

Elevvejledning

pGLO transformation

Introduktion til transformation

I denne øvelse skal du lære fremgangsmåden ved genetisk transformation. Husk på, at et gen er et stykke DNA, der indeholder informationer om (koder for), hvordan et protein skal opbygges. Dette protein giver en organisme en speciel egenskab. Genetisk transformation betyder bogstavelig talt en ændring forårsaget af gener, og involverer indsættelsen af et gen i en organisme for at ændre dens egenskaber. Genetisk transformation bruges på mange områder indenfor bioteknologien. Inden for landbrugsvidenskaben kan man genetisk transformere planter med egenskaber, der giver resistens mod frost, skadedyr og fordærv. Med genetisk transformation kan man transformere bakterier med gener, der eksempelvis gør dem i stand til at nedbryde olie fra olieudslip. Indenfor medicin er man begyndt at behandle sygdomme forårsaget af defekte gener med genterapi; Man håber snart at kunne erstatte syge personers defekte gener med raske kopier.

Du vil i denne øvelse komme til at transformere bakterier med et gen, der koder for Grønt Fluorescerende Protein (GFP). Genet stammer oprindeligt fra den bioluminiserende gøple *Aequorea victoria*. Grønt Fluorescerende Protein får goplen til at fluorescere og lyse i mørket. Ved at følge proceduren for transformation kan bakterierne udtrykke det nyerhvervede gen fra goplen og producere det fluorescerende protein, der får dem til at lyse med en skinnende grøn farve under en UV-lampe.

I denne øvelse vil du lære, hvordan man flytter gener fra en organisme til en anden ved hjælp af et plasmid. Ud over et stort kromosom indeholder bakterier et eller flere små cirkulære stykker DNA kaldet plasmider. Plasmid DNA indeholder gener for en eller flere egenskaber, der kan være gavnlige for bakteriernes overlevelse. I naturen kan bakterier udveksle plasmider, hvorved de kan dele disse gavnlige gener. Derved kan bakterierne tilpasse sig nye omgivelser. Den nyligt opståede resistens mod antibiotika hos bakterier skyldes udveksling af plasmider.

Bio-Rad's enestående pGLO-plasmid indeholder genet for GFP og resistensgenet mod antibiotikaet ampicillin. Desuden indeholder pGLO også et specielt system af reguleringsgener, der kan bruges til at styre udtrykket af det fluorescerende protein i de transformerede celler. Genet for GFP kan på en ganske simpel måde tændes og slukkes ved at tilføre sukkerstoffet arabinose til næringssubstratet. Udvælgelsen af celler, der er blevet transformerede med pGLO DNA, foretages ved dyrkning på agarplader med antibiotika. Transformerede celler vil forekomme lyse på agarplader uden arabinose og grønt fluorescerende på de agarplader, der indeholder arabinose.

Du får stillet værktøj, materialer og vejledning til rådighed med henblik på at udføre genetisk transformation af bakterier.

Din opgave bliver nu:

1. At udføre den genetiske transformation.
2. At bestemme i hvilken grad du har været i stand til at ændre en organisme genetisk.

Elevejledning

Materialer

Hver gruppe skal have:

1 LB-plade med bakteriekolonier på
 Agarplader (1 LB, 2 LB/amp og 1 LB/amp/ara)
 LB-medium (Vækstmedium)
 Transformationsopløsning
 Farvede mikrocentrifugerør
 1 pakke sterile podenåle
 Pipetter (5)
 1 flamingoflyder
 1 bakke med is
 Tusch til mærkning
 Tape – smal malertape er bedst

Fælles:

pGLO-plasmid
 Varmeskab 37 °C
 Vandbad 42 °C

VIGTIGT – VIGTIGT - VIGTIGT

Bemærk, at levende bakterier, der indeholder genteknologisk fremstillede plasmider ikke må slippes ud i naturen. Følgende sikkerhedsforskrifter SKAL derfor overholdes:

Arbejd kun på pladser med dækpapir

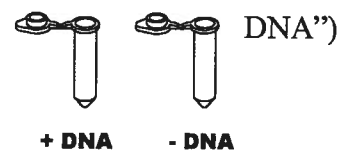
- Bær kittel
- Opsaml alt affald
- Al affald skal destrueres efter forskrifterne
- Rapporter straks ved eventuelt uheld
- Arbejd stille og roligt
- Mad og drikkevarer må ikke indtages i laboratoriet
- Vask hænder, når laboratoriet forlades
- Brug beskyttelsesbriller, når du bruger UV-lys

1.

Mærk et lukket mikrocentrifugerør "+DNA" (eller "+plasmid og et andet "-DNA" (eller "-plasmidDNA").

Mærk også rørene med jeres gruppes navn.

Stil rørene i flamingoholderen.



2.

CaCl₂ åbner cellemembranen og gør cellerne kompetente:

Åbn rørene og overfør 250µL Transformation Solution (CaCl₂) til hvert rør.



3.

Væsken køles, så den er kold, når bakterierne tilsættes.

Dermed er det lettere at arbejde sterilt.

Placer rørene på isbadet.

4.

Overførsel af bakterier til eppendorfrør:

Tag en steril podenål.

