



The Biotechnology Education Company ©

EdvoKit 121: Detektion af GMO i fødevarer

QuickStrip™ prøverne opbevares i køleskab – resten ved stuetemperatur

Oversat og bearbejdet af Birgit Sandermann Justesen, GU Campus Kujalleq, april 2023

READY-TO-LOAD™ PRØVER TIL ELEKTROFORESE

Straks efter modtagelsen af kittet lægges QuickStrip™ prøverne i køleskabet. Alle andre dele opbevares ved stuetemperatur.

Komponenter (QuickStrip™)

1. A Standard DNA Marker
2. B GMO negativ kontrol
3. C GMO positiv kontrol
4. D Majs
5. E Hvede
6. F Soya

REAGENSER og UDSTYR

- UltraSpec-Agarose™
- Elektroforesebuffer (50xTAE)
- FlashBlue™ DNA Stain
- InstaStain® Blue kort
- 1 ml pipette
- Mikropipetter

ANDET NØDVENDIGT UDSTYR

- Horisontal gelelektroforese apparat
- Strømforsyning
- Mikropipetter og tilhørende spidser
- Vægt
- Mikrobølgeovn
- Pipettehjælper
- 250 ml BlueCapflasker
- Handsker
- Sikkerhedsbriller
- Små kar til afvejning og farvning
- lysbord
- Demineraliseret vand (i Grønland bruges blot vandhanevand)

LABORATORIESIKKERHED

1. Bær kittel. Handsker og sikkerhedsbriller bæres, når det er angivet.
2. Vær særlig forsigtig ved håndtering af varm agarose når der støbes geler
3. Mundpipettér aldrig!
4. Vær forsigtig ved omgang med strømforsyningen
5. HUSK at vask hænder grundigt, når laboratoriet forlades.

LABORATORIEJOURNAL

Husk at notere alt ned, som du foretager dig undervejs i forsøget, bade tanker, observationer og indsamlede data.

Før du går i gang med forsøget:

- Læs introduktionen og selve vejledningen grundigt. Brug informationerne til at opstille en hypotese
- Forudsig det forventede resultat

Undervejs i forsøget

Noter alt hvad du foretager dig.

Efter forsøget

- Tolk resultaterne – hvorledes er resultaterne i forhold til det, du forventede
- Hvis du skulle gentage eksperimentet, hvilke forhold ville du da ændre? Forbedr din hypotese

BAGGRUNDSVIDEN

HVAD ER GENETISK MODIFICEREDE ORGANISMER?

I løbet af de sidste mange år har forskning indenfor genetik øget vores forståelse af genomet og dermed øget vores viden om generne og deres funktioner i cellerne.

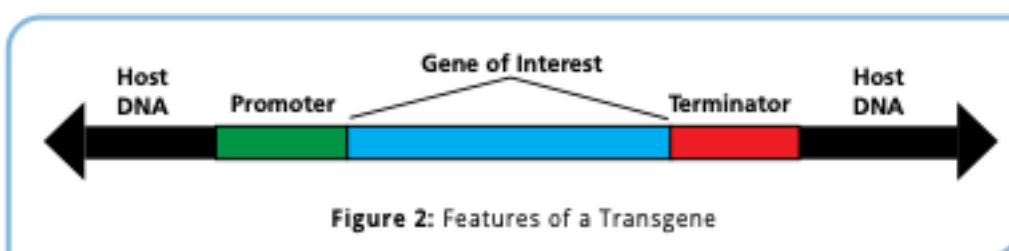
Mutationer er ændringer i generne, der kan forårsage ændringer i den måde, som en organisme interagerer med sit miljø på. De fleste mutationer resulterer i negative effekter for organismen; dog giver en mutation af og til organismen en fordel, der fremmer dens overlevelse i dens særlige miljø.

Mennesker har i mange år forædlet nye sorter af landbrugsafgrøder frem ved traditionelle forædlingsmetoder. Man har udvalgt og krydset bl.a. korn, for at opnå højere udbytter og eksempelvis bedre modstandsdygtighed mod insektangreb.

Blandt andet er den type majs, vi spiser i dag, fremavlet ved traditionel forædling ved at krydse sorter med god smag med sorter, der havde større kerner. Forædling inden for landbrug har betydet flere og bedre fødevarer til en stadig voksende befolkning.



Med moderne bioteknologiske metoder er man i dag i stand til på kortere tid at fremavle nye sorter. Blandt andet kan man manipulere med en DNA-sekvens, således at der opnås den ønskede egenskab. Disse konstruerede gener, kaldet transgener, kan derefter indsættes, deleteres eller muteres i løbet af få uger ved hjælp af rekombinant DNA-teknologi. For at kunne udtrykkes korrekt in vivo (i den levende plante) skal et transgen have en promotorsekvens, som sikrer at RNA-polymerase sørger for korrekt transgenet transkription og en terminatorsekvens, som sørger for at RNA-polymerasen afslutter transkriptionen (figur 2).



