

Forsøgsvejledning: Isolering og identifikation af cellulaseproducerende bakterier

Fra Darwin til bioteknologi

Arbejdstilsynet har i forbindelse med godkendelsen af øvelsen understreget at følgende regler skal overholdes, og fundet at gennemførslen 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 PCR-maskinen.
- Det er kun elever på 3.g niveau og lærere der må støbe agarosegeler
- Eleverne er undergivet tilsyn af en undervisning under øvelsernes udførelse
- Det må ikke være muligt at der er adgang for alle og enhver til de mobile laboratorier

Indholdsfortegnelse

Introduktion.....	2
Forsøget i praksis.....	3
Generelt om mikrobiologiske teknikker	5
Indsamling af jordprøve (Dag 1)	6
Isolering af bakterier (Dag 2)	7
Rendyrkning (Dag 3 og 4)	10
Identifikation af bakteriestamme (Dag 5)	12
Gelelektroforese (Dag 6)	15
Prøveskemaer.....	18

Introduktion

Denne øvelse går ud på at finde og isolere cellulaseproducerende bakterier. Efterfølgende undersøges bakterien for at se om det er en typisk cellulaseproducerende bakterie, eller om det er en ny og spændende bakterie. Først opsamles en jordprøve eller lignende fra lokalområdet. Med specielle agarplader udføres en screening for at finde cellulaseproducerende bakterier. Der findes mange forskellige bakterier som kan nedbryde cellulose, og de har alle lidt forskellige cellulaser. Når forskere forsøger at lave en ny effektiv cellulase er meget værdifuldt for dem at få fat i nye cellulaseproducerende bakterier og deres cellulaser. Anden del af forsøget går ud på at identificere de isolerede bakterier vha. *Polymerase Chain Reaction*, PCR og gelelektroforese. Ved at analysere resultatet af 3 PCR reaktioner kan man se om man har fundet en af de to normalt fundende bakterier, eller om man har fundet en ny spændende bakterie. I en PCR reaktion laves rigtig mange kopier af et bestemt stykke DNA. De to primere i en PCR reaktion bestemmer hvilket stykke DNA som bliver kopieret. Hvis DNA-skabelonen ikke er tilstede, vil reaktionen ikke lave noget produkt. Ved at lave primere som er specifikt virker på gener i bestemte bakterier, kan man med PCR undersøge om man har fundet den givne bakterie. I Tabel 1 ses en oversigt over de primersæt som bruges i forsøget. Det ses hvilket gen primerne forsøger at opformere, i hvilke bakterier genet findes og hvad funktionen af PCR-reaktionen er.

Tabel 1. Oversigt over primermix som bruges til forsøget

Primersæt	Opformeret gen	Gen findes i	Funktion af PCR
A	16S rRNA	Alle bakterier	Positiv kontrol
B	Endo-1,4- β -glucanase	<i>Bacillus subtilis</i>	Artsidentifikation
C	α -amylase	<i>Bacillus licheniformis</i>	Artsidentifikation

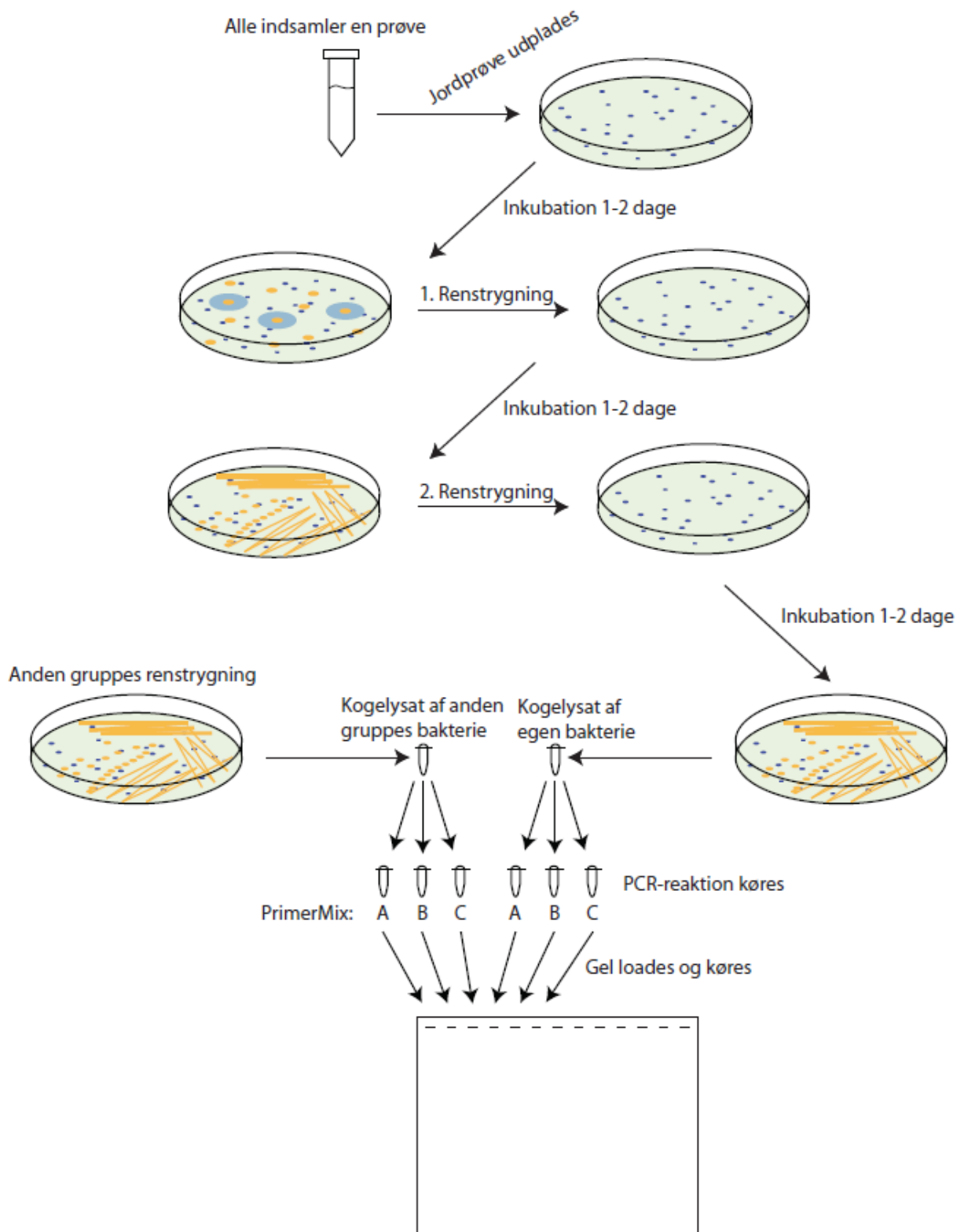
Hvis man oprenser og sekventerer det DNA som dannes med primersæt A, 16S rRNA, kan man artsidentificere sin bakterie. 16S rRNA spiller en central rolle i proteinsyntesen, og findes i alle bakterier. Samtidig er sekvensen også lidt forskellig fra organisme til organisme. Derfor kan sekvensen af 16S rRNA bruges til at identificere bakterien. Med primersæt B og C vil man kun få et PCR produkt hvis bakterien man undersøger er henholdsvis *B. subtilis* eller *B. licheniformis*. Derfor kan disse PCR-reaktioner bruges til at artsidentificere de to bakterier. DNA'et som dannes i PCR-reaktionerne undersøges vha. gelelektroforese. Det er både en kvantitativ undersøgelse, der viser om man har fået lavet noget DNA, og en kvalitativ undersøgelse der viser hvor stort et stykke DNA man har fået lavet. Hvis gelelektroforesen viser at den positive kontrol fra primersæt A giver et PCR produkt, men der ikke opformeres noget DNA med primersæt B og C, så har man fået fat i en anden bakterie.

