



The Biotechnology Education Company ®

# Transformation af E.coli med pFG (plasmid med Green Fluorescent Protein)

## Edvotek kit nr. 223

*Oversat og bearbejdet af Birgit Sandermann Justesen, Nærum Gymnasium.*

**Revideret april 2018 af Susanne Smerup Welk, Frederiksen Scientific A/S**

Brugen af dette kit til undervisningsbrug skal varetages af en gymnasielærer, som har en biologisk uddannelsesbaggrund mindst svarende til de af VTU udstukne faglige mindstekrav i biologi. og som har gennemført et af Arbejdstilsynet godkendt kompetencegivende kursus af 2 dages varighed i eksperimentel genteknologi.

Når eksperimenter, som er omfattet af aftalen, gennemføres i forbindelse med enkeltfaglig eller tværfaglig undervisning, har gymnasielæreren ansvar for at forsøgene gennemføres efter de gældende retningslinjer.

Aftalen vedrører undervisning i genteknologi i biologi, bioteknologi A, teknikfag og teknologi A i STX (det almene gymnasium), HTX og HF

De genteknologiske forsøg må kun udføres, dersom der senest 3 uger forud for arbejdet med forsøgene (herunder forarbejdet) er sendt en indberetning til Undervisningsministeriets fagkonsulent i biologi på det indberetningsskema, der indgår som en del af aftalen

Ved indberetning **indsendes altid en udfyldt forside og mindst ét udfyldt bilag.**

Indberetningsskemaets forside skal underskrives af både den for forsøgenes udførelse ansvarlige lærer og skolens rektor/leder og sendes til Undervisningsministeriets fagkonsulent i biologi 3 uger inden forarbejdet påbegyndes.

Indberetningsskema og indberetningsbilag findes på Undervisningsministeriets hjemmeside (under Biologi eller Bioteknologi):

<https://uvm.dk/gymnasiale-uddannelser/fag-og-laereplaner/laereplaner-2017/stx-laereplaner-2017>

**Kittets indhold****Materialer til transformationen**

A BactoBeads™ *E. coli* GFP Host  
 B Supercoiled pFG (pFluoroGreen™)  
 C Ampicillin  
 D IPTG  
 E CaCl<sub>2</sub>

Growth Additive  
 Steril LB-agar (ReadyPour Agar) 2 flasker  
 Steril LB-medie ("Recovery Broth")  
 Små petriskåle  
 Store petriskåle  
 Sterile mikropipetter  
 10mL pipetter  
 Sterile tandstikker  
 Sterile podenåle  
 Mikrocentrifugerør med skruelåg

**Nødvendigt udstyr til transformationen**

Mikropipetter samt spidser  
 2 vandbade på hhv. 37°C og 42°C  
 Termometer  
 Varmeskab 37°C og 34°C  
 Pipettesugere  
 Is  
 Penne  
 Mikrobølgeovn  
 Handsker/handgrip e.l.  
 UV-lampe

**Formål**

Formålet med dette forsøg er at opnå forståelse af transformationsprocessen med pFG

**Der er i kittet materialer nok til 10 grupper med 2-4 pr. gruppe**

**Opbevaringstemperatur****kort tid**

stuetemp  
 køleskab  
 køleskab  
 køleskab  
 stuetemp

køleskab  
 stuetemp  
 stuetemp

**lang tids opbev.**

køleskab (ej frys)  
 fryser  
 fryser  
 fryser  
 fryser  
 fryser

**Da resultatet af transformationen bliver en genmodificeret bakterie, skal der arbejdes under *skærpede laboratorieforhold*:**