Promotoren fra blomkålsmosaikviruset (CaMV) og terminatoren fra *Agrobacterium tumefaciens* nopalinsyntasegenet (NOS) bruges almindeligvis ved nye gener, fordi de genkendes af transkriptionssystemet i mange forskellige planter.

Den nuværende plantebioteknologi arbejder på at øge både udbyttet og næringsværdien af mange fødevarer. For eksempel har man fremavlet tomater, der bedre kan holde sig under transport. I den ikke-modificerede tomat nedbryder enzymet polygalacturonase (PG) pektin i tomatens cellevæg, hvilket gør tomaten blødere og dermed lettere at beskadige under

forsendelse. FlavrSavr-tomaten er konstrueret til at "slukke" for produktionen af PG-enzymet, hvilket bremser blødgøringsprocessen. Derfor er tomaterne mindre skrøbelige. Et andet eksempel "Bt-majs", som udtrykker et naturligt forekommende pesticid, der beskytter planten mod insekter (Figur 3).

Genteknologien giver på mange måder landmændene mulighed for at bruge færre kemiske pesticider, hvoraf nogle er skadelige for mennesker og miljø.

En anden succeshistorie er de "gyldne ris". Normalt danner ris, som er en basisfødevarer for en stor del af verdens befolkning, ikke β -caroten eller vitamin A. Men da mangel på vitamin A er et udbredt problem i udviklingslande, har man modificeret ris til at producere β -caroten, en forløber for vitamin A.

Et skifte til dyrkning af "gyldne ris" og andre mere næringsrige afgrøder har på den måde være med til at bekæmpe underernæring.

Ud over at øge udbyttet og forbedre ernæringen vil teknologien kunne bruges til at udvikle andre produkter som allergifrie jordnødder eller ris med lavt proteinindhold eller fødevarer, der kan producere enzymer som insulin

Genetisk modificerede fødevarer kan snart give mulighed for syntese og levering af forskellige farmaceutiske produkter.

ETIK FOR GENETISK MODICERED E ORGANISMER

Tomater, sojabønner og majs var blandt de første genetisk modificerede fødevarer, der blev godkendt af de amerikanske agenturer i 1990'erne. Siden da er sikkerheden, effektiviteten og fordelene ved GMO-fødevarer blevet diskuteret på globalt plan.

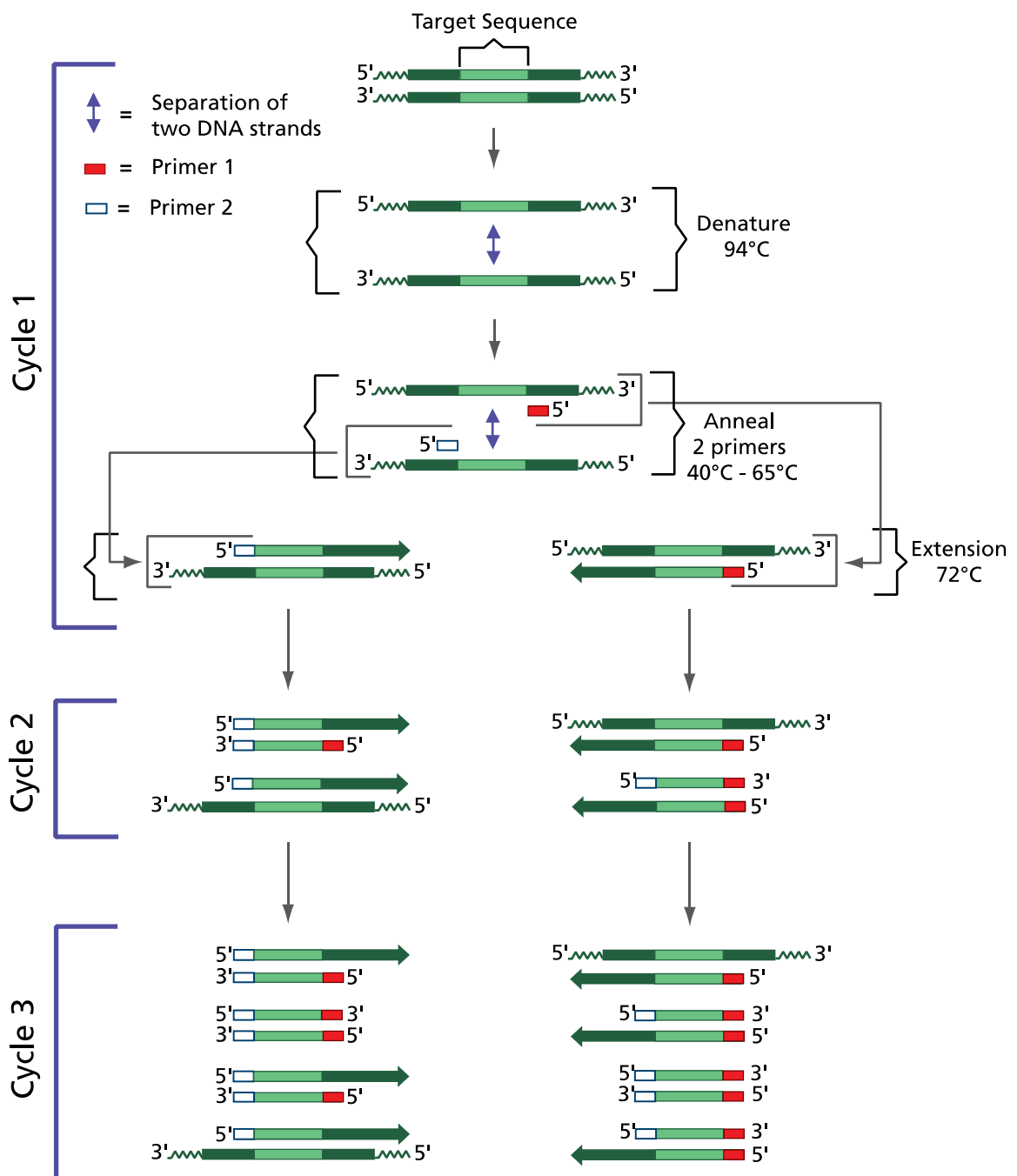
De enkelte lande godkender GMO-produkterne.

