter under jordoverfladen. Man må også tage i betragtning, at jo længere ned man graver, jo mindre ilt vil der være til stede.

Lærerbemærkning 1:

Godt at tale om dette med eleverne, så de vælger deres jordprøve efter relevante biologiske overvejelser. Her kommer økologien ind. Hvor mon der er størst sandsynlighed for at finde cellulaseproducerende bakterier? Det giver mange kreative overvejelser, som er med til at give eleverne ejerskab til deres prøve og en faglig forståelse for eksperimentet. Der går lidt konkurrence i at have valgt den "bedste" jordprøve. En frysepose og en plastiske udleveres til hver elev, samtidig præciseres at eleven noterer indsamlingssted og dato samt navn og gruppe-ID på posen. Yderligere beskrivelse af indsamlingsstedet i feltjournalen.

VIGTIGT!!

For at reducere risikoen for at isolere patogene bakterier (sygdomsfremkaldende), skal du undgå følgende prøvetyper:

1. Alle former for døde dyr samt jord eller lignende der har været i kontakt med døde dyr.
2. Afføring fra mennesker eller andre sekreter eksempelvis snyt, snot, ørevoks mm.
3. Afføring fra ådselædende dyr – f.eks katte, hunde, ræve mm.

Jordprøven skal opbevares køligt i et 50 ml plastrør med låg (helst i køleskab). Husk tydelig navngivning.

Materialer:

- 50 ml falcon plastrør med låg
- Ske eller lignende
- Prøve-skema til notering af data

Tænk over hvilke steder, du kan forestille dig, at cellulosedbrydende bakterier ville være hyppigt forekommende - for eksempel kompost, skovbund eller bunker med visne blade. Brug en ren ske til at opsamle prøven i plastrøret.

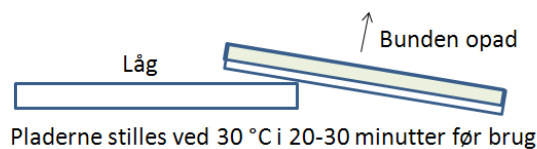


Sørg for at dokumentere prøvetagningen samtidig med opsamling af prøven. Dette gøres ved at udfylde **del 2** på **prøve-skemaet**. Med hensyn til angivelse af position er det muligt på hjemmesiden at angive positionen ved hjælp af Google Earth.

GENERELT OM MIKROBIOLOGISKE TEKNIKKER

Når man arbejder med bakterier, er det vigtigt at arbejde sterilt, da der ellers kommer andre bakterier på pladerne, end dem man ønsker. Alt udstyr (pipettespidser, podenåle, agarplader mm.) skal derfor holdes væk fra andre bakterier. Pladerne skal opbevares i lukkede poser, og man skal kun røre på de steder, der ikke kommer i kontakt med anvendte bakterier og medier.

Før man benytter agarplader er det vigtigt, at overfladen er tør, da bakterierne ellers vil kunne svømme rundt på pladen, og derved spredes utilsigtet. Alle de anvendte agarplader skal derfor sættes ind i et varmeskab (30°C) i 20-30 minutter inden brug, hvis det er muligt. Pladerne sættes med bunden opad på skrå hen over låget, så bakterier i luften ikke falder ned på pladen.



Når pladerne inkuberes er det vigtigt, at de stilles med bunden i vejret, så eventuel kondensvand ikke løber ned på agaren.

HUSK at skrive navn og dato på alle anvendte reagensglas, plader mm. På pladerne skrives der langs kanten på bunden, da lågene kan byttes om.

Det er vigtigt ikke at indtage mad og drikkevarer, når der arbejdes med bakterierne. Husk at vaske hænder grundigt med sæbe inden I starter. Sprit bordet af og sørg for kun at have de ting fremme, som I skal bruge.

Alle laboratorietimer afsluttes med at vaske hænderne grundigt med sæbe.

2. ISOLERING AF BAKTERIER (1. dag eller senere)

I en typisk jordprøve findes der forskellige bakterierarter i store mængder. Således viser videnskabelige studier, at diversiteten i et enkelt gram jord kan omfatte op til flere tusinder forskellige bakteriearter. Når man plader jordprøver ud på agarmedie (plader), ser man i almindelighed kun en mindre del af denne diversitet. Dette skyldes flere forhold. Dels vil der være nogle arter, der forekommer i større populationer. Dels vil der være nogle, der vil gro bedre på det valgte substrat og de valgte dyrkningsbetingelser, idet der foregår en selektion som følge af bestemt pH, temperatur og ilt tilgængelighed mm. De i øvelsen benyttede agarplader tilhører kategorien af medier som kaldes "rich media", og er lavet på ekstrakter af bagegær og indeholder derfor alle næringsstoffer.