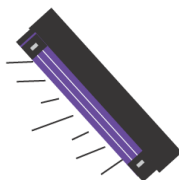
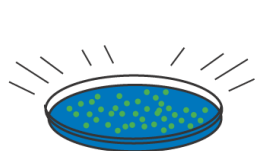
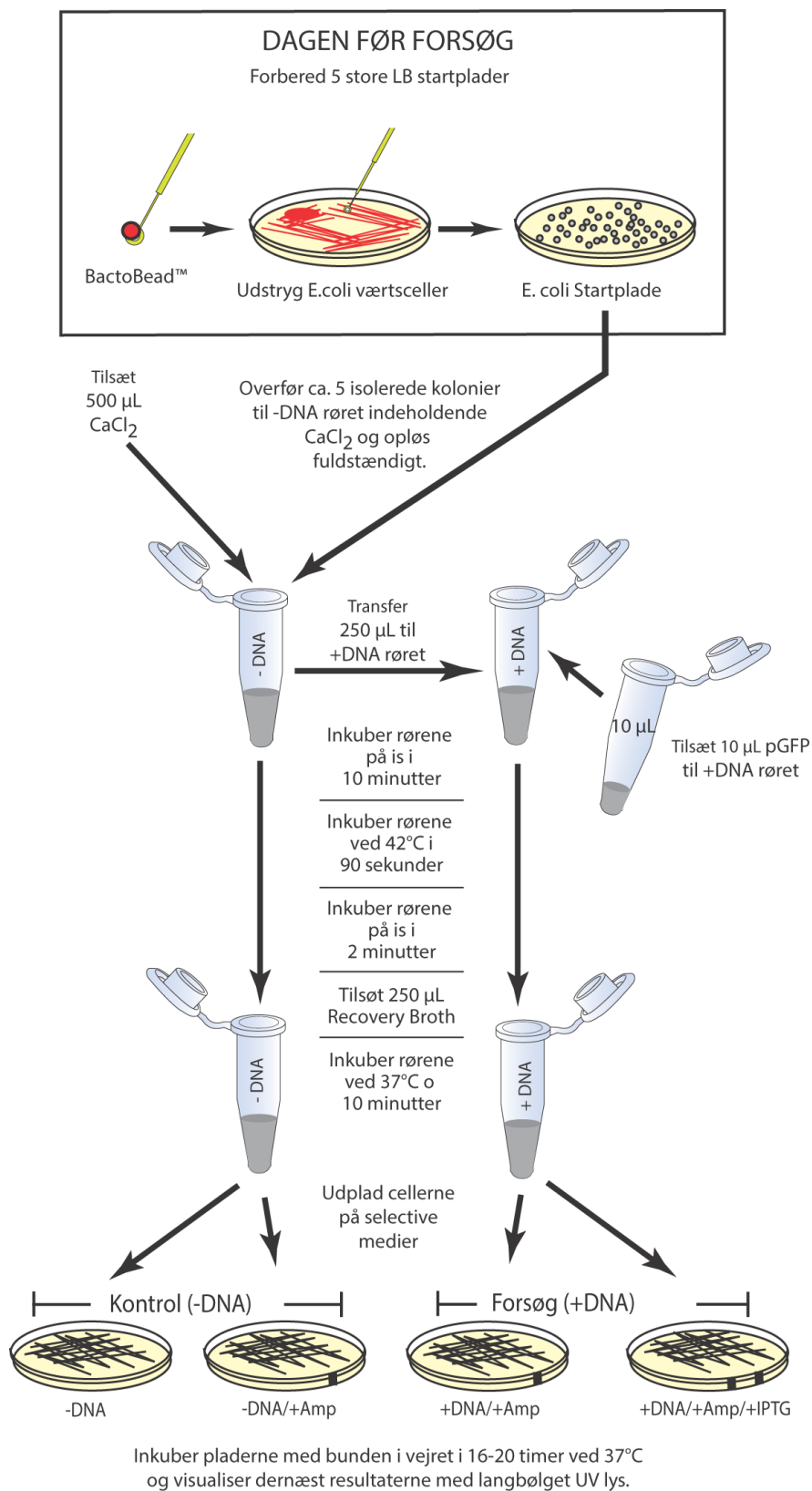
- **brug kittel**
- **arbejd kun på pladser med dækpapir**
- **opsaml alt affald**
- **arbejd stille og roligt**
- **rapporter straks ved eventuelle uheld**
- **mad- og drikkevarer må ikke indtages i laboratoriet**
- **Husk at vaske hænder hver gang du forlader forsøgslokalet**

#### **Affaldshåndtering**

- **Al affald, der har været i berøring med mikroorganismer autoklaveres. Det vil sige at al affald opsamles og steriliseres inden det bortskaffes**
- **kitlerne kogevaskes – hvis de er kontaminerede skal de opbevares i en lukket beholder indtil de vaskes**