BRUG AF PCR TIL IDENTIFIKATION AF GMO

I de senere år har en del producenter af fødevarer besluttet at fjerne GMO fra fødevarerne. Man er derfor interesseret i at undersøge, hvorvidt en fødevarer, fx majs, hvede eller soya, indeholder GMO eller ej.

Først oprenser man DNA fra den pågældende plante og derefter bruger man PCR-metoden til at få mange kopier af de specifikke DNA-sekvenser som man ønsker. Til de specifikke sekvenser man leder efter designes der primere.





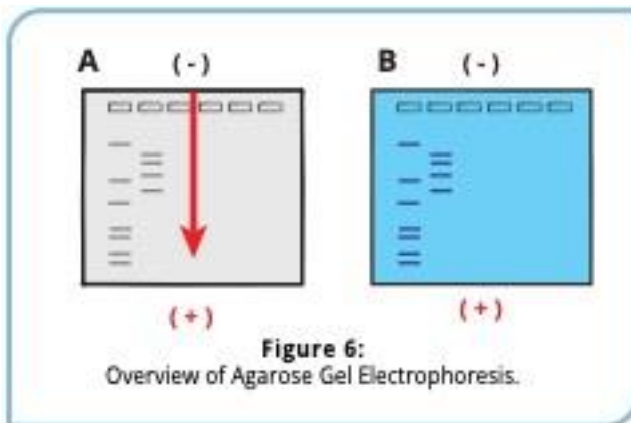
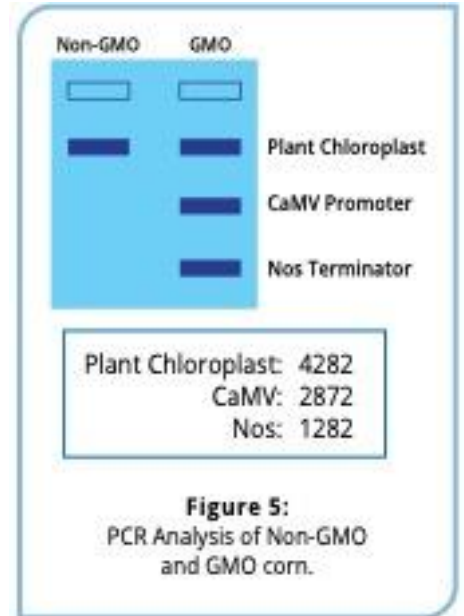
I dette forsøg er primerne designet til at skelne mellem vildtypeplanter og de planter, der er blevet gensplejset. PCR kan på denne måde bruges til at bestemme, om en plante eller en fødevarer er blevet genetisk modificeret ved hjælp af primere, der er målrettet mod 35S CaMV-promotoren og/eller NOS-terminatoren. Som en positiv kontrol for DNA-ekstraktion amplificeres også plantechloroplastgenet.

For at udføre PCR blandes oprenset dobbeltstrenget DNA med primere, en termostabil DNA-polymerase (Taq) og nukleotider (se figur 4). Først opvarmes blandingen til 94°C for at denaturere DNA-dupleksen (dvs. adskille de to DNA-streng). Derefter afkøles prøven til 45°C-60°C, så

primerne kan baseparres med de ønskede områder på DNA-strengen. Til sidst opvarmes til 72°C, så DNA-strengene går sammen igen. Processen er i dette eksperiment gentaget 40 gange.

PCR er en enkel, hurtig og pålidelig metode til at identificere genetiske modifikationer. Primerne i dette eksperiment er designet til at producere DNA-fragmenter af forskellig størrelse afhængigt af om plantechloroplasten, CaMV-promotorregionen og/eller NOS-terminatorsekvenserne er til stede i det ekstraherede DNA (figur 5).