2.1 Forbehandling af jordprøven

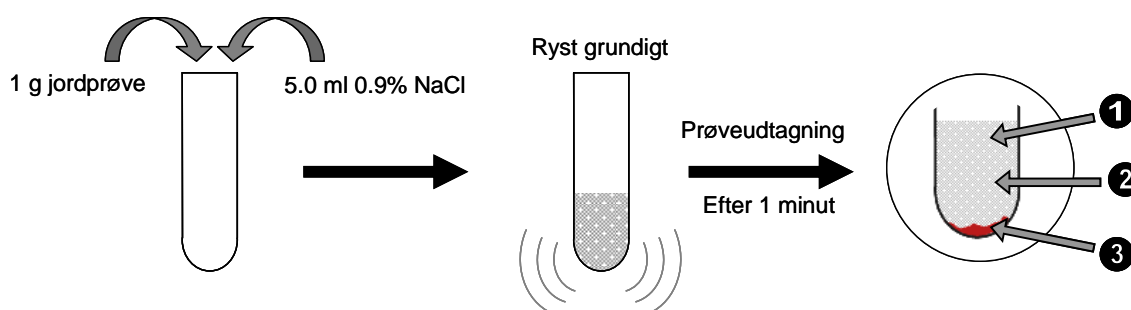
Lærerbemærkning 2:

På grundet den store diversitet kan man med succes vælge at benytte flere forskellige fremgangsmåder, når man skal behandle sin prøve. Af hensyn til resultatet kan det anbefales at der inden dette punkt aftales med nogle af eleverne at de påfører jordprøven direkte på pladen (uden at lave en opløsning først), mens andre udtager deres prøve som beskrevet fra henholdsvis toppen, midten og fra bunden af røret med saltopløsningen af jordprøven.

Materialer:

- Reagensglas eller lignende
- 0,9 % NaCl

Tag ca. 1 gram af jordprøven og overfør dette til rør og tilsæt ca. 5,0 ml 0,9 % NaCl, hvorefter der rystes grundigt. Lad herefter reagensglasset stå i ca. et minut så jord, sand og sten falder til bunds. Det er vigtigt at røret ikke står for længe, da alle bakterierne ellers vil samle sig i bunden. Inden prøveudtagning vælges fra hvilken del af røret prøven ønskes udtages – eventuelt sammen med læren. Man kan eksempelvis vælge at udtage sin prøve fra toppen (1) eller midten (2) af røret – eller vælge et prøveudtag af bund faldet (3).



Lærerbemærkning 3:

Som forberedelse til denne lektion har eleverne læst 2.1 og 2.2. Som indledning kan man bede eleverne om i grupper diskutere/svare på følgende spørgsmål:

- Hvorfor skal man bruge 0.9% NaCl?
- Hvad sker der med bakterierne når I ryster prøven? (visualiser hvad der sker i reagensglasset)
- Hvorfor skal det stå 1 min i røret?

2.2 Udpladning på agarplader

Til læreren: For at udgå kondensvand skal agar pladerne tages ud af køleskabet inden brug og anbringes med bunden i vejret!

Bakterierne (fra saltopløsning/jord) udstryges på de udleverede plader ved hjælp af en blå podenål, så bakterierne bliver fordelt over hele pladen. Pladerne indeholder blå korn, som kun kan opløses i agaren ved tilstedeværelse af cellulaser. Hvis bakterierne producerer cellulaser, vil der opstå en blå zone rundt om disse kolonier og man kan derved se, hvilke af bakterierne der producerer cellulaser. De blå korn er et substrat kaldet AZCL-HE-Cellulose (sælges af Megazyme Inc.), hvor HE-cellulose står for hydroxy-ethyl-cellulose. Det er cellulose, der er kemisk modificeret på en måde så det bliver mere vandopløseligt (cellulose er normalt uopløseligt i vand), og dermed lettere tilgængeligt for enzymer. AZCL hentyder til et azo-farvestof som giver anledning til den blå farve. Princippet i anvendelse af AZCL-HE-cellulose er at når en cellulase nedbryder cellulose, som jo er en kæde af 1,4-betaglykosider, frigives mindre oligoer der har den blå azo-farve bundet. Da disse er vandopløselige vil de langsomt diffundere ud i agarpladen og lave en blå zone. Således vil man rundt om en cellulasepositiv koloni se en blåfarvet zone. Hvis cellulase er rigtig god eller findes i store mængder, vil man se at de blå korn fuldstændig forsvinder.