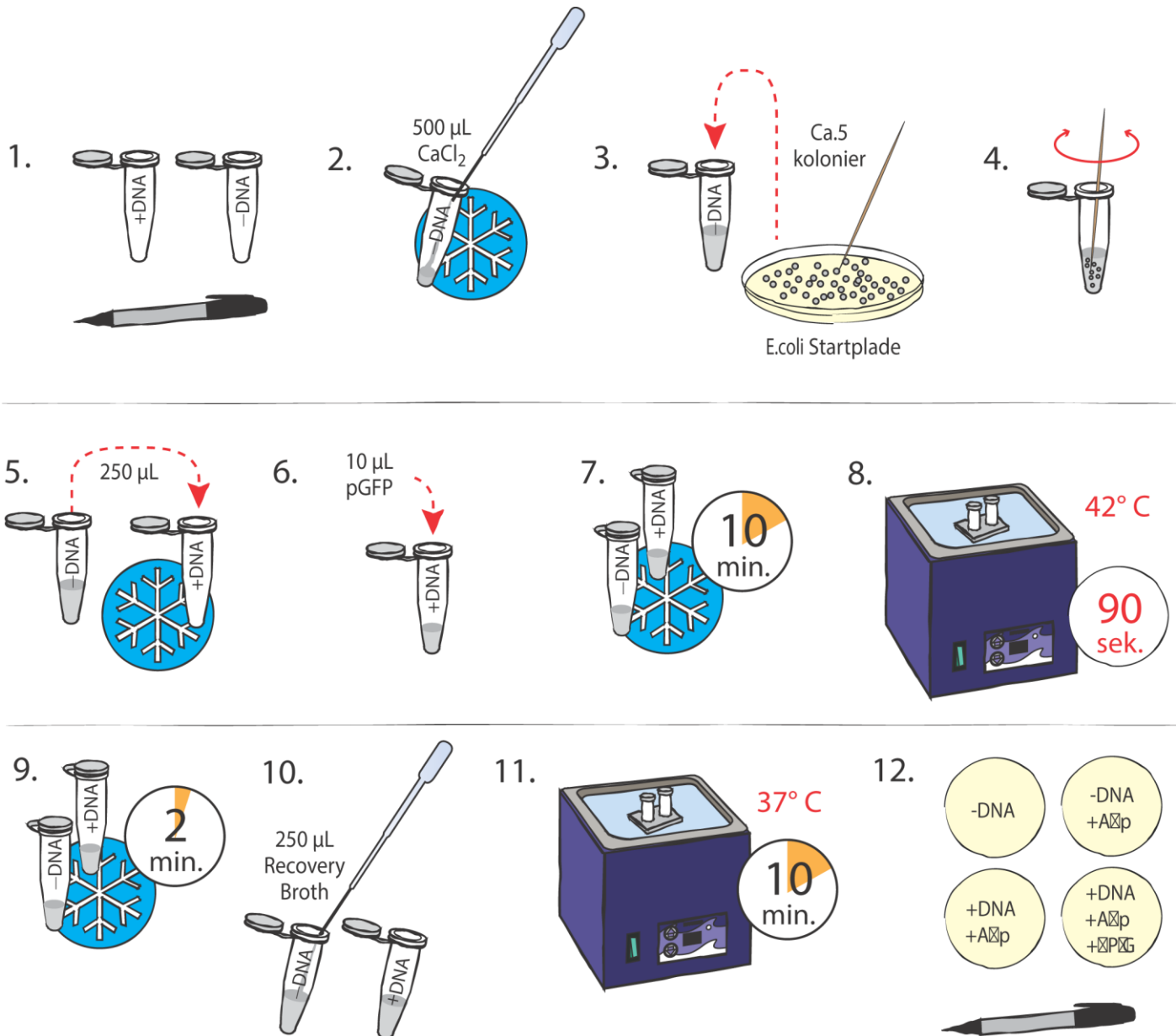
**Teori s. 4-7 i engelsk vejledning**

## Flowchart



LANGBØLGET UV LYS ER PÅKRÆVET FOR AT OBSERVERE FLUORESCERENDE KOLONIER.

## Transformationen



### 1. Klargør følgende mikrocentrifugerør:

- Mærk et mikrocentrifugerør **" +DNA "** – dette rør skal indeholde transformationen med pFG.
- Mærk et andet mikrocentrifugerør **" -DNA "** – dette rør er kontrolrøret

2. Med en steril pipette overføres 500 µL iskold CaCl<sub>2</sub> til **" -DNA "** røret

3. Der skal nu overføres kolonier fra start-pladen til **" -DNA "** røret. Med en steril tandstik overføres 15 velafgrænsede kolonier på hver 1-1,5 mm til **" -DNA "** røret

4. Sno tandstikken hurtigt mellem dine fingre og op og ned i CaCl<sub>2</sub>-opløsningen, så alle celler kommer ned i mikrocentrifugerøret. Knips og/eller vortex begge rør for at få alle cellerne og CaCl<sub>2</sub> blandet godt