For at analysere blandingen af DNA-fragmenter bruges gelelektroforese, en proces som adskiller DNA-fragmenterne efter størrelse. Blandingen af DNA-molekyler tilføjes til "brønde" i en gel, hvorefter der ledes en elektrisk strøm gennem gelen. Fordi sukkerphosphat-rygraden i DNA har en stærk negativ ladning, driver strømmen DNA'et mod den positive pol.



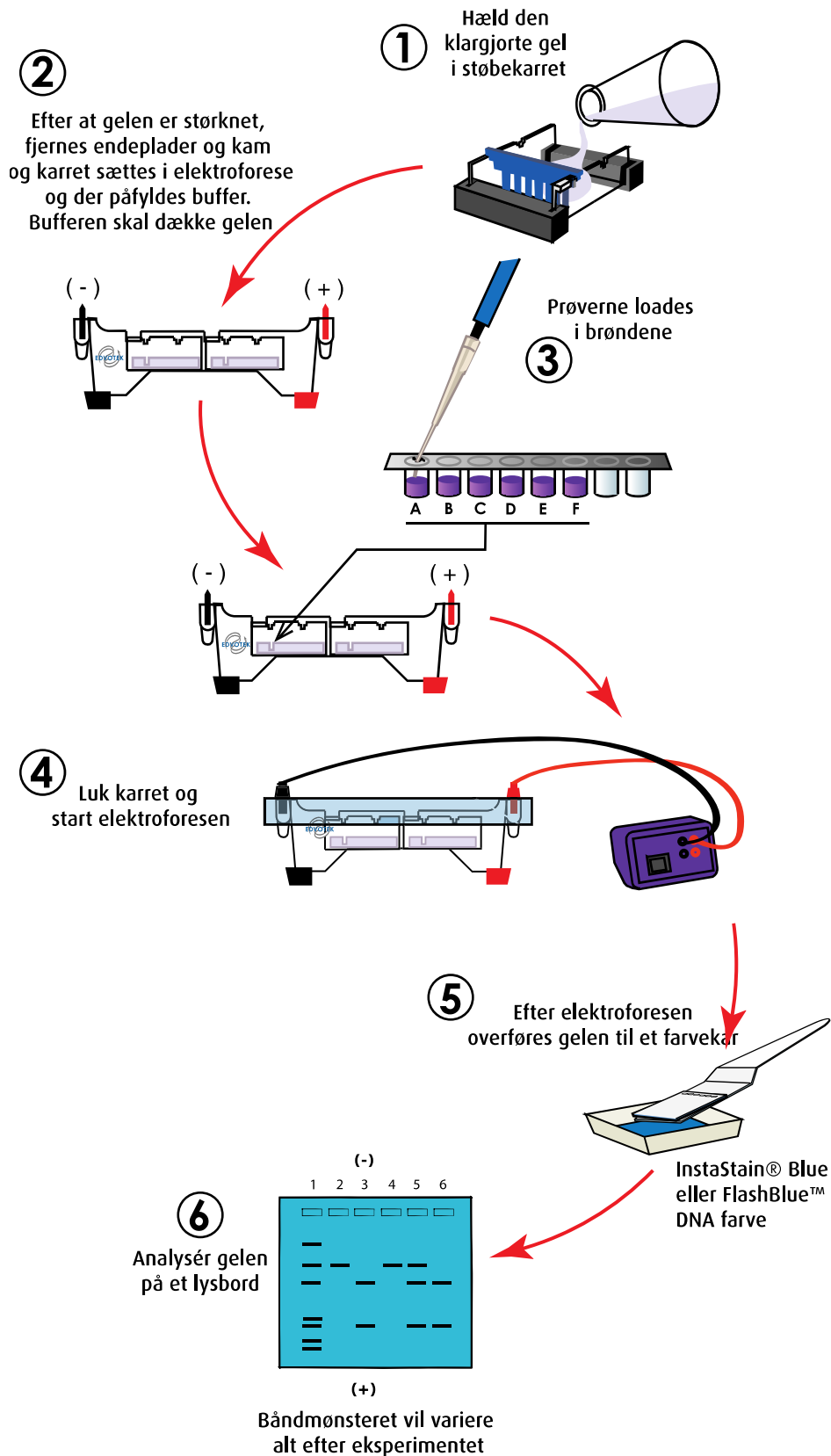
Figur 6 A og 6 B

Ved første øjekast ser en agarosegel ud til bare at være et fast stof ved stuetemperatur. Men gelen indeholder små kanaler, som DNA kan passere igennem. De små DNA-fragmenter (DNA-stykker) bevæger sig let gennem disse huller, men store DNA-fragmenter har sværere ved at presse sig gennem tunnelerne. Fordi molekyler med forskellig størrelse løber med forskellige

