

Den molekulære mikrobiologi og dens redskaber



Forsøgsvejledning

Navn:

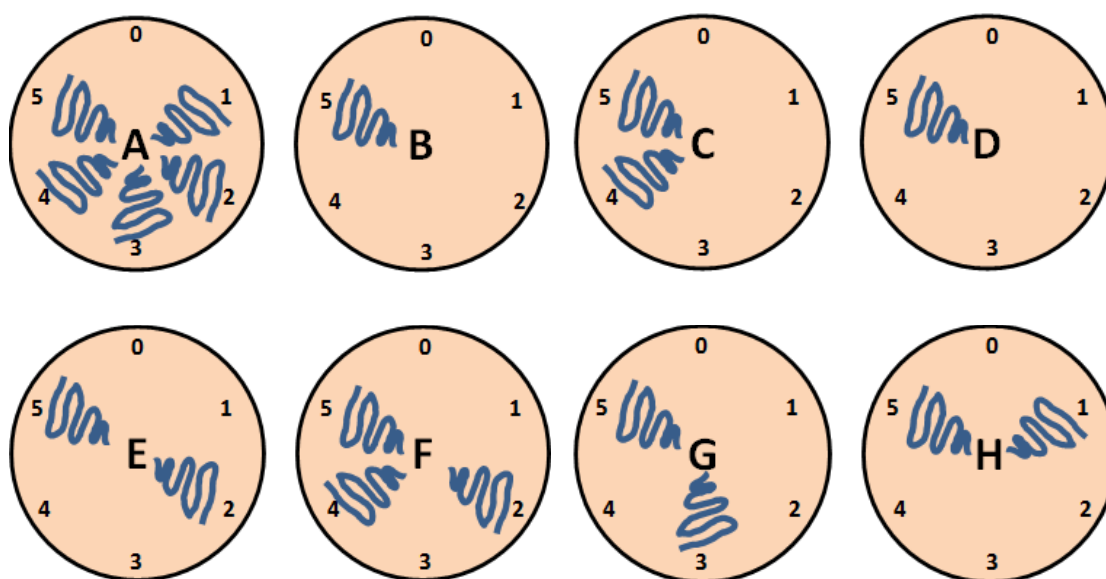
Del 1 – Aminosyre auxotrofi i muteret gær

Introduktion til øvelsen

Bagegær, også kaldet *Saccharomyces cerevisiae*, bruges som modelorganisme til at belyse den centrale metabolisme (stofskifte) i eukaryoter. Gær er normalt selv i stand til at syntetisere alle 20 aminosyrer, der er brug for i proteinsyntesen. Men efter en mutation har man kunne isolere mutanter, der er auxotrofe for en række aminosyrer, dvs. de mangler evnen til at syntetisere en eller flere organiske forbindelser, som er nødvendige for deres vækst. **Figur 1** viser fem forskellige *S. cerevisiae* stammer, dyrket på otte forskellige medier (**Tabel 1**).

Tabel 1:

Medie A	Rigt kompleks medie (Gærekstrakt + peptone + dextrose)
Medie B	Minimal-medie uden tilsatte aminosyrer
Medie C	Minimal-medie + homocystein
Medie D	Minimal-medie + isoleucin
Medie E	Minimal-medie + threonin
Medie F	Minimal-medie + methionin + threonin
Medie G	Minimal-medie + lysin
Medie H	Minimal-medie + prolin



Billede 1: Udpladning af mutanter stamme 1-5 på medie A-H.

Spørgsmål 1.1:

Angiv i tabellen nedenunder, hvorvidt der er vækst (+) eller ingen vækst (-) for hver stamme, groet på de angivne medier. (Se **Figur 1**)