5. Overfør 250 µL til røret mærket **" +DNA "**. Lad begge rør stå på is

6. Tilsæt 10 µL pFluoroGreen™ DNA (pGFP) til **" +DNA "** røret (og KUN til dette rør)

7. Inkuber begge rør på **is i 10 minutter**

8. Overfør de to rør til **42°C i 90 sekunder**. Varmechokket letter plasmidets optagelse i cellerne

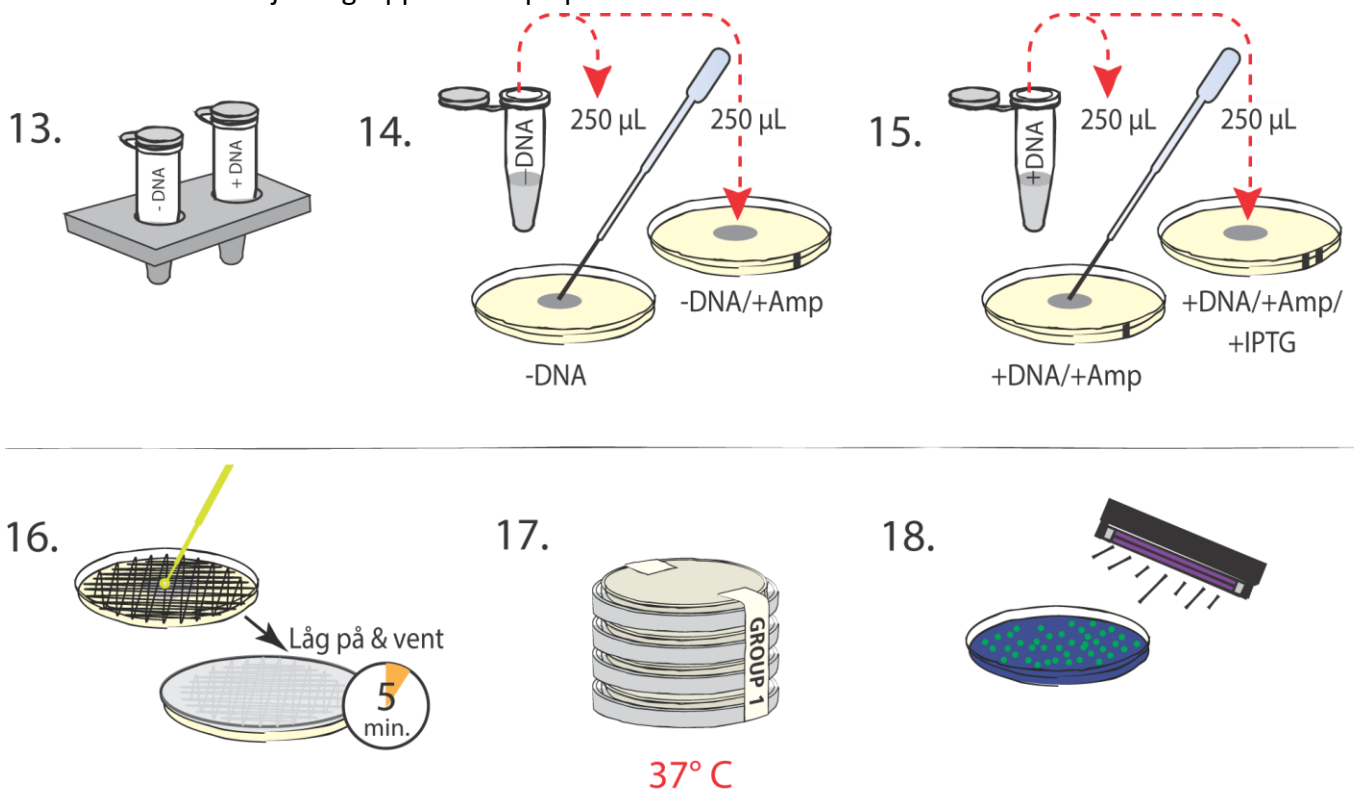
9. Stil derefter **straks** rørene på **is i 2 minutter**

10. Med en steril pipette tilsættes 250 µL LB-medie ("Recovery Broth") til hvert rør. Husk at skifte pipettespids! Bland godt ved at knipse på rørene.

11. Inkuber cellerne i **30 minutter** i et 37°C varmt vandbad

12. Mens cellerne inkuberer klargøres de 4 udleverede agarplader. Ret navngivningen i bunden på de udleverede petriskåle. Navngivningen gøres således:

- 1 Skål *uden tekst* mærkes "-DNA"
- 1 Skål "Amp" mærkes "-DNA/Amp"
- 1 Skål "Amp" mærkes "+DNA/Amp"
- 1 Skål "Amp/IPTG" mærkes "+DNA/Amp/IPTG/"
- Skriv desuden jeres gruppes navn på pladerne



13. Tag rørene op af vandbadet (når de 30 minutter er gået) og gør klar til at stryge bakterierne på agarpladerne

14. Med en steril pipette overføres 250 µL celler fra kontrolrøret mærket "-DNA" til midten af hver af pladerne mærket "-DNA" og "-DNA/Amp".

