

# Forsøgsvejledning

## Isolering og identifikation af cellulaseproducerende bakterier

### Vigtigt

**Arbejdstilsynet har i forbindelse med godkendelsen af øvelsen understreget at følgende regler skal overholdes, og fundet at gennemførelsen således er forsvarlig såfremt:**

- 
- Der er en grundig undervisning af eleverne førend øvelserne påbegyndes, hvor der gøres opmærksom på farene 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 underviser under øvelsernes udførelse.
  - Det må ikke være muligt at der er adgang for alle og enhver til de mobile laboratorier.

## 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 i forsøget.

Primersæt	Gen som opformeres	Gen findes i	Funktion af PCR
A	16S rRNA	Alle bakterier	Positiv kontrol
B	endo-1,4- $\beta$ -glucanase	<i>Bacillus subtilis</i>	Artsidentifikation
C	$\alpha$ -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. Man kan hjælpe Novozymes forskere ved at sende denne bakterie ind. Følg instruktionerne på side 18. Under alle omstændigheder skal man

rapportere resultatet af sine prøver på nettet, hvor man også kan se hvad andre skoler har fundet.<sup>1</sup>

### Forsøget i praksis

Det anbefales at det tilhørende teorimateriale<sup>2</sup> 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 opretter sig selv på [www.darwin2.cbs.dtu.dk](http://www.darwin2.cbs.dtu.dk) og rapporterer hvor gruppen har taget jordprøver, og under hvilke omstændigheder. 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.

Til sidst rapporteres resultaterne for gruppens prøver online, hvor man også kan se hvad andre gymnasier i landet har fundet.

Det anbefales at se de forskellige videoer som illustrerer laboratorietechnikker undervejs gennem projektet. Se dem på en smartphone ved at skanne strejkoderne med en app der kan læse en QR-code. Videoerne kan også ses på Biotech Academys hjemmeside.

Det er en nødvendighed for succes med forsøgene at man kan bruge en pipette. Derfor anbefales det at der trænes med brugen af pipetterne 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 angivende volumener pipetteres korrekt.