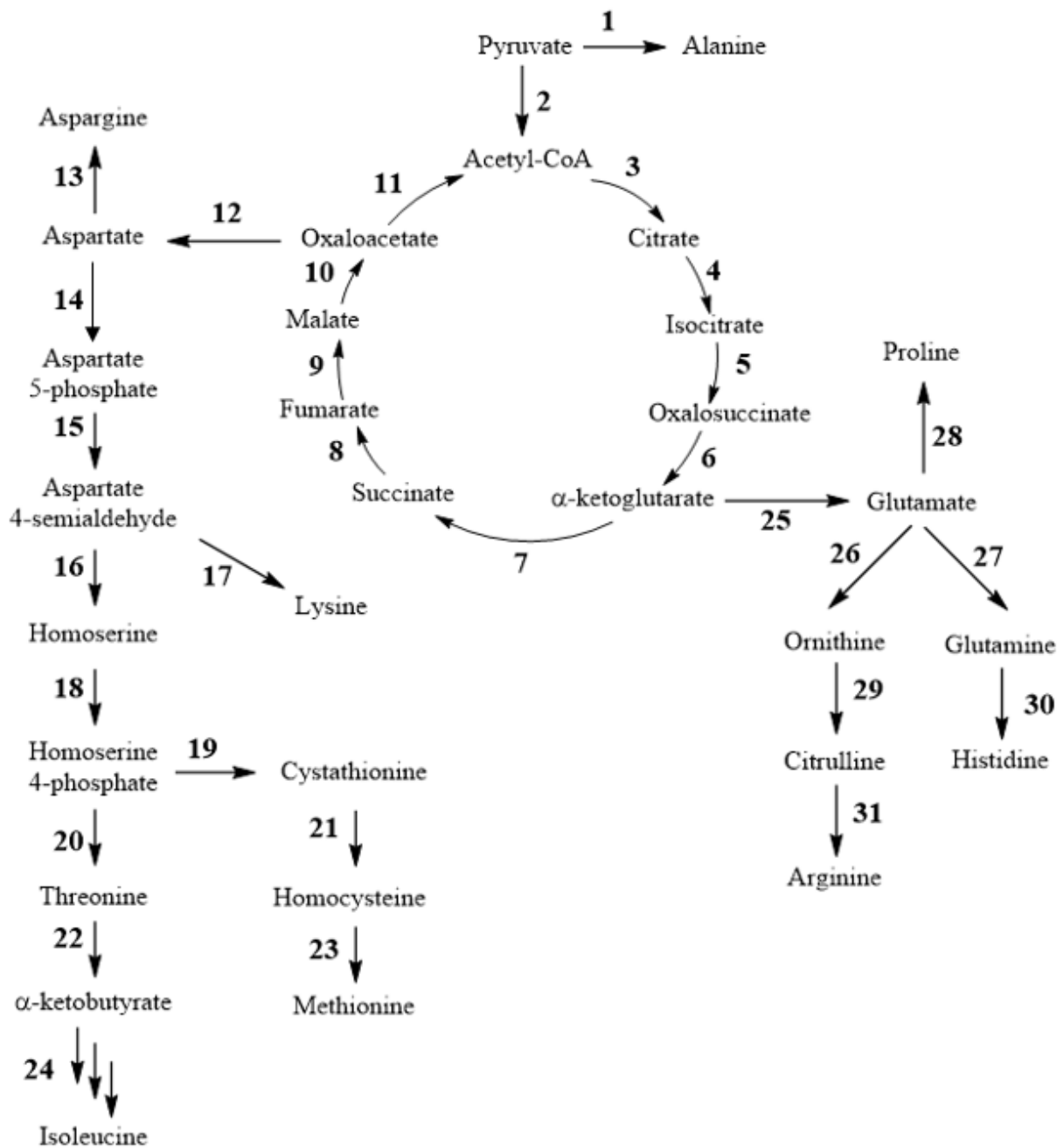
	Stamme 1	Stamme 2	Stamme 3	Stamme 4	Stamme 5
Medie A					
Medie B					
Medie C					
Medie D					
Medie E					
Medie F					
Medie G					
Medie H					

Spørgsmål 1.2:

Baseret på det vækstmønster du har angivet i tabellen ovenfor, skal du angive hvilket enzymatisk trin, der ikke virker (hvis der er nogen), for hver af de fem stammer.

Angiv, for hver mutant, hvilket trin, der er muteret ved at angive et nummer (1-31) eller med 0 hvis intet trin er muteret (se oversigten i **Figur 2**).

	Stamme 1	Stamme 2	Stamme 3	Stamme 4	Stamme 5
Enzymatisk trin					



Figur 2: Simplificeret model for biosyntesen af aminosyrer i gær.