15. Med en steril pipette overføres 250 µL celler fra røret mærket "+DNA" til midten af hver af pladerne mærket "+DNA/Amp" og "+DNA/Amp/IPTG".

16. Med en steril podenål spredes cellerne over hele pladen. Luk pladerne og lad dem stå indtil væsken er absorberet i agaren – det vil sige ca. 5 minutter.

17. Forsegl jeres plader med tape og stil dem med bunden i vejret i varmeskabet ved 37°C til næste dag (mindst 20 timer)

18. Analyse af pladerne

**Analyse af transformationen – næste dag:**

1. Mørklæg rummet og benyt en UV-lampe for at se de transformerede celler.
2. Tæl kolonierne, noter koloniernes farve og tag billeder af pladerne
3. Beregn transformationseffektiviteten:

Transformationseffektiviteten er et udtryk for hvor mange celler der transformeres pr 1 µg plasmid DNA – her pFG

Tæl antallet af kolonier på pladen mærket ” +DNA/Amp/IPTG”

Beregn transformationseffektiviteten med følgende formel:

$$\frac{\text{Antal transformanter}}{\mu\text{g DNA}} \times \frac{\text{Slutvol. v. recovery(mL)}}{\text{mL udpladet}} = \text{Antal transformanter pr.}\mu\text{g}$$

I dette forsøg bruges 50 ng (0,05µg) DNA

Slutvolumen ”recovery” er 0,5 ml

Udpladningsvolumen er 0,25 ml

4. Forklar hvorfor ikke alle hold opnår samme transformationseffektivitet

## Lærerens forberedelser

### Før modul I: Transformation af E. coli med pUC8

Agarplader støbes (kan gøres 2-7 dage før)

Strygning og inkubering af E. coli (dagen før forsøget – 20 min. arbejde, 16-18 timers inkubering)

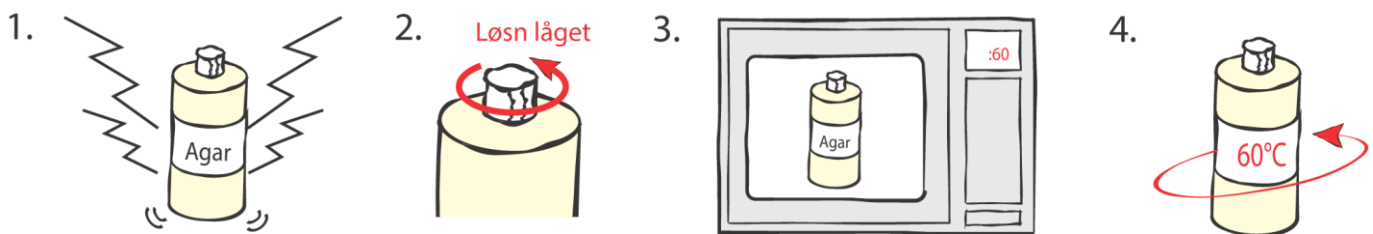
Klargøring af plasmid DNA, CaCl<sub>2</sub> og "Recovery Broth" (fra 1 dag og indtil 30 minutter før forsøget)

#### Op til modul I

Tænd for vandbadene på hhv. 37°C og 42°C

Tænd varmeskabet på 37°C

### Støbning af agarplader



Senest 2 dage før forsøgssdagen skal agarpladerne støbes. Støbes pladerne tidligere end to dage før kan de opbevares i køleskabet: Stil dem med bunden i vejret for at undgå kondensdannelse – og tag pladerne ud to dage før forsøget, så de kan tørre.

Løsn proppen på ReadyPour™ medierne **uden** at tage den helt af. **Bemærk: Hvis proppen ikke er løs kan man risikere, at hele flasken eksploderer under opvarmningen i mikrobølgeovnen.**

Tryk på flasken og ryst den kraftigt for at få agaren til at brække i stykker i flasken

Smelt derefter agaren – enten i en mikrobølgeovn eller i vandbad. Sørg for at der ikke er klumper af ikke-smeltet agar tilbage

A: Mikrobølgeovn: Opvarm i mikrobølgeovnen i 30 sekunder ad gangen. Ryst flaske og fortsæt. Da flaskens prop er løs er det vigtigt, at man passer på ikke at få den varme agar på fingrene.