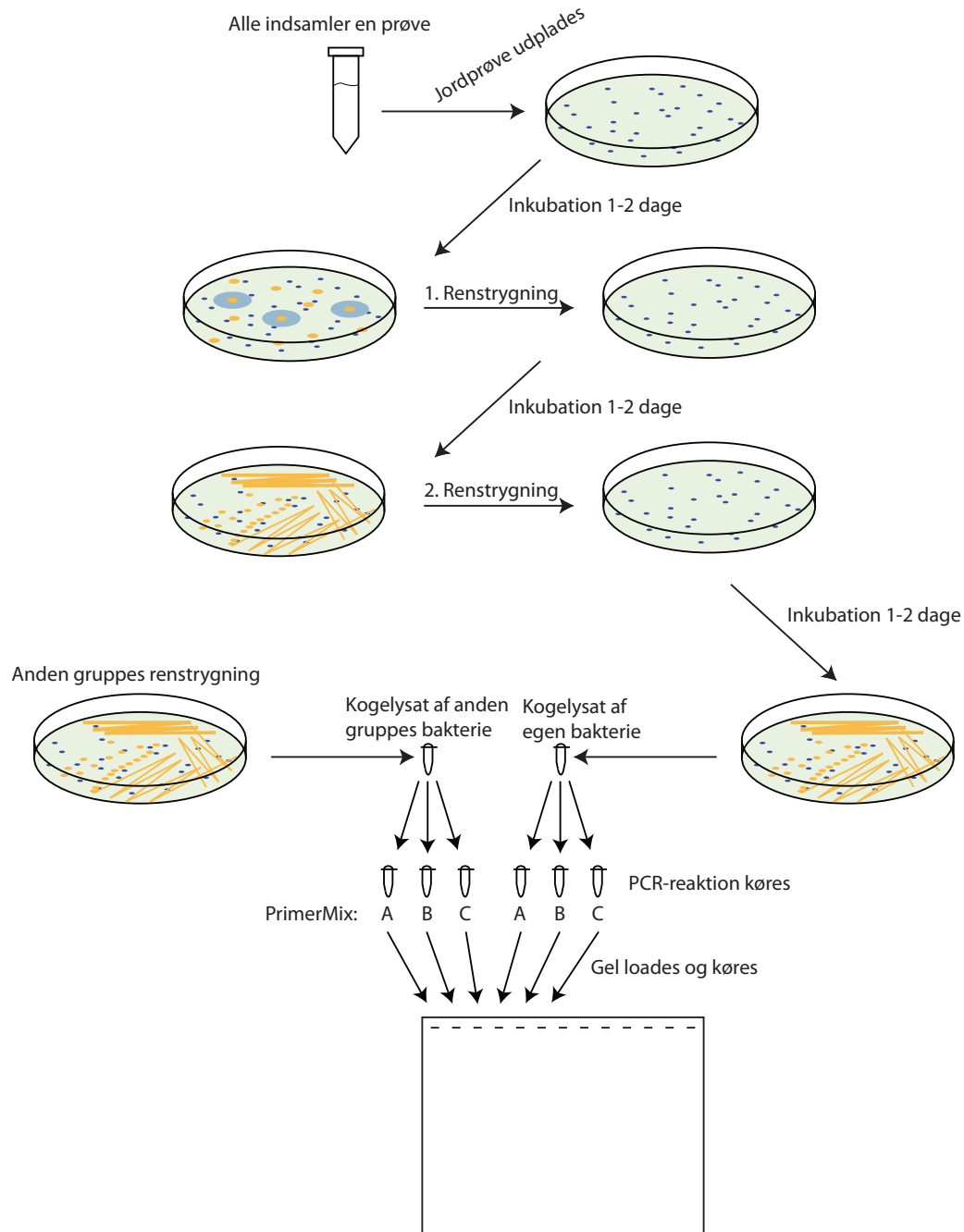
*Rigtig god fornøjelse!*

---

<sup>1</sup> Gå ind på [www.darwin2.cbs.dtu.dk](http://www.darwin2.cbs.dtu.dk) og rapporter gruppens resultater

<sup>2</sup> Find det på [www.biotechacademy.dk](http://www.biotechacademy.dk) under undervisningsprojekter -> "Fra Darwin til bioteknologi".

## Oversigt over hele forsøget



## 1 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 20.

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. Hvis det lykkes at finde en ny cellulaseproducerende bakterie som skal sendes ind til Novozymes, er det meget vigtigt at dette skema er udfyldt og sendes med. 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 19 til som hjælp.

### 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 **sput, snot, ørevoks** mm.
3. **Afføring fra ådselædende dyr** – f.eks. katte, hunde, ræve mm.

### Materialer:

- 50 ml falcon plastrør med låg
- Ske eller lignende
- 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.

## GENERELT OM MIKROBIOLOGISKE TEKNIKKER

### I laboratoriet

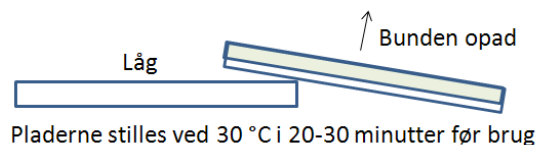
Det er forbudt at indtage mad og drikkevarer, når der arbejdes med bakterier. Mad, drikke og overtøj skal opbevares uden for laboratoriet. Husk at vaske hænderne grundigt med sæbe inden I starter.

Alle bordeoverflader hvor der arbejdes med bakterier skal før arbejdet påbegyndes tørres af i 70% ethanol (eventuelt husholdningssprit, 500ml + 200 ml vand). Efter arbejdet afslutning rengøres bordene på samme. 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. Se hvordan ved at skanne strekkoden.<sup>3</sup> Alt udstyr (pipettespidser, pudenåle, 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.