Forsøget i praksis

Det anbefales at det tilhørende teorimateriale læses forud for eksperimentet. Det er desuden en god ide at læse og forstå alle instruktioner, og danne sig et overblik inden forsøget startes. Eksperimentet er designet til at der arbejdes i op til 8 grupper á 2-4 elever. Hver elev indsamler sin egen jordprøve hvorfra der isoleres en bakteriestamme ved renstrygning. Hver gruppe udvælger én renstrøget bakterie stamme som analyseres med PCR. For at sikre sig at der arbejdes videre med den størst mulige biodiversitet kan alle klassens bakteriestammer med fordel sammenlignes visuelt, så der vælges så morfologisk forskellige stammer som muligt. Hvis tiden tillader det kan man eventuelt se på bakteriecellerne i mikroskop. For at sikre sig mod fejl er det ofte vigtigt at lave dobbeltbestemmelser. Derfor skal hver gruppe lave de 3 PCR-reaktioner både på sin egen bakterie, og på en af de andre gruppers bakterie. Sørg for at hver gruppes bakterie bliver undersøgt to gange. Se en oversigt over forsøget på næste side. Det anbefales at se de forskellige videoer som illustrerer laboratorieteknikker undervejs gennem projektet. Det er en nødvendighed for succes med forsøgene at man kan bruge en pipette. Derfor anbefales det at der trænes med brugen af pipetter først. Fx kan der afsættes 1 µl dråber af vand på bordet. Det kan hurtigt ses om alle har den samme størrelse dråber. Det er specielt vigtigt at kunne arbejde med små volumener, da resultatet af PCR reaktionen er meget afhængig af at de de angivende volumener pipetteres korrekt.

Rigtig god fornøjelse!

Oversigt over hele forsøget



Generelt om mikrobiologiske teknikker

I laboratoriet

Det er forbudt at indtage mad og drikkevarer, når der arbejdes med bakterier. Mad, drikke og overtøj skal opbevares uden for laboratoriet. Husk at vaske hænderne grundigt med sæbe inden I starter. Alle bordeoverflader hvor der arbejdes med bakterier skal før arbejdet påbegyndes tørres af i 70% ethanol (eventuelt husholdningssprit, 500ml + 200 ml vand). Efter arbejdets afslutning rengøres bordene på samme måde. Alle laboratorietimer afsluttes med at vaske hænderne grundigt med sæbe.

Sterilteknik

Når man arbejder med bakterier, er det vigtigt at arbejde sterilt, ellers kommer der andre bakterier på agarpladerne, end dem man ønsker. Alt udstyr (pipettespidser, podenåle, agarplader mm.) skal derfor holdes sterilt. Agarpladerne skal opbevares i lukkede poser, og generelt skal man kun røre ved 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 spredes utilsigtet. Hvis det er muligt skal alle anvendte agarplader derfor sættes i varmeskab (30 °C) i 20-30 minutter inden brug. Agarpladerne sættes med bunden opad på skrå hen over låget, så bakterier i luften ikke falder ned på pladen. Når agarpladerne inkuberes med bakterier, er det vigtigt at de stilles med bunden i vejret, så eventuel kondensvand ikke løber ned på agaren.

Det anbefales at man ser denne film for at få et bedre indblik i sterilteknik:

<https://vimeo.com/30976210>

HUSK at skrive navn og dato på alle anvendte reagensglas, agarplader mm. på agarpladerne skrives der på bunden, da lågene kan byttes om.