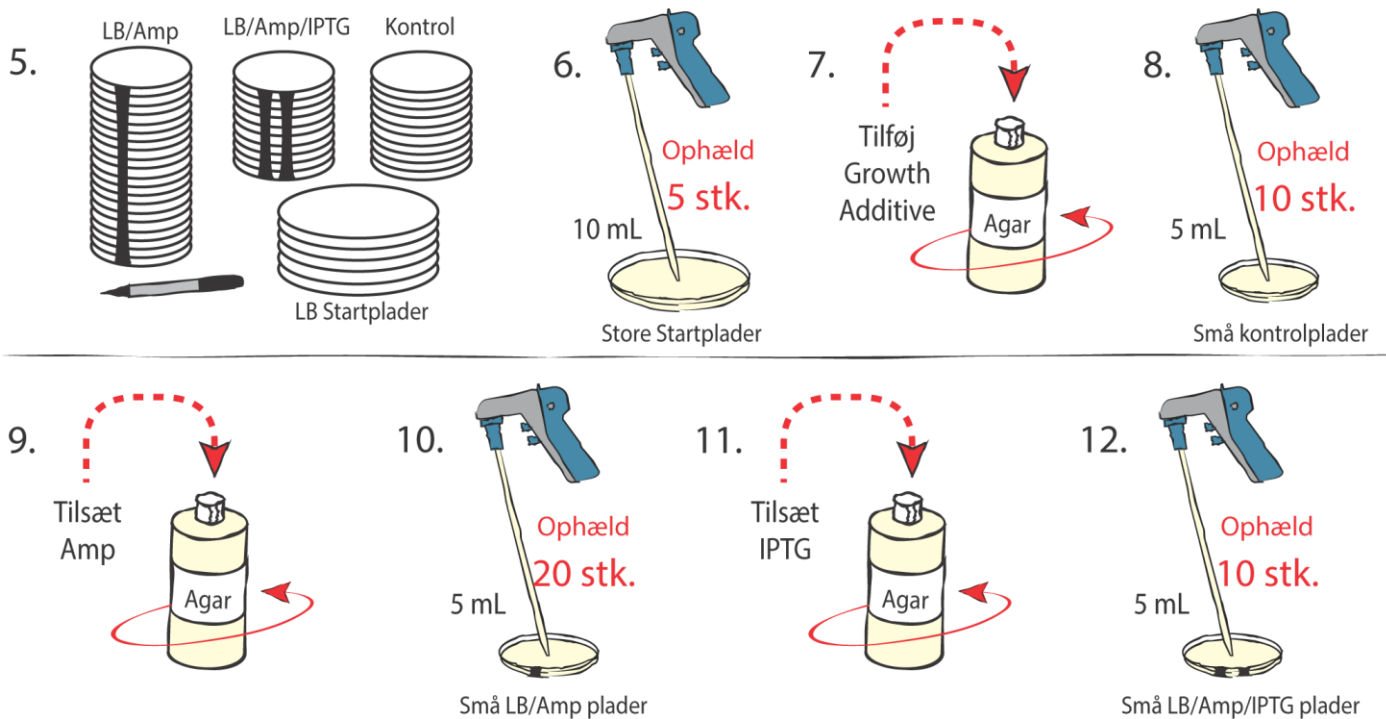
B: Vandbad: Stil flasken i et varmt (gerne kogende vandbad). Ryst af og til flasken. Da flaskens prop er løs, er det vigtigt, at man passer på ikke at få den varme agar på fingrene.

Lad agaren afkøle – evt. ved at stille den i et 60°C varmt vandbad (eller hold øje vha. et termometer med alarm). Når agaren har nået 60°C er det muligt at holde på flasken uden handsker.