Del 2 – Genotyping af gær-mutant på baggrund af PCR

PCR

PCR (*Polymerase Chain Reaction*) er en af de mest udbredte molekylærbioologiske teknikker i dag og er helt uundværlig i mange situationer. PCR udnytter et af naturens egne enzymer, DNA-polymerase, til at opkopiere en bestemt DNA-sekvens i en række gentagne cyklusser. Med PCR er det altså nemt og hurtigt at skabe millioner af kopier af så lidt som én DNA-streng.

Ideen med PCR er at foretage et antal gentagne cyklusser, hvor en udvalgt DNA-sekvens kopieres i hver cyklus og dermed principielt fordobles i antal for hver gang. Ligesom i naturen kan DNA-polymerase kun kopiere DNA, hvis der er korte såkaldte *primer*-sekvenser af **komplementær** DNA til stede. Primerne binder til DNA'et der, hvor kopieringen skal begynde.

Primere: DNA har som bekendt to strenge, der løber i hver sin **retning** (3' til 5' og 5' til 3'). Derfor vil DNA-polymerase i PCR også kopiere de to strenge i hver sin modsatte retning. Dette indebærer, at der skal bruges to forskellige primere - én til start af kopiering i hver retning. DNA-polymerase bygger nemlig udelukkende en ny streng op i retningen fra 5' til 3'. Den streng, enzymet bruger som skabelon, skal altså gå modsat, dvs. fra 3' til 5'.¹

Introduktion til øvelse

Man har isoleret en muteret gærstamme, der for at vokse behøver *tyrosin* og *phenylalanin* i sit vækstmedie. Der er dog ikke blevet udført nogle eksperimenter for at teste, hvorvidt denne gærstamme kan vokse på et medie uden *tryptofan*. Man ved desuden at kun ét enkelt gen er påvirket i mutanten.

Din opgave er at bestemme hvilket gen, der er muteret ved hjælp af PCR og efterfølgende gelelektroforese på de opformerede DNA-stykker. Til dette er der fem primerpar til rådighed. Disse kan ses i **Tabel 2**

Hver af primerne kan via PCR opformere en dysfunktionel allel i et af de gener, hvori der kan være sket en mutation. Disse alleler koder hver for et af fem nøgle-enzym, der er med i biosyntesen af aromatiske aminosyrer, som det kan ses i **Figur 3**.

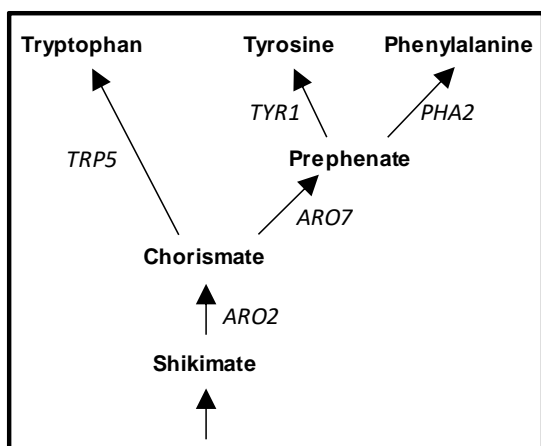
Generne for de fem nøgle-enzym navngives i kursiv tekst f.eks. *TYR1*. Genet koder for det tilsvarende enzym, som dannes via proteinsyntesen, hvilket betegnes i normal tekst f.eks. TYR1.

¹ Artikel udgivet af Biotech Academy: <https://www.biotechacademy.dk/undervisning/gymnasiale-projekter/diabetes-2/del-1-genetisk-test-foroegget-diabetesrisiko/#1510835532557-d71c70ff-3b84>

Spørgsmål 2.1

Ved kombination af resultaterne fra **to** ud af de fem mulige primerpar, vil det være muligt at bestemme den genetiske basis for ernæringsbehovet observeret hos gær mutanten.

Husk den information der var i starten af opgaven: Mutantens egenskab til at vokse i et medie uden tryptophan er ikke blevet eksperimentelt testet. Angiv hvilke primers du vil anvende i **Tabel 3**.



Figur 3: Den biosynetiske reaktionsvej for dannelsen af aminosyrer og de gener, der koder de enkelte enzymer igennem hele processen.