Pipettering

Det kræver en del øvelse at bruge en pipette naturligt. Man skal være omhyggelig med at pipettere, og det anbefales at man først øver sig med vand. En pipette har tre knapper. Toppen kan drejes for at indstille volumenet der udtages. Knappen på toppen skubber et stempel inde i pipetten op og ned, og det er den man bruger til at udtage et volumen med. Den har to forskellige stop. Først et blødt stop og så et hårdt stop, når man trykker lidt mere ned. Volumenet udtages ved først at trykke ned til det bløde stop og suge op. Det hårde stop bruges når prøven skal afsættes til at skyde ekstra luft ud, hvilket sikrer at al væsken kommer ud. Før man udtager et volumen skal der sættes en engangspipettespids på pipetten. Den skydes af igen når man er færdig ved at trykke på den sidste knap.

Det anbefales at man ser denne video for bedre at forstå brugen af pipetter:

<https://vimeo.com/30977240>

Indsamling af jordprøve (Dag 1)

Det er vigtigt at holde styr på hvor hvornår og i hvilken biotop en prøve er taget, og hvem der har taget prøven. Udfyld derfor løbende prøveskemaet på side 19. Andre observationer som ikke er defineret i prøveskemaet kan også tilføjes. Skriv f.eks. hvordan koloniernes morfologi for den renstrøgne bakterie ser ud. Disse data er vigtige, hvis man skal bruge stammen til noget senere. Det er vigtigt med en entydig nummerering af de forskellige jordprøver, således at det er helt klart hvilke PCR produkter der tilhører hvilken bakteriestamme og hvilken prøve stammen kommer fra. For at holde styr på prøverne skal I derfor sørge for at hver prøve har sit eget unikke nummer som skal skrives på agarplader, PCR-rør osv. Brug skemaet på side 18 som hjælp.

Materialer dag 1

- 50 mL Falconrør med låg
- Ske
- Prøveskema til notering af data

Tænk over hvilke steder du kan forestille dig at cellulosedbrydende bakterier er hyppigt forekommende - for eksempel kompost, skovbund eller bunker med visne blade. Brug en ren ske til at opsamle prøven i plastrøret. Jordprøven skal opbevares køligt (helst i køleskab).

Husk tydelig navngivning.

Nu skal jordprøven indsamles!

Når prøven tages, skal man tænke på at alle bakterier godt kan lide en smule fugt. Hvis man tager prøver fra en knastør jordoverflade vil mængden af levende bakterier være meget lav. Man kan også overveje andre parametre som skal være optimale, for at øge sandsynligheden for at der er cellulaseproducerende bakterier i prøven.

VIGTIGT!

For at reducere risikoen for at isolere patogene (sygdomsfremkaldende) bakterier, 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 **spyt, snot, ørevoks** mm.
3. **Afføring fra ådselædende dyr** – f.eks. katte, hunde, ræve mm.

Isolering af bakterier (Dag 2)

I en typisk jordprøve findes der forskellige bakteriearter i store mængder. Videnskabelige studier viser at diversiteten i et enkelt gram jord kan omfatte op til flere tusinder forskellige bakteriearter. Når man plader jordprøver ud på agarplader, 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 kan gro bedre på det valgte substrat under de valgte dyrkningsbetingelser. Der sker en selektion som følger af pH, temperatur og ilttilgængelighed mm. De agarplader der benyttes i øvelsen tilhører kategorien af rige medier, hvilket betyder at mediet indeholder mange forskellige næringsstoffer, hvor nogen bakterier kan nøjes med færre. De mange forskellige næringsstoffer kommer fra ekstrakter af bagegær.

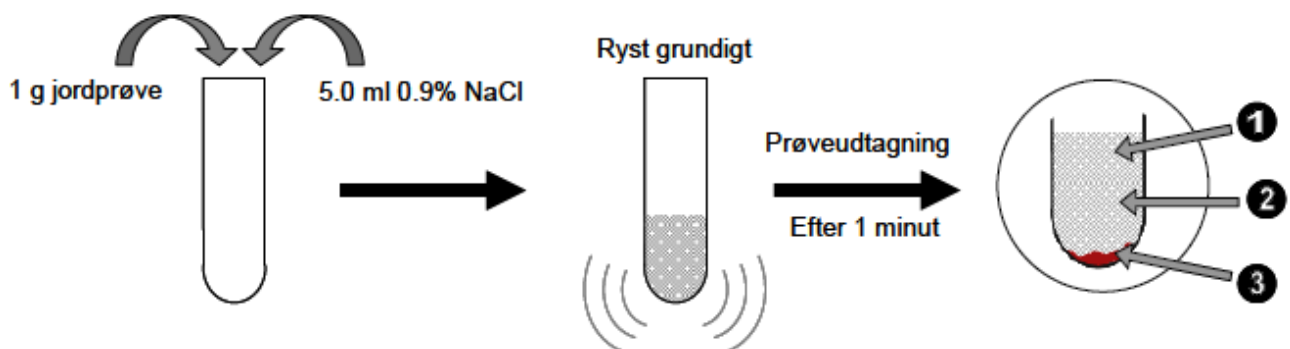
Forbehandling af jordprøven (Dag 2, del 1)

Materialer (Dag 2, del 1)

- Reagensglas eller lignende
- 0.9% NaCl i vand

Fremgangsmåde (Dag 2, del 1)