Mærk petriskålene mens agaren køler af

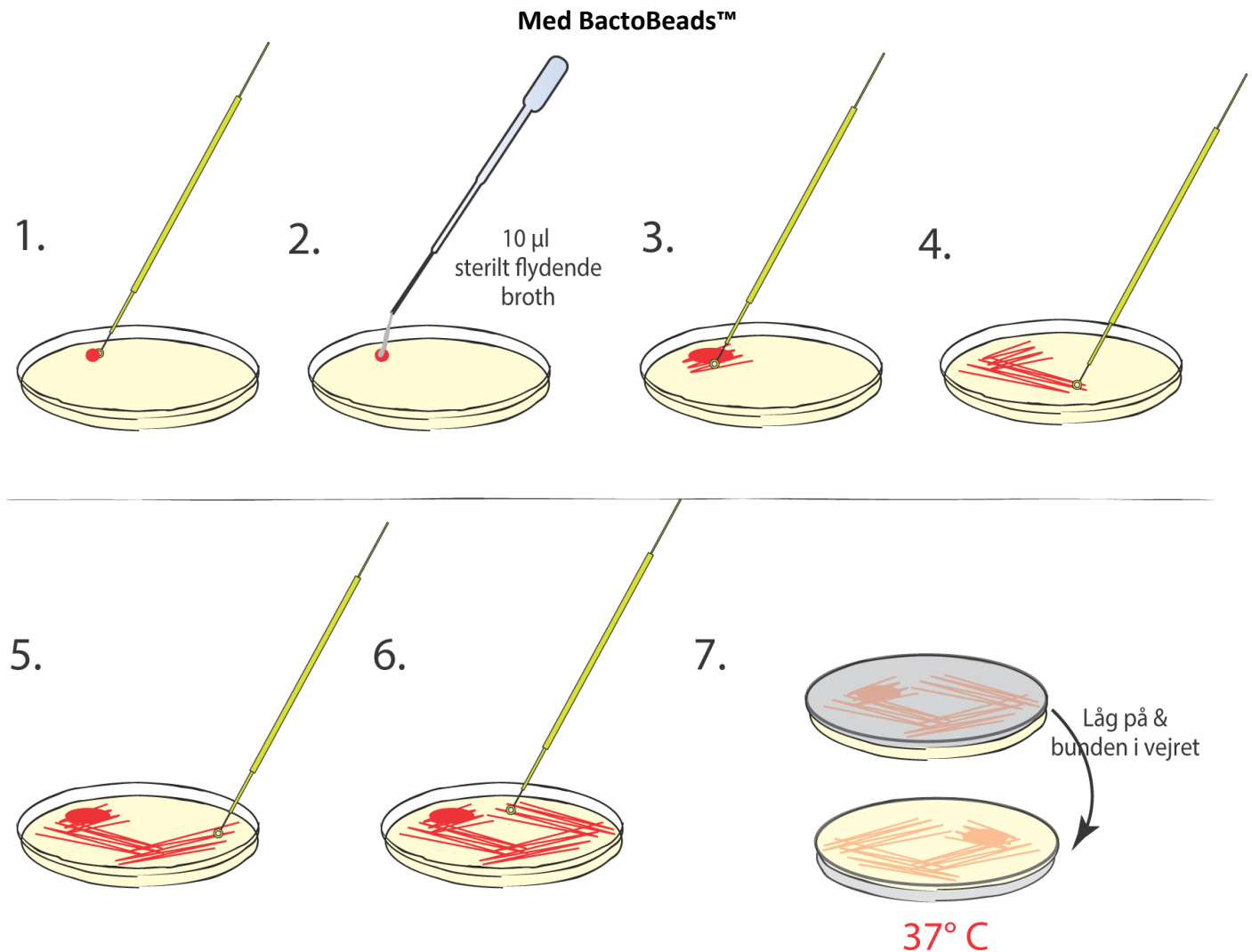
1. Mærk 5 store petriskåle "**start-kultur**"
2. Tag 20 små petriskåle og mærk disse "**Amp**"
3. Tag 10 små petriskåle og mærk disse "**Amp/IPTG**"
4. De sidste 10 små petriskåle mærkes ikke



### Støbning

1. Støb først de 5 store start-kultur-plader. Der hældes **10 ml** i hver plade (brug pipettesuger og 10 mL målepipetter). Luk dem og lad dem størkne
2. Tilsæt nu **hele mængden af "Growth Additive"** til den 60-50°C varme flaske med ReadyPourAgar. Luk flasken og hvirvl rundt for at blande godt
3. Med en frisk 10 mL målepipette tilsættes **5 ml** af det blandede LB agar til de 10 små **ikke-mærkede** plader. Læg låg på pladerne.
4. Tilsæt **hele mængden af Ampicillin** til den 60-50°C varme flaske med ReadyPourAgar. Luk flasken og hvirvl rundt for at blande godt
5. Med en frisk 10 mL målepipette tilsættes **5 ml** af det blandede LB/Amp agar til de 20 små "**Amp**" plader
6. Tilsæt **hele mængden af IPTG** til den 60-50°C varme flaske med ReadyPour Agar. Luk flasken og hvirvl rundt for at blande godt
5. Tilsæt **5 ml** af det blandede medium til de 10 små "**Amp/IPTG**" plader. Læg låg på pladerne
7. Lad alle pladerne stå og størkne.
8. Hvis ikke pladerne skal bruges inden for de 2 næste dage stables de og pakkes i en plastikpose og stilles med bunden i vejret indtil de skal benyttes.
9. 30 minutter før brug: Tag pladerne fra køleskabet og opvarm dem i en 37°C inkubator i 30 minutter