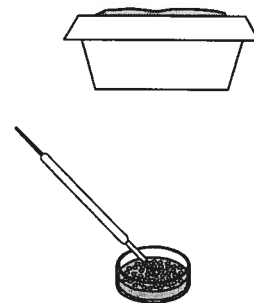
Saml én enkelt bakteriekoloni op.

Tag røret mærket "+DNA" og overfør kolonien til røret. Sørg for at få nok.

Sno podenålen mellem dine fingre, til hele kolonien er opblandet.

Stil røret tilbage i flamingoholderen.

Gentag med en ny koloni til røret "-DNA".



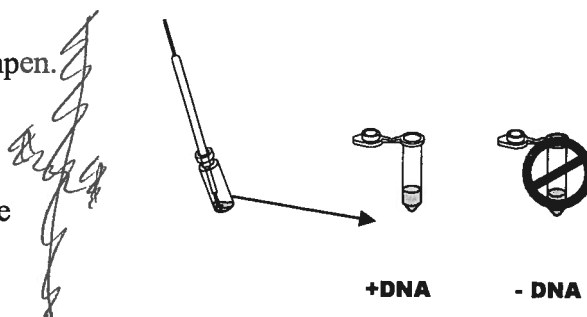
5.

Plasmidet undersøges og tilsættes:

Test pGLO plasmidopløsningen med UV-lampen.

Noter resultatet.

Tag en ny steril podenål. Tag en loop-fuld plasmidopløsning (dvs. øjet skal være fyldt ud med væske). Har man nøjagtige mikropipetter tages 2µL plasmidopløsning. Tilsæt plasmidet til røret mærket "+DNA". Bland godt!



6.

Cellerne gøres klar:

Lad først rørene stå på is i 10 minutter.

Se efter at rørene virkelig er nede i isen.

7.

Klargøring af pladerne:

Mens rørene står på is gøres agarpladerne klar.

Mærk de 4 plader som følger:

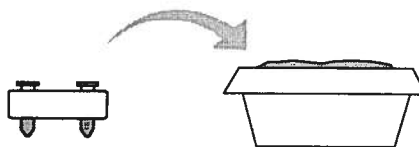
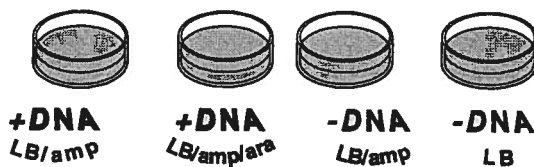
1 LB/amp plade mærkes "+ DNA".

1 LB/amp/ara plade mærkes "+DNA".

1 LB/amp plade mærkes "-DNA".

1 LB plade mærkes "-DNA".

Lav evt. en også en plade med "-DNA" på LB/amp/ara som kontrol.



8.

Cellerne udsættes nu for et varmekok, der bevirker at membranerne åbnes:

Overfør flamingoholderen med rørene fra isbadet til varmebadet på 42 °C i **nøjagtig 50 sekunder**.

Se efter at rørene virkelig er nede i varmebadet!

Før straks rørene tilbage til isbadet.

Lad rørene stå i isbadet i **præcis 2 minutter!**

10 Min 50 Sec 2 Min

IS → 42°C → IS

9.

Der tilsættes næringsmedium, for at hjælpe celle-væksten i gang.

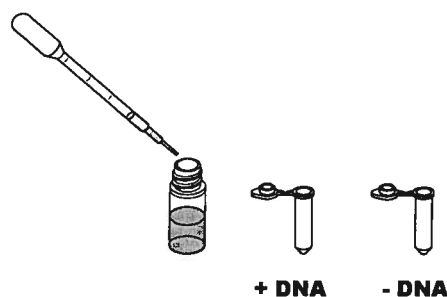
Tag flamingoholderen med rørene op af isbadet

og lad det stå ved stuetemperatur.

Tag en steril pipette og tilsæt 250µL LB-medium til røret mærket "+DNA".

Tag en ny steril pipette og tilsæt 250µL LB-medium til det andet rør mærket "-DNA".

Lad rørene inkubere i 10 minutter ved stuetemperatur.



10

Overførsel af bakterier til agarpladerne:

Knips på de lukkede rør for at blande godt.

Tag en ny steril pipette til hvert rør og overfør 100µL af bakterierne på de rette mærkede Plader.



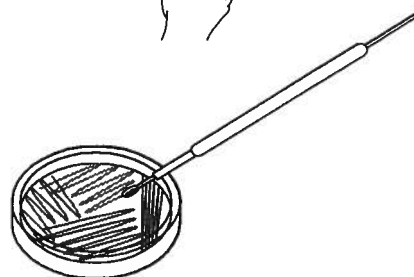
11.

Bakterierne spredes:

Tag en ny steril pudenål for hver plade.

Med let hånd spredes bakterierne – se tegningen.

Hvis I har drigalskispatter, kan bakterierne spredes med disse.



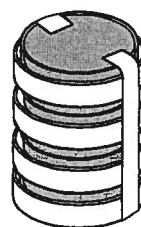
12.

Bakterievækst – bakterierne vokser bedst ved 37 grader:

Stak jeres plader og saml dem evt. med malertape.

Stil dem med bunden i vejret i varmeskabet ved 37°C

Lad dem inkubere til næste dag eller 2 døgn.



13.

Resultat:

Studer pladerne i almindeligt lys og i uv-lys.