Primerpar	Gene	Size of PCR product (bp)	
		Wild type	Mutant
A-forward + A-reverse	<i>TYR1</i>	500	400
B-forward + B-reverse	<i>PHA2</i>	500	250
C-forward + C-reverse	<i>ARO7</i>	500	250
D-forward + D-reverse	<i>TRP5</i>	500	350
E-forward + E-reverse	<i>ARO2</i>	500	300

Tabel 2: De tilgængelige primerpar, med de gener de kan opformere og produkt-længden angivet i basepar, for hhv. vildtypen og mutanten.

	PCR Rør 1	PCR Rør 2	PCR Rør 3	PCR Rør 4	PCR Rør 5	PCR Rør 6
Wild Type DNA	X	-	-	X	-	-
Mutant DNA	-	X	-	-	X	-
Primer Pair (A-E)						

Tabel 3: Oversigt over indhold i de 6 PCR-rør.

Dråbeøvelse

Fremgangsmåde

Inden I går i gang med forsøget, skal I vise underviserne, at I kan finde ud af at pipettere.

- Hver person i gruppen skal lave tre dråber på 1 μl samt tre dråber på 5 μl .
Dråberne laves af det vand på bordet.
- Dråberne skal godkendes af en EduForce-underviser inden i må gå videre.

5 μl			1 μl		
Person 1	Person 2	Person 3	Person 1	Person 2	Person 3
•	•	•	•	•	•
•	•	•	•	•	•
•	•	•	•	•	•

PCR-genotyping af gærmutanten

Husk at skifte pipettespids imellem hvert reagens.

Forberedelse af Master-Mix til PCR reaktionen, sker i et 1.5 ml eppendorfrør.

- Find rækken af 0.2 ml PCR-rør.
- I et nyt tomt eppendorfrør som i markerer "MasterMix" blandes følgende:
 - 196 μl MilliQ
 - 70 μl Polymerase buffer (pb)
 - 30 μL dNTP
 - 7 μL DNA polymerase (Polymerasen hentes hos underviserne). DNA polymerasen skal tilsættes som det sidste.
- Bland alle reagenserne ved at pipettere op og ned 5-10 gange, med en pipette sat til 100 μl .
- Marker tydeligt pcr-rørene med numrene 1-6 på låget (svarende til **Tabel 3**), så du ved hvad der er i de enkelte rør efter PCR-reaktionen er kørt færdig.

Forberedelse af prøverne til PCR-maskinen.

- Pippettr 44µl Master-mix ned i hvert af de seks PCR-rør, der er mere master-mix end der er behov for. For overblik se evt. **Tabel 3**.
- I rørene **1 til 3** tilsættes 5 µl af primerpar C
- I rørene **4 til 6** tilsættes 5 µl af primerpar E.
- Tilsæt 1 µl vildtype template DNA til rør **1 og 4**.
- Tilsæt 1 µl mutant template DNA til rør **2 og 5**.
- Tilsæt 1 µl MilliQ vand til rør **3 og 6**.
- Bland alle tingene ved at pipettere op og ned 5-10 gange, med en pipette sat til 30 µl.
- Produktet i PCR-rørene pipetteres nu over på en picoPCR plade. Husk at nummerere rørene.
- Når alle 6 prøver er overført til pladen, lukkes den med tape og PCR-maskinen startes.
- For at køre en PCR vælges programmet SRP. Den polymerase vi anvender kan ved 70°C syntetisere DNA med en hastighed af 25 bp/sek.
- Hvis I ikke allerede har støbt en gel, gå til underviser for at støbe geler. Gå til punktet "**Støbning af gel til elektroforese**". Herefter besvares spørgsmålene i "**Spørgsmål 2.2**".

Spørgsmål 2.2

Vi har nu lavet en genotypebestemmelse af vores gærmutant, men hvad kan vi egentlig sige ud fra gelelektroforesen.

Brug info fra **Figur 3, Tabel 2 og Tabel 3** til at svare på følgende:

- i. Hvilken primer bruges i hhv. PCR rør 1 til 3? _____ PCR rør 4 til 6? _____
- ii. Hvilket gen undersøges i hhv. PCR rør 1 til 3? _____ PCR rør 4 til 6? _____
- iii. Hvad betyder det, hvis PCR-produktet er **ens** i rørene 1-2, men **forskelligt** i rørene 4-5?