## Podning af E. coli – dagen før forsøget



1. Med en steril podenål overføres **en enkelt** bakteriekugle (BactoBead™) fra den lille beholder til kanten af en af de 5 store petriskåle
2. Opløs hurtigt kuglen ved at tilsætte **10 µL steril LB Broth ("Recovery Broth")** eller sterilt vand
3. Stryg med en podenål frem og tilbage i den opløste bakterieplet. Dette skaber en primær udstrygning. Pas på at du ikke skraber podenålen ned i agaren.
4. Stryg fra den primære udstrygning over til en ren del af agaren. Stryg flere gange i samme retning. Se figuren ovenfor.
5. Roter pladen og stryg fra den sekundære udstrygning over til en ren del af agaren. Stryg flere gange i samme retning. Se figuren ovenfor
6. Roter pladen en gang mere og gentag punkt 5. Denne teknik skulle give isolerede kolonier
7. **Gentag med de sidste 4 plader**, læg låg på pladerne og opbevar dem med bunden opad ved 37°C i 16-20 timer (ved stuetemperatur: 24-48 timer)

## På selve forsøgsdagen

Afpipetter 1 mL CaCl<sub>2</sub> i 10 mikrocentrifugerør. Stil rørene på is

Afpipetter 1,5 mL LB-medie ("Recovery Broth") i 10 mikrocentrifugerør- lad rørene stå ved stuetemperatur

## Klargøring af plasmidet

Mærk 10 mikrocentrifugerør med "pFG"

Stil det lille glas med supercoiled pFluoroGreen™ på is

Før plasmidet fordeles bankes røret i bordet nogle gange for at sikre, at det hele er samlet i bund

Tilsæt 12 µL pFluoroGreen til hvert af de mærkede mikrocentrifugerør

Luk rørene og stil dem på is

## Materialer pr. gruppe

En start-kulturplade, der deles med en anden gruppe

1 mikrocentrifugerør med 1 mL CaCl<sub>2</sub>

1 mikrocentrifugerør med pFluoroGreen plasmid

1 mikrocentrifugerør med 1,5 mL Recovery Broth

2 sterile podenåle

2 petriskåle mærket "Amp"

1 petriskål mærket "Amp/IPTG"

1 petriskål – ikke mærket

4 sterile 1mL pipetter

Sterile tandstikkere

mikropipetter og spidser

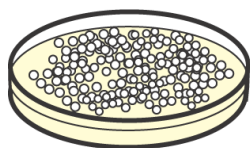
bægerglas e.l. til opsamling af affald

isbade

## Fælles

Varmeskab og vandbade

## Resultater



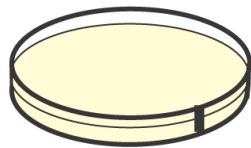
**-DNA**  
Kontrol Celler  
(intet DNA)

### Resultat

Ingen fluorescerende celler. Hvide kolonier. Kan ligne et udtværet cellelag.

### Viser

Bakteriecellerne kan overleve uden ampicillin.



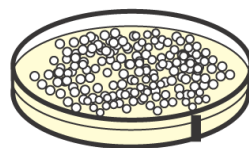
**-DNA/ +Amp**  
Kontrol Celler  
(ingen DNA)

### Resultat

Ingen vækst

### Viser

Cellerne er følsomme overfor ampicillin. Uden pFluoroGreen™ er de ikke ampicillin resistente.



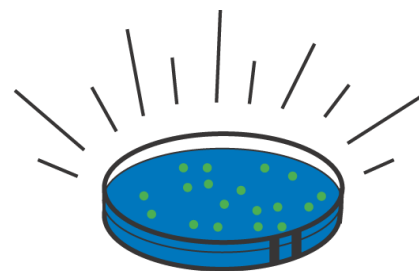
**+DNA/ +Amp**  
Transformerede celler  
(pFluoroGreen™)

### Resultat

Hvide kolonier. Kan se udtværede ud.

### Viser

Cellerne bliver resistente overfor ampicillin når de transformeres med pFluoroGreen™. GFP/BFP produceres ikke uden tilstedeværelse af IPTG.



**+DNA/ + Amp/ +IPTG**  
Transformerede celler  
(pFluoroGreen™)

### Resultat

Individuelle kolonier fluorescerer, når de belyses med langbølget UV-lys.

### Viser

Cellerne bliver resistente overfor ampicillin, når de transformeres med pFluoroGreen™. Produktionen af GFP/BFP aktiveres ved tilstedeværelse af IPTG