Lærerbemærkning 4:

Inden udstrykning på pladerne med blå korn kan man lade eleverne øve sig på udstrykning på alm. agarplader, hvis de ikke har arbejdet med bakterier før. Husk at tørringen af agar pladerne med fordel kan være sket inden timen starter. 60 graders varmeskab kan udelades, hvis man kun har et varmeskab. Sørg for at podenålene opbevares i pose lige til de skal bruges! Som indledning kan man bede eleverne om i grupper diskutere/svare på følgende spørgsmål:

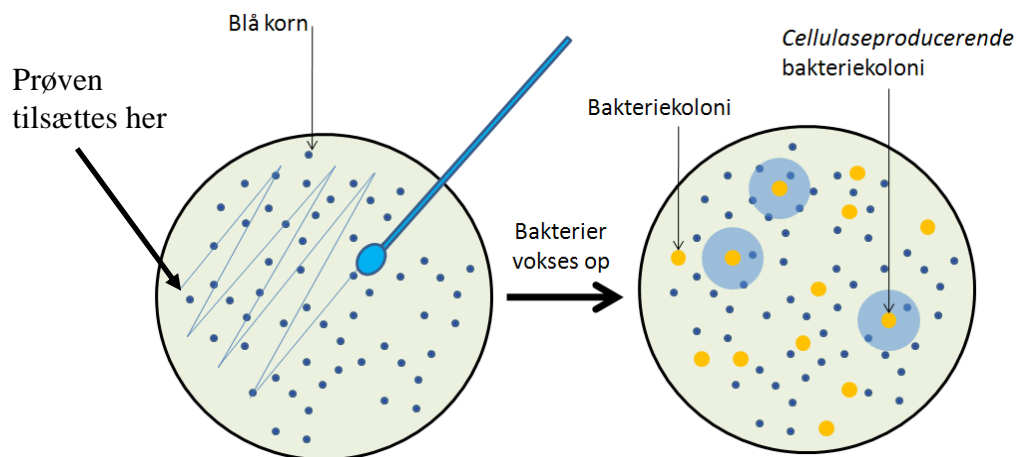
- Hvad er de blå korns funktion?

Materialer:

- Blå podenåle og pipette (gul: 10-100 µl)
- Agarplader med blå korn
- Tape eller poser til pladerne
- Et eller flere varmeskabe (30-60°C)
- Plastik pose eller lign. til brugte podenåle og speedmarker/OH-pen

- a. Hvis der er meget kondensvand på agarpladernes låg rystes det af i laborievasken.
- b. Prøveudtaget foretages med en pipette. Hvis røret med bakterierne har stået for længe rystes det igen, og der ventes 1 minut før prøven udtages. Spidsen føres forsigtigt ned i væsken til det punkt i røret hvor prøven ønskes udtaget. 20 µl væske udtages og overføres til en agarplade, hvorefter den hurtigt fordeles i zigzag bevægelser over hele pladen med en blå podenål. Det er vigtigt at arbejde hurtigt, da de 20 µl væske meget hurtigt opsuges af pladen.
- c. Pladerne inkuberes med bunden i vejret i et døgn. Diversiteten af bakterier gør det muligt at opnå resultater ved inkubation ved meget forskellige temperaturer, og det anbefales såfremt det er muligt at sprede de enkelte plader til forskellige varmeskabe med forskellige inkubationstemperaturer for at øge diversiteten. Såfremt der ikke er adgang til mere end et varmeskab så anbefales det at prøve temperaturer over 30°C (eksempelvis 45°C), da varme tolerante bakterier generelt er de mest interessante når det gælder cellulaser.

Husk at inkubere i lufttætte poser for at undgå udtørring og kontaminering.



Husk at notere, hvilken temperatur bakterierne er inkuberet ved. Dette gøres på prøveskemaet **del 3** (isolat informationer).

Til læreren: Efter at pladerne har stået natten over, stilles de ved stuetemperatur i et døgn eller i køleskab henover weekenden. Dette er nødvendigt for at kunne iagttage cellulaseaktiviteten uden samtidigt at få for meget vækst på pladerne. Desuden skal man være opmærksom på at Azo-farven langsomt vil diffundere ud i pladen efter det er frigivet, og såfremt pladerne står forlænge besværliggøre identifikationen af den eller de cellulase producerende kolonier.