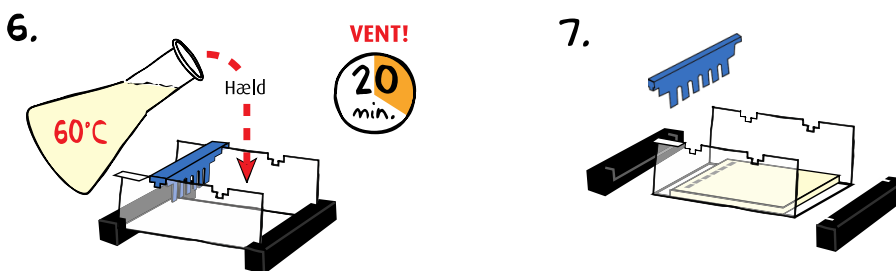
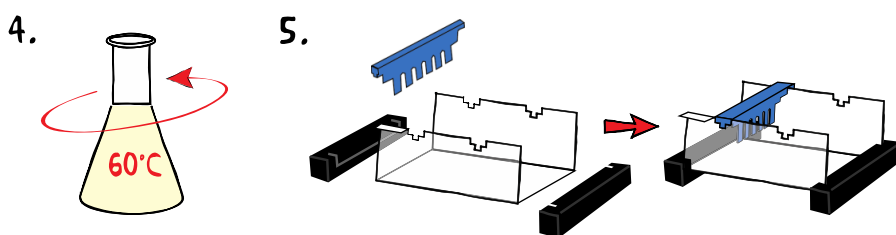
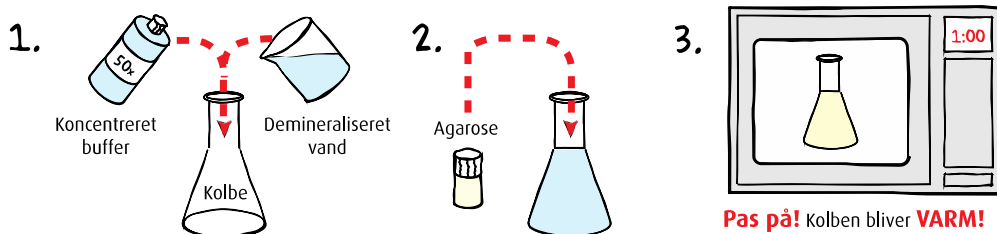
hastigheder, bliver de adskilt og danner "bånd" i gelen. Efter at strømmen er stoppet, synliggøres båndene ved hjælp af en farve, der binder til DNA (figur 6B).

ELEVVEJLEDNING

Oversigt over forsøget:



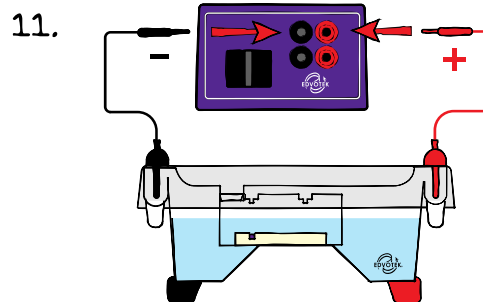
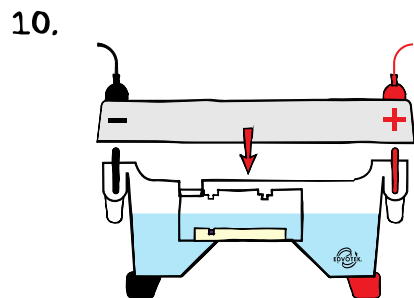
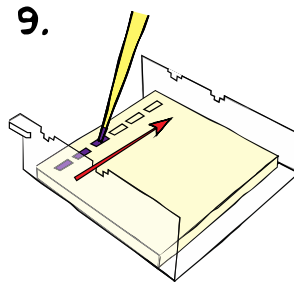
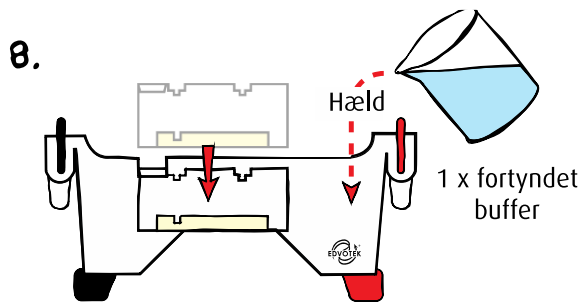
STØBNING AF GELER



1. **FORTYND** den koncentrerede 50x elektroforesebuffer med demineraliseret vand (i Grønland med vandhanevand) (se tabel A – her er der angivet hvor meget agarose og elektroforesebuffer, der skal bruges til forskellige gelstørrelser – tilpas til de kar skolen har).
2. **BLAND** agarosepulveret med bufferopløsningen i en 250 mL BlueCap flaske (se tabel A).
3. **OPLØS** agarosen ved at koge blandingen. Det letteste er at bruge en **MIKROBØLGEOVN** ; lad blandingen være i ovnen 20 sekunder ad gangen – hvirvl rundt og gentag opvarmningen indtil væsken er helt klar
4. **Lad** agarosen **AFKØLE** til 60°C idet flasken af og til hvirvles.
5. Medens agarosen afkøler forsegles agarosekarrene. **HUSK at sætte kammen i!**
6. **HÆLD** agarosen i karret. Lad den stivne i ca. 20 minutter. Når gelen er størknet er den mat