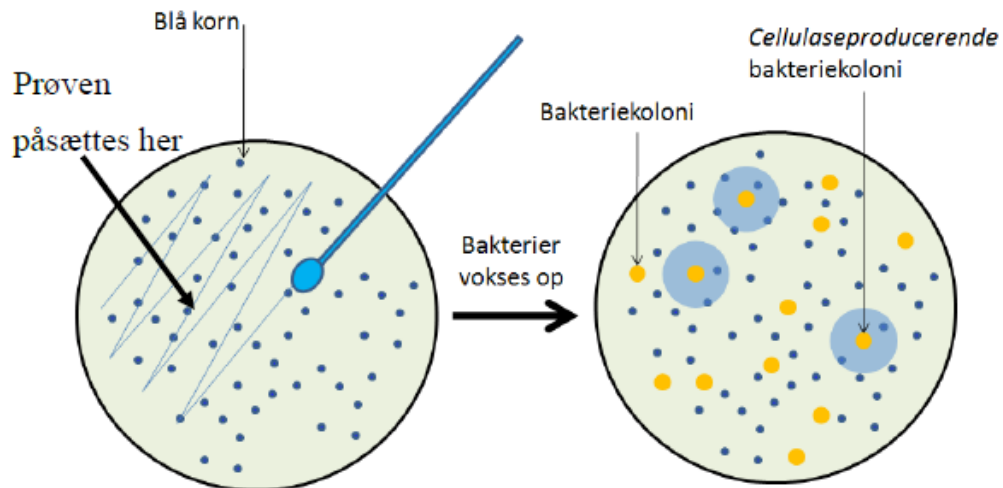
- Tag ca. 1 g af jordprøven og overfør dette til rør og tilsæt ca. 5 ml 0.9 % NaCl.
- Ryst grundigt og lad herefter reagensglasset stå i 1-10 minutter så jord, sand og sten falder til bunds. Det er vigtigt at røret ikke står for længe, da bakterierne efterhånden vil samle sig i bunden. Inden prøveudtagning besluttet hvilken del af røret prøven skal tages fra – eventuelt sammen med læreren. Man kan eksempelvis vælge at udtage sin prøve fra toppen (1) eller midten (2) af røret – eller vælge et prøveudtag af bundfaldet (3).



Dag 2 del 2: Udpladning på agarplader

Til læreren: For at tørre agarpladerne skal de tages ud af køleskabet inden brug og anbringes i varmeskab som beskrevet tidligere.

Salt/jord-opslæmningen med bakterier udstryges på de udleverede agarplader ved hjælp af en blå podenål, så bakterierne bliver fordelt over hele pladen. Tag kun én podenål ud af posen ad gangen for at undgå kontaminering. Ved tilstedeværelsen af cellulaser opløses de blå korn i agarpladerne og blå farve frigives i agaren. Hvis en bakterie producerer cellulaser vil der dannes blå zoner rundt om dens kolonier. De blå korn er et stof kaldet AZCL-HE-Cellulose (produceret af Megazyme Inc.). Normal cellulose er uopløseligt i vand men HE-cellulose, som står for hydroxy-ethylcellulose, er kemisk modificeret så det er mere vandopløseligt. AZCL hentyder til et azofarvestof som giver den blå farve. Cellulase vil nedbryde cellulosekæden ved at spalte 1,4-beta glykosid-bindinger. Det frigiver vandopløselige oligosakkarider med den blå azo-farve kovalent bundet. De blåfarverede oligosakkarider vil efterfølgende langsomt diffundere ud i agarpladen og danne en blå zone. Hvis cellulase har en høj aktivitet vil man se at de blå korn fuldstændigt forsvinder, og agaren vil farves kraftigt blåt.

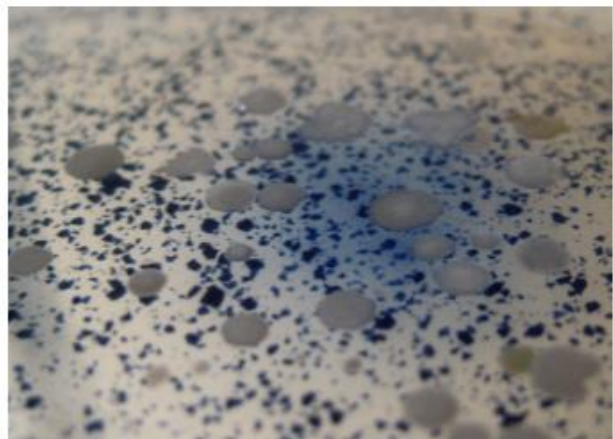


Materialer (Dag 2 del 2)

- Blå podenåle
- Pipetter (10 – 100 μ L)
- Agarplader med blå korn
- Tape og poser til agarplader
- Varmeskab (30 - 60° C)
- Affaldspose til brugte podenåle
- Sprittusch

Fremgangsmåde (Dag 2 del 2)

- Hvis der er meget kondensvand på agarpladernes låg rystes det af i laborievasken.
- Prøven udtages med pipetten. Hvis røret med bakterierne har stået for længe, rystes det igen, og der ventes 1 minut før prøven udtages. Spidsen føres ned i væsken. 20 µl væske udtages og overføres til en agarplade. Væsken stryges forsigtigt ud over hele agarpladen med en blå podenål. De 20 µl væske vil relativt hurtigt opsuges af pladen, men bakterierne fordeles alligevel ud over pladen.
- Agarpladerne stilles i plastikposer og 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, for at øge diversiteten, at sprede de enkelte agarplader til forskellige varmeskabe med forskellige inkubationstemperaturer. Såfremt der ikke er adgang til mere end et varmeskab så anbefales det at prøve temperaturer over 30°C (eksempelvis 45°C), da varmetolerante bakterier generelt er de mest interessante når det gælder cellulaser. Evt. kan agarpladerne inkuberes et døgn mere, hvis kolonierne ikke er store nok.
- Noter temperatur og inkuberingstid i skemaet på side 19. Husk at inkubere i poser for at undgå udtørring og kontaminering.