2.3 Rendyrkning (3. dag)

For at pladerne kan benyttes i den videre screening kræves det, at man kan se enkelte isolerede kolonier på pladen. En enkelt koloni repræsenterer en enkelt bakterie fra jordprøven, der har formeret sig op til mange millioner ens bakterier (kloner). I rendyrkningen gælder det om at overføre bakterier fra en bestemt koloni du ønsker at arbejde videre med, til en ny agarplade. Denne næste agarplade kaldes for rendyrkningspladen. Når du med podenålen har opsamlet materiale fra en koloni som du kan se med det blotte øje vil materialet indeholde rigtig mange bakterier. Hvis du kun har taget materiale fra én koloni, der allerede var ren, vil du på rendyrkningspladen kun se ens kolonier. Der er imidlertid en stor risiko for, at din koloni ikke kun består af én bakterietype, da jordprøven består af talrige bakterietyper. Derfor skal de rendyrkes flere gange. I rendyrkningen vil hver enkelt bakterie, som du overfører til rendyrkningspladen, danne sin egen koloni. Renstrygningen fungerer som en fortynding af bakterierne. Det er derfor vigtigt, at denne del fungerer, da det ellers vil være svært at få isolerede kolonier på dine rendyrkningsplader. Det er meget vigtigt for sekventering, at DNA skabelonen som benyttes under PCR reaktionen stamme fra en rendyrket bakteriestamme ellers kan det være svært og oftes umuligt at identificere den.

Materialer:

- Hvide podenåle
- Agarplader med blå korn
- Tape og poser til pladerne samt speedmarker/OH-pen
- Varmeskab 30-60°C
- Bægerglas eller lign. til brugte podenåle

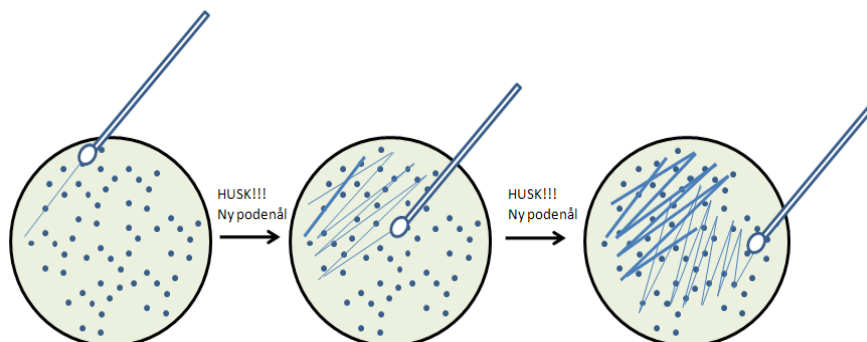
Nu skal der foretages en rendyrkning af den cellulaseproducerende bakteriestamme!

- a. Pladerne fra sidst findes frem og de fremkomne kolonier observeres.



Beskriv de forskellige koloniers udseende – for eksempel farve og form. Dette noteres på prøvenskemaet **del 3** under noter.

- b. En bakteriestamme, der ser ud til at producere cellulaser (koloni omgivet af blå zone) udvælges, og den valgte koloni markeres ved at tegne en cirkel på bunden af petriskålen.
- c. Rendyrkningen udføres ved at tage en hvid podenål som dyppes forsigtigt i kolonien og som derefter afsættes som en streg i kanten af en ny agarplade.



- d. Herefter tages en NY podenål som føres en enkelt gang igennem den afsatte streg og derefter spredes ned over agarpladen i zigzag-bevægelse.
- e. Denne procedure gentages hvor blot endnu en NY podenål føres igennem det netop afsatte spor.

Det er meget vigtigt at der for hvert trin tages en ny podenål, for at undgå, at der sidder for mange bakterier tilbage på podenålen. En klassisk fejl man gør i forbindelse med renstrygninger er, at man ikke stoler på, at der er bakterier, hvis man ikke kan se dem. Derfor ender man ofte med alt for mange bakterier – og uden de ønskede enkeltkolonier!

Rendyrkningsproceduren gentages indtil der er opnået en ren stamme. For hver rendyrkning tager det 1-2 dage før kolonierne er vokset op. Det anbefales, at der udføres mindst 2 rendyrkninger.

3. IDENTIFIKATION AF BAKTERIESTAMME

3.1 DNA-ekstraktion og opformering af 16S-rDNA (5. dag eller senere)

Husk at vaske hænder grundigt med sæbe inden i starter. Sprit bordet af og sørg for kun at have de ting fremme, som I skal bruge.

Materialer:

- PCR-maskine.
- Centrifuge
- PCR-rør
- 1,5 ml eppendorfrør
- Hvide podenåle
- Pipetter med pipettespidser
- Plastik poser til brugte pipettespidser og podenåle
- Renstrøgne kulturer
- Nye agarplader
- MilliQ-H₂O
- Reddy mix
- Primermix
- Sprit til bordene
-

Brug af centrifuge

Eppendorf-rørene skal placeres symmetrisk overfor hinanden i centrifugen, så der er balance under centrifugeringen. Husk at stramme midterskruen på centrifugen inden start. Vedrørende brug af centrifugen: se arbejdstilsynet udtalelse.