- iv. Hvis resultatet er som antaget i spørgsmål iii., hvilken længde bånd på gelelektroforesen forventes i PCR rørene? Rør 1: ___ bp Rør 2: ___ bp Rør 4: ___ bp Rør 5: ___ bp

Del 3 – Restriktionsenzymmer og plasmider

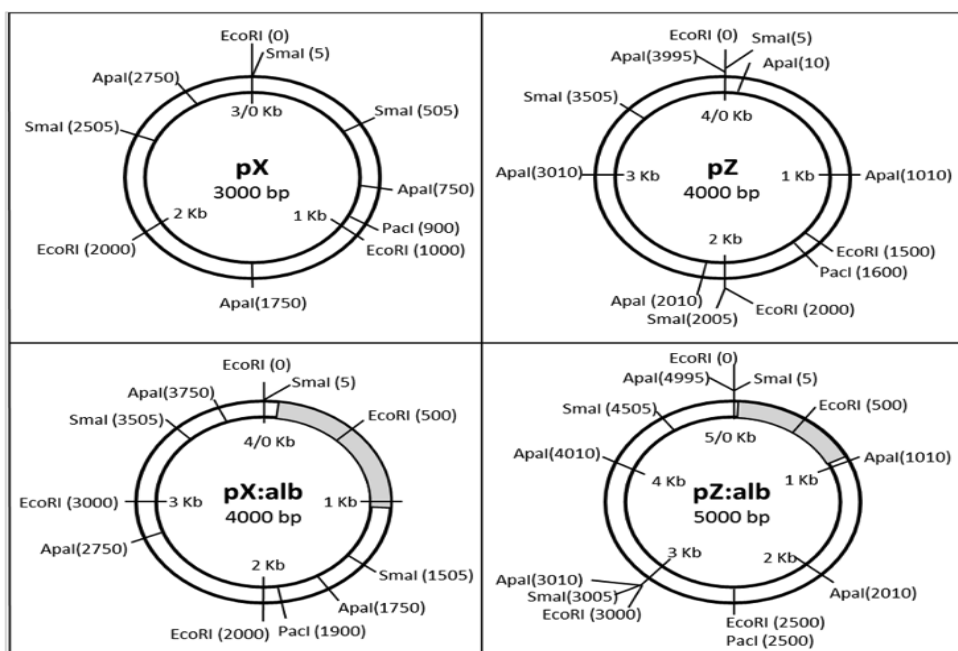
Introduktion

Et plasmid er en lille cirkulær DNA-streng og findes ofte i prokaryoter. Plasmider kan bruges til at genmodificere en organisme, da man kan indsætte gener i plasmidet og derved introducere en ny funktion. Til dette bruges restriktionsenzymmer, som kan genkende en specifik DNA-sekvens og klippe den over. Hvert enzym genkender en helt bestemt DNA-sekvens. Når enzymet klipper DNA-strengen over, kan det klippe skævt og danne såkaldte klæbrige ender (sticky ends), hvilket betyder at der forekommer enkeltstrengt DNA, dér hvor enzymet skærer strengen over. Det er disse enkeltstrengede ender, som kan klistres sammen med andre klæbrige ender, så længe de har samme DNA-sekvens.

Restriktionsundersøgelse

Du får udleveret to rør betegnet henholdsvis Ukendt 1 og Ukendt 2, hvor et ukendt plasmid er i hver af rørene.

Vi arbejder i denne opgave med 4 forskellige plasmider: pX, pX:alb, pZ, pZ:alb, hvor *Alb* koder for proteinet albumin. Denne opgave går ud på at finde ud af hvilket af de fire plasmider der er i de to ukendte rør. Et restriktionsenzym-kort (Figur 4), der viser hvor forskellige restriktionsenzymmer kan klippe de forskellige plasmider, er konstrueret for at hjælpe os på vej i analysen. Opgaven går nu ud på at designe en strategi for din restriktionsanalyse, således at du kan skelne imellem de fire plasmider.