Figur 1. Venstre: En udpladning af bakterier.
Højre: Et nærbillede af en cellulaseproducerende bakteriekoloni

Rendyrkning (Dag 3 og 4)

For at man kan undersøge en bakteriestamme skal man først have en agarplade, hvor der kun gror denne bakterie. En såkaldt renkultur. Det opnår man gennem renstrygninger. At opnå en renkultur kræver at man kan lave en renstrygning, hvor man kan se enkelte isolerede kolonier på pladen. En enkeltkoloni opstår ved at én enkelt bakterie har formeret sig til mange millioner ens bakterier (kloner). I renstrygningen gælder det om kun at få fat en bakteriekoloni, ellers vil der være flere forskellige bakterier på rendyrkningspladen. Når man med podenålen har opsamlet en koloni som man kan se med det blotte øje, vil der være rigtig mange bakterier på podenålen. Hvis det er lykkedes kun at tage materiale fra én koloni, der allerede var ren, vil man på rendyrkningspladen kun se ens kolonier. Så har man en ren kultur. Der er imidlertid stor risiko for at få forskellige bakterier med, når man forsøger at tage en enkeltkoloni fra udpladningen af jordprøven. Derfor skal bakterien rendyrkes af flere gange, indtil rendyrkningspladen er helt ren. På rendyrkningspladen vil hver enkelt bakterie danne sin egen koloni. Renstrygningen fungerer som en fortynding af laget af bakterier på pladen, så de til sidst ligger så spredt at de laver enkeltkolonier.

Det anbefales at man ser følgende video for bedre at forstå renstrygningsteknik:

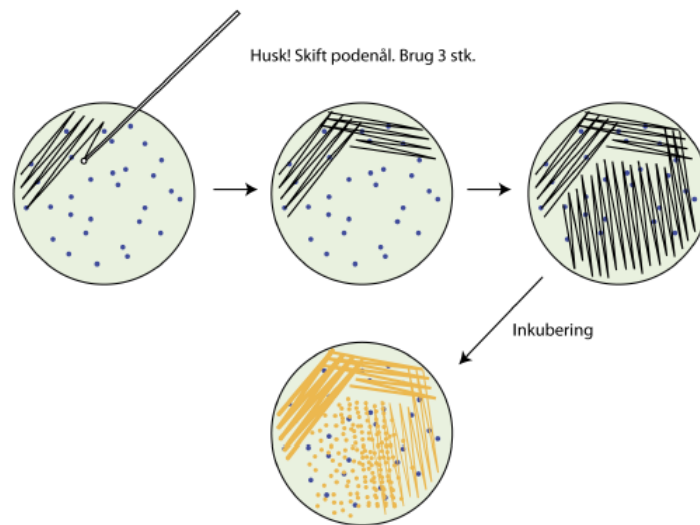
<https://vimeo.com/30977209>

Materialer (Dag 3 & 4)

- Hvide podenåle
- Agarplader med blå korn
- Tape og poser til agarplader
- Sprittusch
- Varmeskab 30 – 60 °C
- Affaldspose til brugte podenåle

Fremgangsmåde (Dag 3 & 4)

- Agarpladerne fra sidst findes frem og de fremkomne kolonier observeres.
- 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.
- 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 (se figur 2).
- Herefter tages en **NY** podenål som føres en enkelt gang igennem den afsatte streg og derefter spredes ned over agarpladen i zigzag-bevægelser.
- Denne procedure gentages med endnu en **NY** podenål som føres igennem det netop afsatte spor.



Figur 2. Mønster for renstrygning. Husk at skifte podenål mellem hvert strøg. Nederst ses plade med enkeltkolonier efter inkubation.

En klassisk fejl i forbindelse med renstrygninger er ikke at stole på at der er bakterier, da 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. Der skal udføres mindst 2 rendyrkninger. I hver gruppe udvælges til sidst én rendyrkning, og denne bakterie vil blive undersøgt videre. Hvis gruppen slet ikke har nogen rendyrkninger som viser cellulaseaktivitet, kan gruppen evt. lånes fra en anden gruppe som har en cellulasepositiv rendyrkning tilovers.

Identifikation af bakteriestamme (Dag 5)

DNA-ekstraktion af PCR amplifikation (Dag 5 del 1)

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

Materialer (Dag 5 del 1)

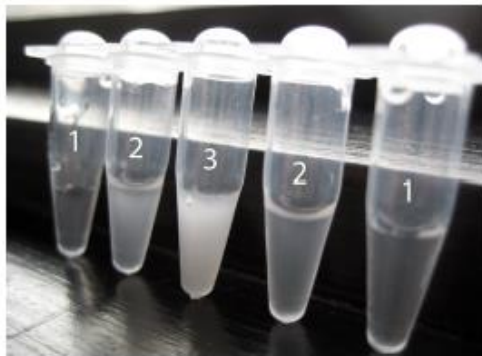
- PCR-maskine
- 8 PCR rør
- Hvide podenåle (små)
- Pipetter og pipettespidser
- Affaldsposer til pipettespidser og podenåle
- Renstrøgne kulturer
- Agarplade
- MilliQ vand
- ReadyMix
- Primermix A (16S rRNA)
- Primermix B (endo-1,4- β -glucanase)
- Primermix C (α -amylase)

Fremgangsmåde (Dag 5 del 1)

Først skal bakteriecellerne åbnes, så DNA'et kommer ud i opløsningen. Dobbeltbestemmelsen starter her, I skal derfor **også ekstrahere DNA fra en anden gruppes bakterie**. Sørg for at der laves dobbeltbestemmelse på alle bakterier, ved at nogen også undersøger jeres bakterie.