Først skal bakteriecellerne ødelægges, så DNA'et kan komme ud i opløsningen!

- 150 µl MilliQ-H₂O overføres til et PCR-rør.
- Én koloni samles op (fra en rendyrket plade) med en hvid podenål og overføres til de 150 µl MilliQ-H₂O i PCR-røret. Sørg for at kun en akkurat synlig mængde af bakterierne ender i PCR-røret. Podenålen benyttes videre til at stryge bakterierne ud på en ny agarplade (inkuberes med bunden i vejret 1 døgn ved samme temperatur som tidligere). Disse friske agarplader skal senere sendes ind til Novozymes, hvis PCR-reaktionen lykkes.

Husk at navngive plade og PCR-rør med prøvenummer, så det fremgår tydeligt, at de hører sammen.

- Sug op og ned et par gange med en pipette, hvis "bakterie-klumpen" ikke er opslemmet.
- PCR-rørene placeres i de små huller i PCR-maskinen. Husk at lukke låget på PCR-rørene fuldstændigt, da væsken ellers fordamper og i værste fald er årsagen til at PCR reaktionen mislykkes.
- Indstil PCR-maskinen til små PCR-rør ved at dreje viseren, når maskinens låg er lukket.

- f. Start PCR-maskinen på programmet ”Lysis”. Opvarmningen i PCR-maskinen gør at bakteriecellerne lyses (bakterierne sprænges), hvorved DNA’et kommer ud i opløsningen. Den resulterende opløsning kaldes *kogelysatet*.

Program ”Lysis”:
99°C i 10 minutter
Herefter 12°C til programmet stoppes

3.2 PCR-reaktion – opformering af DNA’et (5. dag eller senere)

Det anvendte 2x Reddy-mix (2x hentyder til at den skal fortyndes 1:1, hvorved 1x opnås) er baseret på en blanding af to forskellige termostabile polymeraser, kaldet Pfu pol og Taq pol, som tilsammen gør det muligt at syntetiserer DNA fra vanskelige DNA skabeloner (eksempelvis direkte fra bakterie lysater som i jeres tilfælde). Generelt er Taq pol en meget aktiv DNA polymerase (fra bakterien *Thermus aquaticus*) som er særdeles velegnet til korte PCR produkter, mens Pfu pol (fra bakterien *Pyrococcus furiosus*) er specielt god til lange PCR produkter, men tilgængelig ikke nær så aktiv som Taq pol. Pfu polymerase har desuden en aktivitet der kaldes proof-reading, som kort beskrevet kontrollerer at den nye streng ikke indeholder fejl. ReddyMix indeholder desuden dNTP (0.5 mM af hvert nukleotid) samt ficoll og rød farve. Ficoll gør mixen viskøs og øger massefylden, mens den røde farve gør at man kan se om man har loadet gelen korrekt (se senere). Til PCR-reaktionen benyttes desuden et primer-mix, som indeholder to primere, der er specifikke for hver sin ende af 16S rRNA-genet. Primerne er syntetiske fremstillet enkeltstrengt DNA, også kaldet ssDNA, på 20-30 nukleotiders længde.

Lærerbemærkning 5:

Det tager ca 2½ timer at køre PCR-programmet. Husk at sørge for at ingen kommer forbi og slukker for maskinen, når den er kørt færdig. Man kan sætte den i gang og den vil efter kørsel stå på 12 grader til man kommer næste dag.

For hvert kogelysat laves følgende PCR-blanding:

- Til et PCR-rør navngivet med prøve nr. overføres **15,0 µl ReddyMix** med mikropipette.
- Nu tilsættes **3,00 µl primermix**. Vær meget omhyggelig med at få dråberne ned i væsken og sørg for, at I får al primer-mixen afsat.
- Herefter overføres **2,00 µl kogelysat** til samme PCR-rør.
- Til sidst tilsættes **10,00 µl MilliQ-H₂O** således at det totale volumen er 30,0 µl
- PCR røret lukkes og det er meget vigtigt at låget klemmes helt fast, så væsken ikke fordamper under PCR reaktionen.

PCR-rørene sættes herefter ind i PCR-maskinen og programmet ”Darwin” køres. Husk hvor du sætter dit PCR-rør. PCR-produktet kan opbevares på køl i op til en uge. Alternativt kan de fryses ned ved længere tids opbevaring.

Program "Darwin":

94°C i 2 min (denaturering af DNA)

40 cykler af 94°C i 30 sek (denaturering af DNA)

52°C i 30 sek (annealing, primere bindes)

72°C i 1 min 45 sek (DNA-syntese)

72°C i 7 min (færdiggørelse DNA-syntese)

12°C indtil der slukkes for programmet.