7. **FJERN** forsigtigt kammen (løft lodret op) og forseglingerne for enderne

Table A		Individual 0.8% UltraSpec-Agarose™ Gel			
Size of Gel Casting tray	Concentrated Buffer (50x)	+ Distilled Water	+ Amt of Agarose	= TOTAL Volume	
7 x 7 cm	0.6 ml	29.4 ml	0.23 g	30 ml	
7 x 10 cm	1.0 ml	49.0 ml	0.39 g	50 ml	
7 x 14 cm	1.2 ml	58.8 ml	0.46 g	60 ml	



GELEN KØRER

- PLACER** gelen i elektroforesekarret. **DÆK** gelen med 1x elektroforesebuffer (Hvert kar bruger ca. 1/3 l). Gelen skal være helt dækket af elektroforesebufferen.
- LOAD** hele prøven fra hvert lille rør (35 µl) i den rette brønd – se tabel 1

Tabel 1: Gelen loades		
Brønd 1	Rør A	Standard DNA markør
Brønd 2	Rør B	GMO negativ kontrol
Brønd 3	Rør C	GMO positiv kontrol
Brønd 4	Rør D	Majs
Brønd 5	Rør E	Hvede
Brønd 6	Rør F	Soya

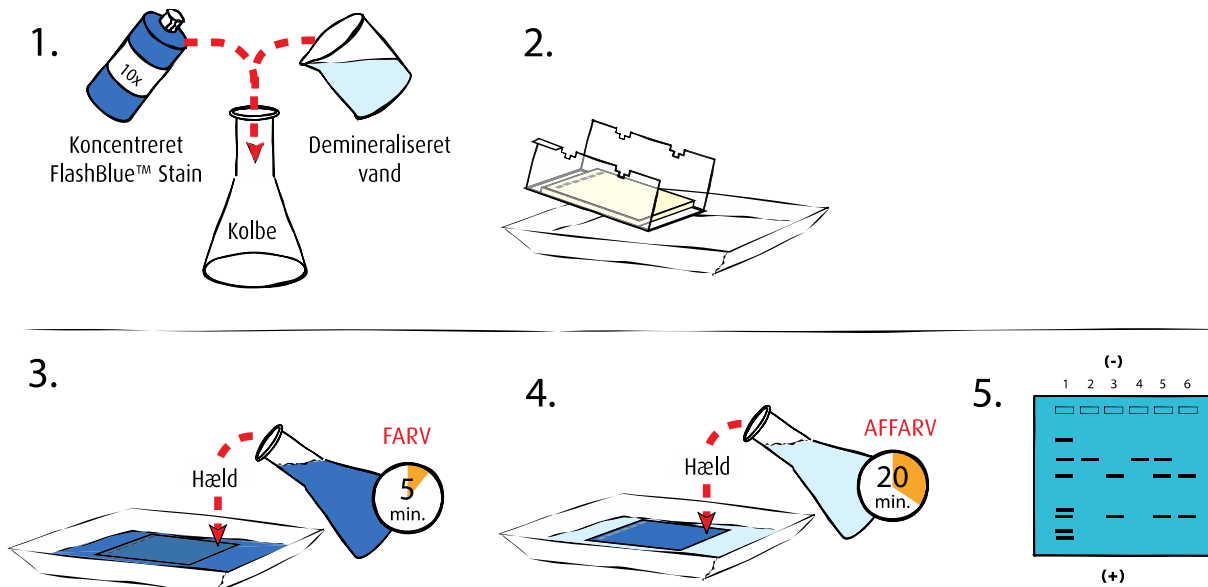
10. **LUK** elektroforesekarret. **TJEK** at gelen vender korrekt. Husk, DNA vil bevæge sig mod den positive elektrode

11. **SÆT** ledningerne i og **TÆND**. Lad fronten køre mindst 3,5 cm fra brøndene