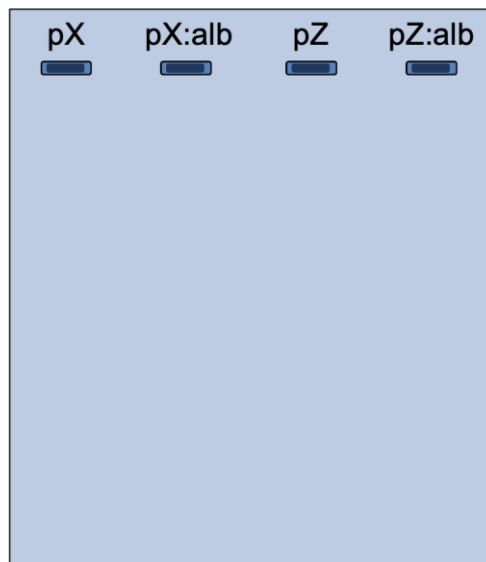
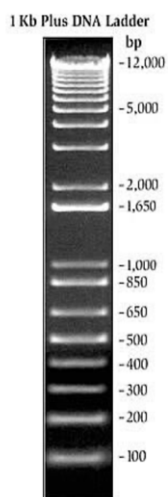
Figur 4: Restriktionskort over plasmiderne 'pX', 'pZ', 'pX:alb' og 'pZ:alb'. I midten af restriktionsenzym-kortet ses den totale størrelse af plasmidet angivet i basepar (bp). Plasmider er dobbeltstreget, cirkulære DNA-stykker, og baseparrene i plasmidet er nummereret i urets retning startende med basepar nr. 1 øverst på cirklen. Tallet efter restriktionsenzymet angiver, hvor skæringen sker. F.eks. på plasmid pX klipper SmaI plasmidet over ved basepar nr. 5, nr. 505 osv.

Spørgsmål 3.1:

Angiv med (X), i tabellen nedenunder, hvilken størrelse DNA-fragmenter du ville forvente at få fra en komplet restriktions-‘fordøjelse’ af de fire plasmider, med restriktionsenzymet Pacl.

Angiv derefter på gelen hvor der forventes at være bånd.

	pX	pX:alb	pZ	pZ:alb
500bp				
1000bp				
1500bp				
2000bp				
2500bp				
3000bp				
3500bp				
4000bp				
4500bp				
5000bp				



Før vi kan gå i laboratoriet og lave restriktionsfordøjelsen, skal vi udvælge et af de tre restriktionsenzymmer: SmaI, EcoRI og ApaI.

NB. Vær opmærksom på, at DNA-fragmenter, der er mindre end 100bp vil give meget svage bånd i en restriktionsanalyse og man derfor ikke kan angive deres størrelse særligt præcist.

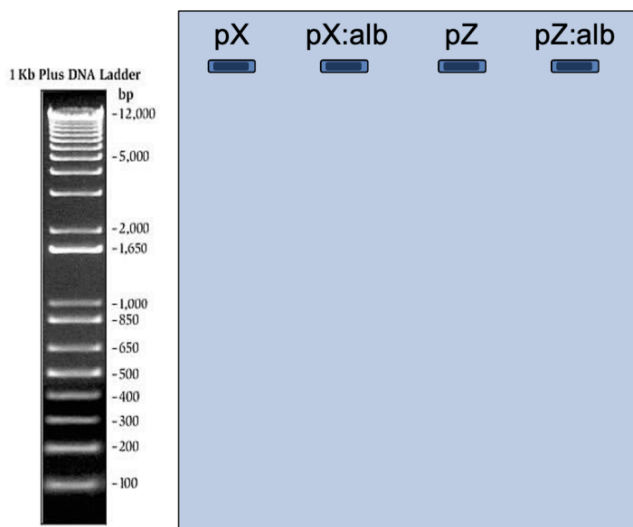
Spørgsmål 3.2:

Hvilket af disse enzymer vil gøre dig i stand til at kunne skelne imellem de fire mulige plasmider, hvis du kun må bruge et enzym til fordøjelsen? Vi forventer en fuld restriktionsfordøjelse. Skriv fragmentlængderne i **Tabel 4** samt angiv derefter på gellerne hvor der forventes at være bånd.