Den sidste del er med for, at muliggøre at rørene kan stå natten over.

Til læreren: Såfremt øvelsen skal udføres af flere grupper af elever på forskudte tidspunkter kan det anbefales at dele reagenserne op i mindre portioner for at undgå unødigt opvarmning. Opbevar helst både ReddyMix og primer-mix på is, mens eleverne arbejder med det. Primer-mixet genfryses efter brug. Når ReddyMixen én gang har været tøet op skal det ikke genfryses, men bør opbevares i køleskabet hvor det kan stå i op til 4 uger.

Lærerbemærkning 6:

Rapport/journal 2 om selve PCR

3.3 Gelelektroforese (6. dag eller senere)

Denne del er med for at kontrollere, om der er dannet et PCR-produkt med den rigtige størrelse. Hvis der ikke fremkommer noget bånd på gelen er det ikke lykkedes at opformere genet, der koder for 16S rRNA. Dette kan blandt andet skyldes fejl i DNA-ekstraktionen. Hvis det skridt mislykkes skal PCR-produktet ikke bindes til en mini-kolonne og sendes til Novozymes, da der i så fald ikke er noget DNA i prøven.

Materialer:

- Gel-kar
- Strømforsyning
- Vægt
- Kogende vandbad eller mikroovn
- Engangshandsker
- 250 ml flaske til agar
- 1000 ml kolbe til at fortynde buffer
- Agarose
- 50xTAE-buffer – HUSK at fortynde 50 gange i demineraliseret vand!
- SYBR-safe
- PCR-produkt
- DNA stige (DNA standard med kendte størrelser)

Først skal der støbes en gel!

Støbeformen skal placeres på tværs af karret med gummikanten op langs kanten.

- a. Der afvejes ~ 0,5 gram agarose per gel.
- b. Hertil tilsættes 50 ml 1x TAE-buffer (**1 ml 50x TAE buffer + 49 ml vand per gel**)
- c. Blandingen smeltes i en mikrobølgeovn på mellemste effekt. Afhængig af typen af mikrobølgeovn (effekten) og mængden tager det ca. 1-2 minutter per 50 ml blanding. Kontroller ofte om agarosen er smelt og undgå at den koger over. Vær opmærksom på at opløsning af agarose kræver lidt tids kogning (når man kan ikke længere se små korn, der hvirvler rundt, når man ryster flasken er agarosen helt opløst). Alternativt kan man benytte et vandbad med kogende vand.



Der skal bruges handsker til alt arbejde, hvor der røres direkte ved agarose geler, når SYBR-safe er tilsat. Dette skyldes at SYBR-safe binder til DNA og dermed er potentielt kræftfremkaldende. Se arbejdstilsynets udtalelse.

- d. Så tilsættes 5 μ l SYBR-safe per 50 ml gel. Agarose-opløsningen stilles nu i ca. 10 minutter så den afkøles inden den hældes op i støbeformen. Til sidst sættes kammen sættes i. Gelen stivner i løbet af en halv times tid.
- e. Når gelen er stivnet skal kammen tages op og støbeformen vendes, så brøndene er i minusenden (ved den sorte elektrode).
- f. Gelen skal nu overhældes med TAE-buffer (husk at fortynde bufferen) indtil den er dækket – evt. helt op til ”fill line”, som er markeret i karret.

Lærerbemærkning 7:

Hele denne procedure kan med fordel ses på <http://learn.genetics.utah.edu/units/biotech/gel/>. God som lektie til lektionerne! Da alle jo ikke kan være aktive i denne del på en gang kan man køre animationen fra Virtual lab trin for trin samtidig med at man (lærer plus forskellige elever til de forskellige procedurer) på katedret udfører de forskellige procedurer. En kørende klassedialog om hvad der sker, gør at det er muligt at få alle med i forløbet. Dette kan nås på en dobbeltlektion. Man kan ikke nå at køre gelen færdig, her må læreren slukke for gelen efter lektionen.

Nu kan gelen loades!