12. Når elektroforesen er færdig **SLUKKES** og ledningerne tages ud. **OVERFØR** gelen til et farvekar.

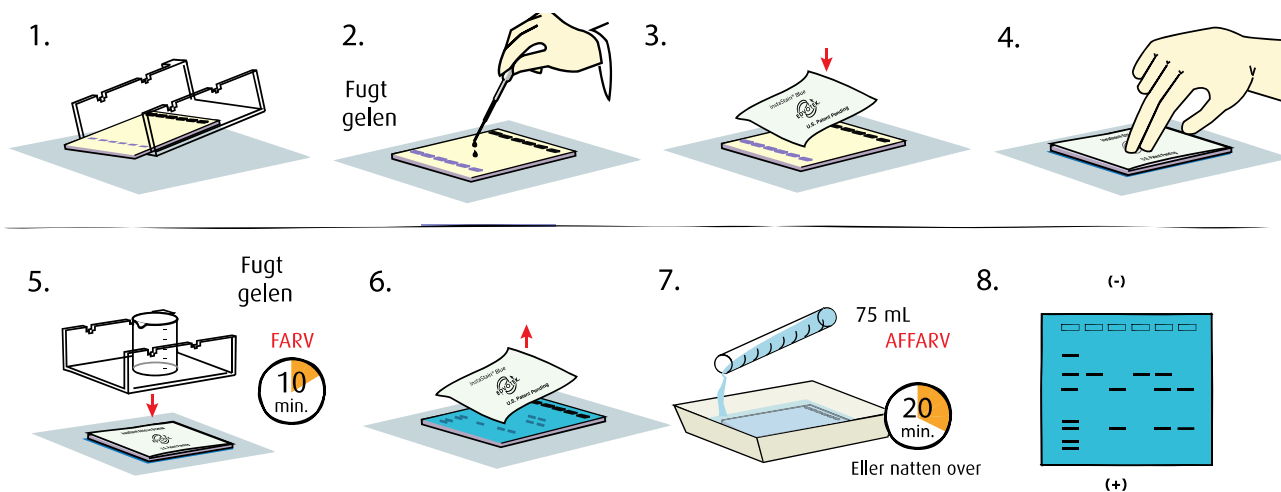
FARVNING AF GELEN MED FlashBlue™

(bemærk der kan også farves med 1xFastBlast (fra BioRad) – over et døgn – dermed behøver man ikke affarve)



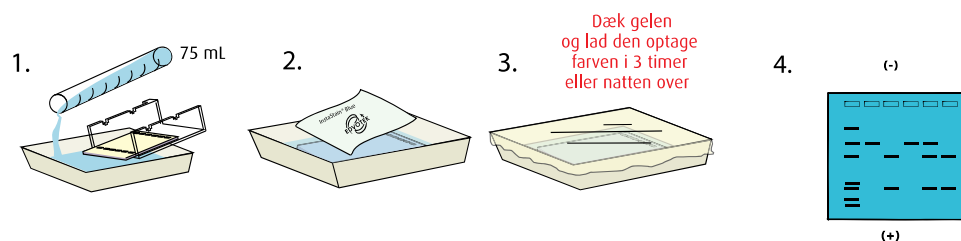
1. **FORTYND** 10 mL af 10x koncentreret FlashBlue™ med 90 mL demineraliseret vand i en BlueCapflaske og **BLAND** godt (hvirvl rundt).
2. **LØFT** forsigtigt agarosegelen med støbeformen op. Lad gelen **GLIDE** ned i et rent farvekar
3. **DÆK** gelen med 1x FlashBlue™ farveopløsning. **FARV** gelen i 5 minutter. Det bedste resultat opnås, hvis der rystes/vippes jævnlgt under farvningen. **HVIS DER FARVES I MERE END % MINUTTER BESVÆRLIGGØRES AFFARVNINGEN.**
4. **FLYT** gelen over i et andet kar. **DÆK** gelen med demineraliseret vand. **AFFARV** i mindst 20 minutter. Jo længere tid, desto bedre resultat . For at opnå bedre affarvning anbefales det af og til, at skifte vandet.
5. **FLYT** forsigtigt gelen over på et lysbord. **STUDÉR** resultatet. DNA vil kunne ses som mørkere blå band på en lysere blå baggrund.

FARVNING AF GELEN MED InstaStain® Blue



1. **LØFT** forsigtigt agarosegelen med støbeformen op. Lad gelen **GLIDE** ned i på et fladt stykke plastik
2. **FUGT** gelen med nogle dråber elektroforesebuffer.
3. Tag handsker på! **LÆG** den blå side af InstaStain® Blue kortet på gelen.
4. **FJERN forsigtigt** luftbobler mellem plastikstykket og gelen ved at lade fingeren køre over overfladen. Det er vigtigt, at fjerne luftboblerne, da gelen ellers ikke vil blive farvet, der hvor boblerne er.
5. **STIL** støbeformen oven på gelen (se figuren). **STIL** fx et bægerglas i støbeformen, hvorved man er mere sikker på, at InstaStain®Blue kortet er i kontakt med gelen. **FARV** gelen i 10 minutter.
6. **FJERN** InstaStain®Blue-kortet. Hvis gelen ikke er farvet tilstrækkeligt gentages farvningen (med samme kort) i yderligere 5 minutter.
7. **FLYT** gelen over i et rent lille kar. **DÆK** gelen med ca. 75 mL demineraliseret vand og **AFFARV** i mindst 20 minutter. Det bedste resultat fås, hvis der under affarvningen også rystes let. Hvis det skal gå hurtigt, kan man med fordel bruge 37°C varmt demineraliseret vand, som med jævne mellemrum skiftes.
8. Tag forsigtigt gelen væk fra affarvningskarret. **STUDÉR** resultatet ved et lysbord. DNA vil ses som mørkere blå band på en lysere blå baggrund.

ALTERNATIVE FARVEMETODE:



1. Lad forsigtigt gelen **GLIDE** fra støbeformen ned i et lille kar med ca. 75 mL demineraliseret vand eller brugt elektroforesebuffer. Gelen skal være helt dækket af væsken.
2. Lad InstaStain® Blue kortet/8ene) **FLYDE** på toppen af væsken med den blå farve nedadmod gelen. Hvert InstaStain® Blue kort kan farve 49 cm² gel (7 x 7 cm).
3. **DÆK** karret med plastikfolie for at minimere fordampningen. **Lad gelen være** i farvekarret i mindst 3 timer. Gelen kan også stå i farvekarret natten over.
4. Tag forsigtigt gelen væk fra affarvningskarret. **STUDÉR** resultatet ved et lysbord. DNA vil ses som mørkere blå band på en lysere blå baggrund.