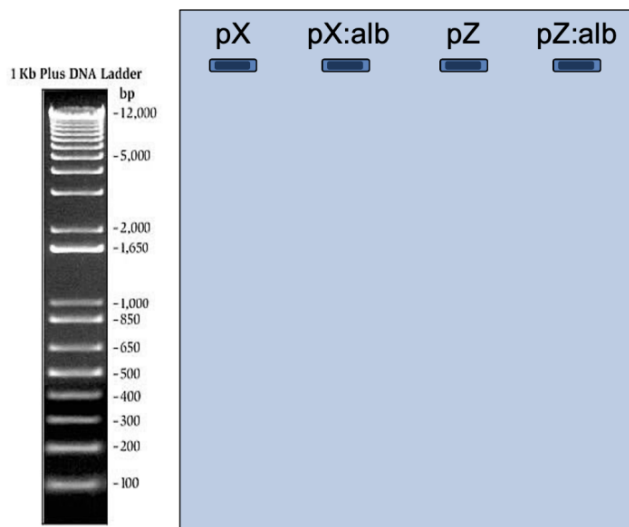
DNA-fragmenter	Fragment 1	Fragment 1	Fragment 1	Fragment 1	Fragment 1
Smal					
pX					
pX:alb					
pZ					
pZ:alb					
EcoRI					
pX					
pX:alb					
pZ					
pZ:alb					
Apal					
pX					
pX:alb					
pZ					
pZ:alb					

Tabel 4: DNA fragmentlængder ved restriktionsfordøjelse med plasmiderne Smal, EcoRI og Apal.

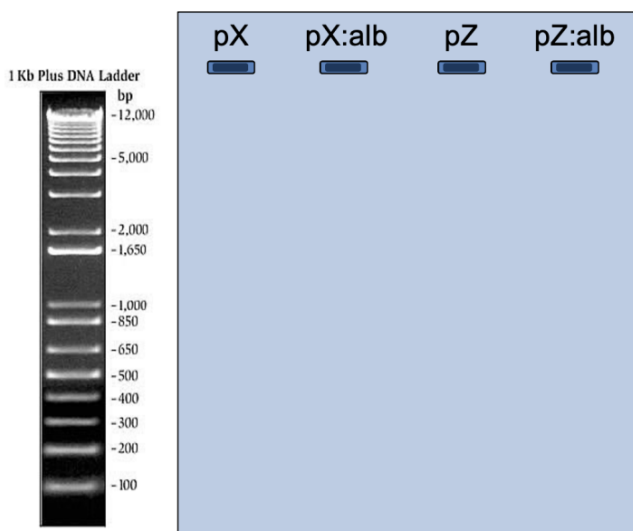
Smal:



EcoRI:



Apal:



Spørgsmål 3.3:

Angiv nedenunder, hvilket enzym, du ville bruge i din analyse.

Enzym	EcoRI	Smal	Apal
Dit valg			

Restriktionsenzym - fordøjelse af de to plasmider

- Markér fire 0,2 mL PCR-rør: rør1, rør2 (kontrol) rør3 og rør4 (kontrol).

	Rør 1	Rør 2 (Kontrol)	Rør 3	Rør 4 (kontrol)
Plasmid 1	10 µl	10 µl	0 µl	0 µl
Plasmid 2	0 µl	0 µl	10 µl	10 µl
Restriktions enzym	1 µl	0 µl	1 µl	0 µl
Cut buffer (10X)	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
MiliQ vand	7 µl	8 µl	7 µl	8 µl
Total Volumen	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl

- Tilføj reagenserne efter tabellen ovenover. Start med at afpipettere det største volumen i PCR rør og tilsæt dernæst de følgende reagenser til væsken. Restriktionsenzymet bliver udleveret af en underviser.
- Mix de nødvendige komponenter for restriktionsanalysen, ved at pipettere op og ned 5-10 gange i hvert rør. Pas på med at suge væsken helt op i pipetten (slip ikke stemplet helt, når du suger op).
- Placér de 4 rør i inkubatoren i 20 min ved 37 °C. Brug gerne timeren, der er i elevkasserne.
- Imens klargøres PCR prøverne fra Del 2 til loading i gelen. Der tilsættes 5µL loading buffer direkte til PCR prøverne i picoPCR pladen (lavet før frokost). Mix ved at pipettere op og ned 5 gange. Husk at skifte pipettespids imellem pipetteringerne!
- Efter inkubation: tilsæt 4µl loading buffer til hvert rør i restriktionsanalysen (Del 3) og mix ved at pipettere op og ned 5 gange.
- Herefter analyseres restriktionsfordøjelsen og PCR produkterne ved hjælp af restriktionsanalyse ved gelelektroforese.
- Gå til punktet "Loading af gelen".