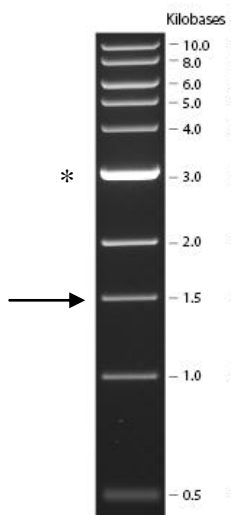
- a. Der overføres 5 μ l PCR-produkt pr. brønd på gelen (Resten af PCR-produktet skal bruges senere, hvis denne del af eksperimentet lykkes). Undgå at stikke pipettespidsen ned i brøndene, men hold pipetten forsigtigt over brønden (men nede i TAE-bufferen!), mens PCR-produktet langsomt tømmes ud. Husk ikke at slippe stemplet før spidsen er løftet af gel-karret. PCR-produktet falder ned i brønden, da opløsningen har højere massefylde end TAE-bufferen. Husk at notere, hvilken gruppe/hvilke gruppemedlemmer, der loader i hvilke brønde, så man bagefter kan se, hvem der har haft succes med forsøget og derfor skal rense sit PCR-produkt op og sende det til Novozymes.
- b. Der påsættes en eller to standardreferencer a 10 μ l per gel alt afhængigt af pladsen.
- c. Når alle har sat deres prøver på gelen, tændes for strømmen til gelen (120 V, 400 mA, 40 minutter). Husk at DNA'et løber mod plus-polen, så det er vigtigt, at strømkablerne er monteret rigtigt (sort/blå = negativ / rød = positiv).
- d. Efter 40 minutter ved den nævnte strømstyrke er gelen kørt færdig. Tjek evt. ved at lægge gelen på lysbordet og se på den gennem den orange skærm. Er standardreferencens bånd synligt adskilte, er gelen kørt tilstrækkeligt længe. Ellers lægges gelen tilbage i karret og køres lidt længere. Dog bør gelen maksimalt køres i 1 time, da Sybr-safe og DNA'et ellers risikerer at blive adskilt.

Lærerbemærkning 8:

Punkt e udføres i den efterfølgende time, billederne uploades på Lectio/elevernes konference-system

- e. Der tages billeder af gelen i UV lys fra lysbordet. Følg vejledningen til kameraet. Det blå lys vil synliggøre DNA gennem det bundne SYBR-safe og fluorescerer grønt i det blå lys. Se eventuelt <http://www.biotechacademy.dk/undervisningsprojekter/darwin/Eksperimenter/Protokol%20til%20fotoudstyr.aspx>

Hvis PCR-reaktionen er forløbet som den skal, vil der være et bånd ud fra størrelsesmarkøren ved ca. 1500 nukleotider svarende til 16S-rRNA-produktet.



Her ses et billede af standardreferencen. Enheden for de forskellige båndstørrelser er bp – basepar. Jeres PCR-produkter skal ligge omkring det tredje bånd fra bunden (se pilen). Brug eventuelt det kræftige bånd ved 3 kb som udgangspunkt(*).



Skriv prøvenumret ud for hver brønd på billederne!

Lærerbemærkning 9:

Man kan fint lave den 3. rapport/journal over gelelektroforesen.

3.4 PCR fragment oprensning (7. dag eller senere)

Hvis det ud fra gelelektroforesen ses at der er DNA i prøven skal det nu oprensnes

Oprensningens formål er at fjerne primere, nukleotider og DNA-polymerase fra PCR-produktet således at prøven kan anvendes til DNA-sekventering som kræver en ren template.

Materialer:

- Centrifuge
- Minikolonner
- Opsamlingsrør
- 1,5 ml Eppendorfrør
- Bindings Buffer (BB)
- Vaske Buffer (VB)
- Eluerings Buffer (EB)
- PCR-produkt
- Speedmarker/OH-pen



Erfaringsmæssigt er det en god ide at blive fortrolig med de buffere der indgår i oprensningsproceduren inden denne påbegyndes. En forkert anvendelse af disse vil medføre at DNA'et går tabt.

Oprensningen foregår ved følgende procedure:

- a. Til de resterende PCR-produkt (25 µl) tilføres 100 µl Bindings buffer (BB) i PCR-røret. Der suges op og ned et par gange med pipetten til det er blandet. Den røde farve skifter til en lys gul.
- b. Blandingen overføres til en minikolonne, som placeres i opsamlingsrøret.. **Husk at skrive Gruppe-ID på opsamlingsrøret, så prøverne ikke forbyttes og husk at lukke låget!**
- c. Mini-kolonnen og opsamlingsrøret placeres nu i centrifugen. **Det er vigtigt at placerer rørene således, at centrifugen er i afbalanceret under rotationen.** Der centrifugeres 1 minut ved 11.000 RPM (rotationer pr minut). Se venligst arbejdstilsynets udtalelse.
- d. Minikolonnen fjernes fra opsamlingsrøret og den gennemløbne væske kasseres, hvorefter kolonnen sættes tilbage i opsamlingsrøret.
- e. **Der tilsættes nu 600 µl Vaske Buffer (VB) til minikolonnen** og centrifugeres atter i 1 minut ved 11.000 RPM.