- Til hvert af to PCR-rør overføres 100 μ l MilliQ-H₂O.
- Én koloni samles op fra gruppens egen rendyrkede plade med en hvid podenål og overføres til de 100 μ l MilliQ-H₂O i det ene PCR-rør. Sørg at overføre så mange bakterier, at vandet ikke er helt klart. Podenålen benyttes videre til at stryge bakterierne ud på en ny agarplade (som inkuberes med bunden i vejret, 1 døgn, ved samme temperatur som tidligere).
- På samme måde samles en koloni op til dobbeltbestemmelse fra en anden gruppes renstrykning med en hvid podenål og overføres til de 100 μ l MilliQ-H₂O i det andet PCR-rør.

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



Figur 3. Kogelysats med forskellige mængde bakterier. 1: For få bakterier. 2: Perfekt mængde bakterier. 3: Alt for mange.

- Sug op og ned et par gange med en pipette, hvis bakterieklumperne 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.
- Indstil PCR-maskinen til små PCR-rør ved at dreje viseren, når maskinens låg er lukket.
- 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 *kogelysat*.

PCR Programmet "Lysis":

1. 99 °C, 10 minutter
2. Pause på 12° C

PCR-reaktion – opformering af DNA'et (Dag 5, del 2)

Det anvendte 2x ReddyMix (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 syntetisere DNA fra vanskelige DNA skabeloner (eksempelvis direkte fra bakterielysater som i jeres tilfælde). Generelt er Taq pol en meget aktiv DNA polymerase fra den termofile bakterie *Thermus aquaticus*. Den er særdeles velegnet til korte PCR produkter, mens Pfu pol, fra bakterien *Pyrococcus furiosus*, er specielt god til lange PCR produkter, men til gengæld ikke nær så aktiv. Pfu polymerase har desuden en aktivitet der kaldes proofreading, som 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 (tyktflydende) og øger massefylden, mens den røde farve gør at man kan se om man har loadet gelen korrekt (se senere). Til hver PCR-reaktion benyttes desuden et primermix, som indeholder to primere, der er specifikke for hver sin ende af henholdsvis 16S rRNA-genet, endo-1,4-β-glucanase genet (cellulase genet) i *B. subtilis* og α-amylasegenet i *B. licheniformis*. Primerne består af syntetisk fremstillet enkeltstrengt DNA, også kaldet ssDNA, hver på 20-30 nukleotider.

Tabel 2. Eksempel på hvordan gruppe 7 kunne markere PCR-rørene.

Kogelysat	Primersæt A	Primersæt B	Primersæt C
Eget kogelysat	7-7A	7-7B	7-7C
Gruppe 3's kogelysat	7-3A	7-3B	7-3C

Hver gruppe skal i alt lave 6 PCR-reaktioner. Tre forskellige PCR-reaktioner på hvert kogelysat. Forskellen på de tre reaktionerne er hvilket primersæt der bruges. Mærk derfor først rørene med prøvenummer og primersæt (A, B eller C). Husk at I også skal kunne kende rørene fra de andre holds rør. I hvert af de 6 rør laves først følgende blanding:

- Til PCR-rør navngivet med prøvenummer og primersæt overføres **15.0 µL ReadyMix** med pipette.
- Herefter overføres **2.0 µL kogelysat** (kogelysat fra jeres egen bakterie i tre af rørene, og jeres kogelysat fra en anden gruppes bakterie i de tre andre).

- Til sidst overføres **10.0 µL MilliQ-H₂O**. Nu mangler der blot primere for at blandingen er færdig. Sørg for at der til hvert rør tilsættes det rigtige primersæt!
- Tilsæt **3.0 µL primermix**. Vær meget omhyggelig med at afsætte dråberne nede i væsken og sørg for at det hele bliver afsat. Det totale volumen bliver i alt 30.0 µL.
- PCR-røret lukkes og det er meget vigtigt at låget klemmes helt fast, så væsken ikke fordamper under PCR-reaktionen. Fire hold sætter deres PCR-rør ind i PCR-maskinen og programmet "**Darwin**" køres. Programmets forløb kan ses herunder. Husk hvor du sætter dit PCR-rør. Resten af holdene sætter deres PCR-rør i en holder, så læreren senere kan sætte dem i PCRmaskinen og starte den. PCR-produktet kan opbevares på køl i op 4 uger. Alternativt kan de fryses ned for længere tids opbevaring. PCR-reaktioner der ikke har været i PCR-maskinen endnu kan opbevares på køl i 2-3 dage, eller på frost.

Forslag: Har man ikke ReadyMix til rådighed, kan man i stedet for nøjes med at bruge en almindelig PCR reaktion. Hver reaktion kan bestå af:

- 17 µL MilliQ vand
- 3 µL primermix
- 3 µL 10x PCR Buffer (hørende til DNA polymerasen)
- 2 µL kogelysat
- 2 µL 5 mM dNTP (dATP, dTTP, dCTP og dGTP)
- 1 µL DNA Polymerase (f.eks. Taq polymerase)

Reaktionen vil have en slutvolumen på 30 µL, og resten af forsøget fortsætter som beskrevet, på nær loading af gel, hvor 2 µL 6x Loading dye også skal loades med i brønden, når 10 µL PCR produkt loades. Dette gøres nemmest, ved at blande 10 µL PCR produkt, med 2 µL 10x loading dye, i et nyt PCR rør.

Fire hold sætter deres PCR-rør ind i PCR-maskinen og programmet "**Darwin**" køres. Programmets forløb kan ses herunder. Husk hvor du sætter dit PCR-rør. Resten af holdene sætter deres PCR-rør i en holder, så læreren senere kan sætte dem i PCRmaskinen og starte den. PCR-produktet kan opbevares på køl i op 4 uger. Alternativt kan de fryses ned for længere tids opbevaring. PCR-reaktioner der ikke har været i PCR-maskinen endnu kan opbevares på køl i 2-3 dage, eller på frost.