Del 4 – Støbning af Gel til Gelektroforese

Protokol til støbning af 1% Agarose geler, udføres sammen med underviser:

HVIS DU HÅNDBERER SYBR-Safe **SKAL** DU HAVE HANDSKER PÅ!

- Afmål 50 mL af den 60°C varme agarose-opløsning. Opløsningen består af et forhold på 0,5 g agarose til 50 mL TAE-buffer.
- Tilsæt 5 µl SYBR-Safe (10.000X) til agarose-opløsningen og hæld opløsningen op i støbekaret.
- Lad gelen størkne i 20 minutter.
- Når gelen er størknet, fjernes kammen forsigtigt af underviseren ved at trække den lodret op.
- Gelen samt supporten løftes ud af støbeformen og overskydende agarose fjernes. Gelen samt supporten overføres til elektroforesekarret og dækkes af 1xTAE buffer.



SYBR-safe er potentielt kræftfremkaldende og der skal derfor bæres handsker i forbindelse med støbning og håndtering af gelen.

Del 5 – Gelektroforese

Når loading bufferen er tilsat til alle prøverne er du klar til at begynde på elektroforesen.

Loading af gelen.

Når du er klar til at load din gel så sig det til en af underviserne, så kommer de og viser hvordan det skal gøres. Det er meget vigtigt at du loader de enkelte brønde korrekt, da du skal bruge alle brøndene i forsøget.

Når du loader dine prøver i brøndene, er det vigtigt at du kun trykker ned til første stop på pipetten, ellers er der en risiko for at hvirvle prøven op og over i en anden brønd.

	Del 2							Del 3				
Brønd	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Prøve	DNA ladder	PCR1	PCR2	PCR3	PCR4	PCR5	PCR6	S1	S2	S3	S4	DNA ladder

- I brøndene 1 og 12 loader du 3 µl DNA ladder (markør) i hver.
- I brøndene 2 til 7 loader du 25 µl prøve fra dine PCR rør. Du loader produktet fra PCR-rør 1 i brønd 2, produktet fra PCR-rør 2 i brønd 3 osv. - Spørg en underviser hvis du er i tvivl.
- I Brønd 8 loader du 24 µl S1 (plasmid 1)
- I Brønd 9 loader du 24 µl S2 (plasmid 1 kontrol)
- I Brønd 10 loader du 24 µl S3 (plasmid 2)
- I Brønd 11 loader du 24 µl S4 (plasmid 2 kontrol)

For at starte elektroforesen sætter du låget på elektroforesekarret, så de to sikkerheds-tapper går ned i strømforsyningen.

Indstil via "Voltage select"-knappen spændingen til 100V.

Indstil kørselstiden til 20 minutter.

Det er ikke muligt at se DNA'et bevæge sig gennem gelen, dog kan det ses at den blå indikatorfarve bevæger sig med samme hastighed som et 300 bp langt fragment.

Når kørslen er færdig, vil elektroforesekarret begynde at bippe, dette stoppes ved at trykke på "Run/stop" knappen.

For at kunne se om reaktionerne er forløbet som forventet skal gelen overføres til et lysbord.

Spørgsmål 3.5:

Angiv i tabellen nedenunder hvilke størrelser du fik i dine fordøjede plasmider. Var det hvad du havde forventet?

	DNA-fragmenter fra fordøjet DNA i 'Plasmid 1'	DNA-fragmenter fra fordøjet DNA i 'Plasmid 2'
6000bp		
5500bp		
5000bp		
4500bp		
4000bp		
3500bp		
3000bp		
2500bp		
2000bp		
1500bp		
1000bp		
500bp		

Spørgsmål 3.6:

Angiv i tabellen nedenunder, hvilke plasmider var der i de to rør?

	Plasmid 1	Plasmid 2
Plasmid pX		
Plasmid pX:alb		
Plasmid pZ		
Plasmid pZ:alb		
Ikke muligt at afgøre ud fra de givne resultater		