- f. Minikolonnen fjernes fra opsamlingsrøret og den gennemløbne væske kasseres, hvorefter kolonnen sættes tilbage i opsamlingsrøret.
- g. Der centrifugeres 2 minutter ved 11.000 RPM.
- h. **Den nu tørre mini-kolonne placeres i et nyt 1,5 ml eppendorfrør og der tilsættes 30 µl Eluerings buffer (EB) til kolonnen.** Husk at skrive prøve nr. på eppendorfrøret, så prøverne ikke forbyttes.
- i. Lad det stå ved stuetemperatur i 3 minutter, mens NE-bufferen suger ned i kolonnen.

- j. Der centrifugeres 1 minut ved 11.000 RPM. **Man kan kun centrifugere 4 prøver af gangen – se billede.** Husk at sætte rotorlåget ned over rotoren inden centrifugen startes! Ellers vil lågene flyve af og beskadige centrifugen. Den væske som opsamles i røret indeholder det oprensede PCR produkt.



- l. Gem det oprensede PCR-produkt i fryser eller køleskab til det skal sendes ind til Novozymes.



På prøveskemaet **del 4** noteres, hvilken dato oprensningen er foregået. Under noter noteres f.eks. hvor stærke båndene fra gelen var.



Alle informationer, der er noteret på prøveskemaet tages ind i databasen. Til sidst klikkes på ”vis udskrift” under fanen ”prøver” og printes. Dette færdigudfyldte prøveskema sendes med til Novozymes for hvert oprenset PCR-produkt, der indsendes.

3.5 Sekventring

Det oprensede PCR-produkt (Eppendorf røret) samt agar-pladerne med stammer, der svarer til PCR-produkterne sendes til Novozymes. Der skal desuden vedlægges et print af gelfotos som dokumentation af PCR-produktet således at Novozymes kan dosere det korrekt under sekventeringen. Til sidst er det vigtigt at prøve-skemaet sendes med. Jordprøven skal ikke medsendes.

Husk at vedlægge:

- Oprensede PCR-produkt
- Agarplader med rene stammer
- Print af gelfotos
- Prøve-skema hørende til det oprensede PCR-produkt



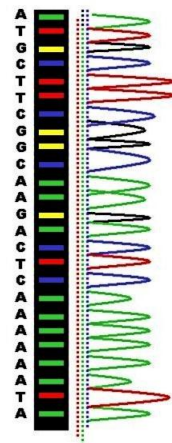
Alt skal være markeret tydeligt med prøvenummer, så der ikke opstår nogen tvivl, om hvad der hører til hvem og hvad. Pak evt hvert ”sæt” separat i en plastpose.

Det hele kommer i en pakke og sendes til:

Att. Preben Nielsen
Novozymes A/S
Krogshøjvej 36, 1BS.19
2880 Bagsværd

PCR-produkterne sekventeres inden for ca. 3 arbejdsuger og uploades herefter på hjemmesiden.

Sekventeringen udføres ved hjælp af en særlig form for PCR reaktion, hvor der kun anvendes en primer og en særlig blanding af nukleotider bestående af dNTP og ddNTP. ddNTP (Dideoxynukleotider) er en type nukleotid-analoger der har til formål at forhindre, at DNA strengen kan forlænges (3' mærke OH gruppen i ribose ringen mangler), hvorved syntesen af det pågældende DNA-molekyle stoppes. Hver base-type er desuden kovalent koblet til en unik fluorescens-markør. Under PCR reaktionen stoppes syntesen af DNA'et tilfældige steder, hvor der indsættes ddNTP i stedet for dNTP, og ved efterfølgende af adskillelse af DNA'et strengene på baggrund af deres størrelse kan sekvensen aflæses af en skanner og det fluorescerende ddNTP for enden af strengen.



4. Fylogenetiske træer

Vigtigt

Skulle nogle mod forventning ikke få et PCR produkt, og derved en DNA sekvens, kan du som lærer indsamle numrene på de grupper der mangler data, og sende disse til Hans Henrik Stærfeldt (hhs@cbs.dtu.dk) - så vil han oploade sekvenser til de gruppe numre der mangler således, at de kan fortsætte arbejdet med det fylogenetiske træ.

Når sekvensfilerne er oploadede, vil I få besked fra Novozymes. I kan nu begynde at arbejde med de fylogenetiske træer. Dette gøres på hjemmesiden <http://biotechacademy.cbs.dtu.dk>, hvor grupperne tidligere er blevet oprettet. Her er det muligt at se sekvensen samt at lave sequence alignment og opbygge fylogenetiske træer ved at klikke på fanen ”analyser”. Det kan godt tage lidt tid, hvis der er mange der bruger serveren på én gang. Følg vejledningen på hjemmesiden og brug evt. menupunktet ”hjælp” (se eventuelt database vejledningen).