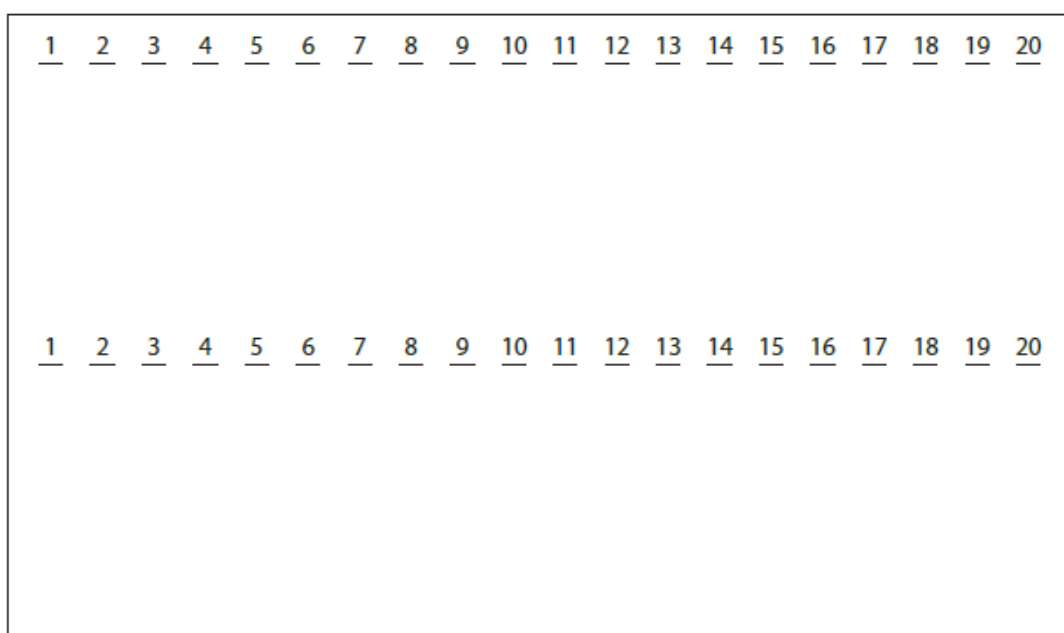
PCR-Program "Darwin"

- 94°C i 2 min (denaturering af DNA)
- 40 cykler a
 - 94°C i 30 sekunder (denaturering)
 - 52°C i 30 sekunder (annealing)
 - 72°C i 1 min 45 sekunder (elongering)
- 72°C i 7 minutter (sidste elongering)
- 12°C pause

Det sidste trin sørger for at DNA'et holdes køligt, hvis nu PCR-maskinerne skal stå natten over, før PCR-rørene fjernes.

Gelelektroforese (Dag 6)

I denne del identificeres hvilken bakterie man har fundet. Ved at loade PCR-produkterne på en gel, og sætte strøm til, vil DNA'et bevæge sig ind i gelen og separeres i bånd, alt efter hvor lange DNA-kæderne er. Skan stregkoden for at se hvordan en gelelektroforese virker. I den positive kontrol opformeres 16S rRNA, og hvis et bånd ses i den rigtige størrelse, så ved man at det er lykkedes at lave en PCR-reaktion som virker. I modsatte fald kan man kun stole på PCR-reaktion B og C, hvis der er lavet et PCR-produkt. Hvis den positive kontrol ikke virker kan det f.eks. skyldes at DNAekstraktionen ikke har virket. Hvis der kommer bånd i den rigtige størrelse med primermix B, er genet for endo-1,4- β -glucanase i *B. subtilis* opformeret, og det kan konkluderes at bakterien er *Bacillus subtilis*. Hvis der kommer bånd i den rigtige størrelse med primermix C, er genet for α -amylase i *B. licheniformis* opformeret, og bakterien må derfor være *Bacillus licheniformis*. Der kan loades 40 prøver i hvert gel kar, inklusiv DNA stiger. Husk at notere på oversigten hvor jeres prøver er loadet og i hvilket gel kar.



Det anbefales at man ser følgende video for bedre at kunne forstå gelelektroforese:

<https://vimeo.com/30977257>

Materialer (Dag 6)

- Gel kar, inklusiv støbeform, endestykker, kamme og ledninger
- Strømforsyning
- Vægt
- Kogende vandbad eller mikrobølgeovn
- Engangshandsker
- 250 mL flaske til agarose
- 1 L kolbe til fortynding af TAE buffer
- Agarose
- 10x eller 50x TAE buffer (HUSK Fortynding i det angivne forhold med demineraliseret vand)
- SYBR-safe
- 6 PCR-produkter fra dag 5, del 2
- DNA-ladder
- Grydelapper

Fremgangsmåde (Dag 6)

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

Støbelse af gel

Først sættes silikone endestykkerne på indsatsen og den stilles på en vandret flade. Kammene sættes i over de røde striber. For hver gel som støbes gøres følgende:

- a) Der afvejes ~ 1.5 gram agarose som overføres til en 250 ml flaske.
- b) Der tilsættes 150 ml 1x TAE-buffer (**3 ml 50x TAE buffer + 147 ml vand**).
- c) Agarosen opløses i vand ved kogning i en mikrobølgeovn. Sørg for at låget sidder løst, så dampen kan komme ud. Afhængig af typen af mikrobølgeovn (effekten) tager det ca. 1-2 minutter per flaske. Undgå at agarosen koger over. Når blandingen koger skrues ned på laveste effekt, og gelen koges i ca. 1 min. Kontrollér om agarosen er fuldstændigt smeltet, agarosen skal være helt opløst, så man ikke kan se små korn. Alternativt kan man benytte et vandbad med kogende.
- d) Køl gelen til ca. 50-60 °C og tilsæt 15 µl SYBR-safe. Fordele ved at slynge let. Temperaturen behøver ikke være nøjagtig. Tilsæt SYBR-safe når blandingen er kølet så man kan holde på glasset uden at brænde sig.
- e) Hæld gelen op i støbeformen. Gelen stivner i løbet af en halv times tid.
- f) Når gelen er stivnet skal kammene tages op og endestykkerne tages af. Gelen lægges i karet så brøndene er i minus-enden (over de røde striber, ved den sorte elektrode).
- g) Gelen skal nu overhældes med 1x TAE-buffer (**fortyndet!**) indtil begge kamre er fyldte og gelen lægger under væske.