DISKUSSIONSPØRGSMAÅL

1. Hvad vil det sige, at en plante er genetisk modificeret?
2. Hvordan kan man udvikle GMO-planter?
3. Hvilke fordele kan landmanden/fåreholderen have af genmodificerede planter?
4. Hvordan godkendes en GMO-afgrøde til dyrkning?
5. Forklar hvad PCR er
6. Hvilken af de tre planter, som I testede, var genmodificeret?

Lærerens forberedelse

Modul I: 45 minutter

GELELEKTROFORESE

Hver gruppe skal bruge en 0,8% agarosegel. Gelerne kan enten fremstilles i forvejen af lærere eller man kan lade eleverne støbe selv. Støbning af gelerne tager ca. 40 minutter.

Hvis hver gruppe selv støber deres gel:

Se Modul I i elevvejledningen. Hver gruppe har brug for 50x koncentreret buffer, demineraliseret vand og agarose.

For at spare tid kan man med fordel lave en større mængde 0,8% agaroseopløsning, som efter opvarmning i mikrobølgeovn kan bruges til flere grupper

Støbning af gelerne før forsøget

Gelerne kan støbes op til 2 uger før forsøget. De opbevares bedst, hvis de står i buffer i køleskab. Gelerne ødelægges, hvis de fryses.

Hvis gelerne er fjernet fra støbekarret, bør de sættes fast med en lille klar agarose, når de skal tilbage i karret.

Klargøring af QuickStrip™

QuickStrip™ er små mikrotiterstrips med en beskyttende folie. Hver strip har afmålte DNA-prøver .

Med en skarp saks klippes de enkelte rækker fra hinanden. Pas på ikke at ødelægge den beskyttende folie.

Hver gruppe skal have en række prøver. Sørg for at eleverne banker strippen let i bordet, før den åbnes. På den måde samles indholdet i bunden af de små brønde.

MODUL II-A: FARVNING MED INSTASTAIN® BLUE (eller FastBlast)

Den nemmeste måde at farve DNA-båndene på er med InstaStain® Blue. InstaStain® Blue kræver ikke store mængde væske og er let at gå til. Hvert InstaStain® Blue kortet indeholder en lille smule blå DNA farve. Farven frigøres, når kortet kommer i vand. Med kortet farves og affarves der i ét trin.

Brug et lysbord (hvidt lys) til at tolke resultatet.

MODUL II-B: FARVNING MED FLASHBLUE™

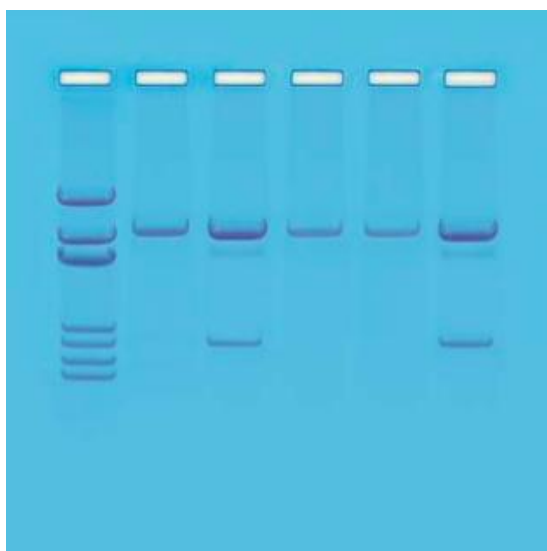
FlashBlue™ farven kræver kun 5 minutter til selve farvningen og omkring 20 minutter til affarvningen. Det bedste resultat opnås, hvis man lader affarvningen foregå natten over. Herved bliver båndene mørkere og tydeligere. Brug et lysbord (hvidt lys) til at tolke resultatet. Man kan også lade gelerne stå i affarvningsvæsken i køleskabet i flere uger. Langtidsopbevaring i køleskab kan bevirke, at båndene fader. Hvis de er faded for meget, kan gelen farves igen.

Gelerne kan kasseres med almindeligt affald. Farveopløsningen kan hældes i vasken

MODUL II: FOTODOKUMENTATION

Sørg for at tage billeder af de færdige geler. Dette gøres lettest ved at lade eleverne bruge deres smartphones.

ANALYSE AF RESULTATET



Brønd	Prøve	Resultat	Molekylvægt
1	DNA standard markør	---	---
2	GMO negativ kontrol	negativ	4282
3	GMO positiv kontrol	positiv	4282 2872 1282
4	Majs	negativ	4282
5	Hvede	negativ	4282
6	Soya	positiv	4282 2872 1282

Gelen viser hvordan resultatet kan se ud.