Loading af gel

h) Hvert hold loader de 6 PCR-produkter. For hvert PCR-produkt overføres 10 µL til en brønd i gelen. Undgå at stikke pipettespidsen ned i bunden af brøndene, men hold pipetten forsigtigt i toppen af brønden, mens PCR-produktet langsomt tømmes ud (blødt stop). Det er vigtigt spidsen af pipetten ikke rører selve gelen, da gelen vil fungere som prop, og PCR-produktet risikerer at blive skudt ud og komme op af brønden igen. Slip først stempelet når før spidsen er løftet op af gelkarret, ellers suges prøven op igen. PCR-produktet falder ned i bunden af brønden, da opløsningen har højere massefylde end TAE-bufferen. Husk at notere hvilken gruppe der loader og hvad der loades i de forskellige brønde.

i) Der påsættes 10 µl DNA Ladder mellem hver gruppes 6 prøver. Alt afhængigt af pladsen kan flere påsættes.

j) Når alle har sat deres prøver på gelen, tændes for strømmen til gelen (110 V, 200 mA, 45 minutter). Husk at DNA'et løber mod plus-polen (DNA er negativt ladet pga. fosfat grupper), så det er vigtigt, at strømkablerne er monteret rigtigt (sort/blå = negativ / rød = positiv). (**Vigtigt:** Sørg for at gelen ikke "løber over". Dette gøres lettest ved at kigge på markørbåndene, der er synlige med det blåtte øje.)

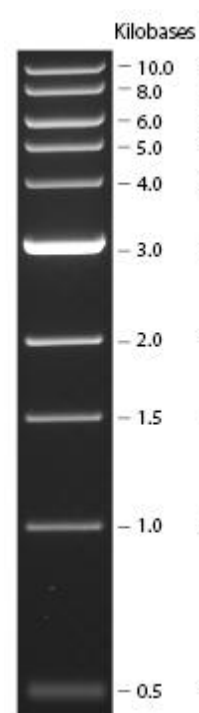
k) Efter 45 minutter er gelen kørt færdig. Tjek evt. ved at lægge gelen på lysbordet og se på den gennem den orange skærm. Er markørens bånd synligt adskilte, er gelen kørt tilstrækkeligt længe. Ellers lægges gelen tilbage i karret og køres lidt længere. Dog bør gelen maksimalt køres i 1 time, da Sybr-safe og DNA'et ellers risikerer at blive adskilt. Gelen flyttes ved at tage hele indsatsen op.

l) Der tages billeder af gelen i blå lys fra lysbordet. Det blå lys vil synliggøre DNA ved at det bundne SYBR-safe fluorescerer grønt i det blå lys. Se eventuelt vejledning online.

Hvis PCR-reaktionen er forløbet som den skal, vil PCRproduktet for 16S rRNA lave et bånd ved ca. 1500 bp. De to andre tests er positive for hhv. *B. subtilis* og *B. licheniformis*, hvis der er bånd ud for ca. 1350 bp med primersæt B og C (hvis både B og C er positive er stammen *B. subtilis*).

Til højre ses et billede af standardreferencen. Enheden for de forskellige båndstørrelser er kilobasepar (1000 basepar). 16S rRNA PCR-produkter skal ligge omkring det tredje bånd fra bunden. Produkt B og C ligger ved ca 1300 bp lidt længere nede, men stadig over 1.0 kb båndet. Brug eventuelt det kraftige bånd ved 3 kb som udgangspunkt.

Bemærk: Flere forskellige typer DNA ladder findes. Disse kan have DNA-fragmenter af forskellige størrelser, end dem vist til højre. Referer altid til manualen der følger med.



Prøveskema – Information om isolat

Navn	
Navne på gruppens medlemmer	
Gruppe nummer	
Prøvenummer	
Position	
Dato for prøvetagning	
Biotop	
Jordtype	
Jordtemperatur	
Dyrkningsdato	
Inkubationstid (døgn)	
Dyrkningstemperatur	

Forklaring

Gruppe nr: Bruges internt i klassen til at hold styr på prøverne.

Prøvenummer: Hver jordprøve får sit eget nummer når prøven oprettes online.

Position: Hvor i landet er prøven indsamlet.

Biotop siger noget om det miljø som prøven er taget i. Man kan skrive en af disse biotoper: Altankasse, boligkvarter, bred ved ferskvandssø, bred ved saltvandssø, bred ved vandløb, dyrestald, eng, ferskvandssø, grøftekant, granskov, hav, have, havgrotte, hede, indlandsklit, industrikvarter, klippe, indland, kystklit, løvskov, landbrugsmark, landbrugsmark (økologisk), markskel, marsk el. vadehav, mose, overdrev, saltvandssø, stengærde, strand, ved hav, strandeng, vandløb, vejkant.

Jordtype beskriver typen af den jord som prøven er taget fra. Man kan skrive en af disse jordtyper: Dyreeksremitter, ferskvand, kalkjord, lerjord, mudder, muldjord, plantemateriale (førne), saltvand, sand, sandjord, tørvejord.

Dyrkningsdato: Datoen for hvornår opdyrkningen af bakterier fra jordprøven er begyndt.