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

### Pipettering

Se hvordan man bruger en pipette ved at skanne strekkoden.<sup>3</sup> Det kræver en del øvelse at bruge en pipette naturligt. Man skal være omhyggelige 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.



Stregkode 1. Video om sterilteknik.



Stregkode 2. Video om pipettering.

<sup>3</sup> Eller gå ind på [www.biotechacademy.dk/undervisningsprojekter/darwin/LabTek%20videoer.aspx](http://www.biotechacademy.dk/undervisningsprojekter/darwin/LabTek%20videoer.aspx)

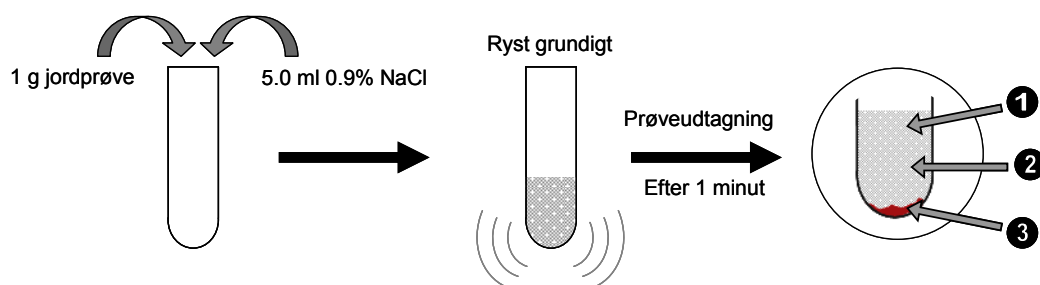
## 2 ISOLERING AF BAKTERIER (DAG 2)

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 følge 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.

### 2.1 Forbehandling af jordprøven

#### Materialer:

- Reagensglas eller lignende
- 0,9 % NaCl i H<sub>2</sub>O

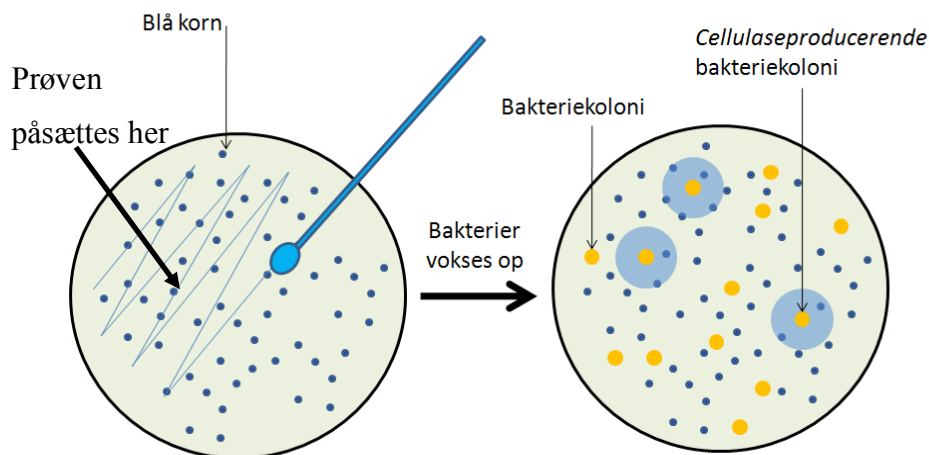


- Tag ca. 1 g af jordprøven og overfør dette til rør og tilsæt ca. 5 ml 0,9 % NaCl.
- Ryst grundigt og lad herefter reagensglasset stå i 1-10 minutter så jord, sand og sten falder til bunds. Det er vigtigt at røret ikke står for længe, da bakterierne efterhånden vil samle sig i bunden. Inden prøveudtagning besluttes 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).

## 2.2 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-ethyl-cellulose, 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:

- Blå podenåle
- Pipette (gul: 10-100 µl)
- Agarplader med blå korn
- Tape og poser til agarpladerne
- Et eller flere varmeskabe (30-60°C)
- Plastik pose eller lign. til brugte podenåle
- Tusch

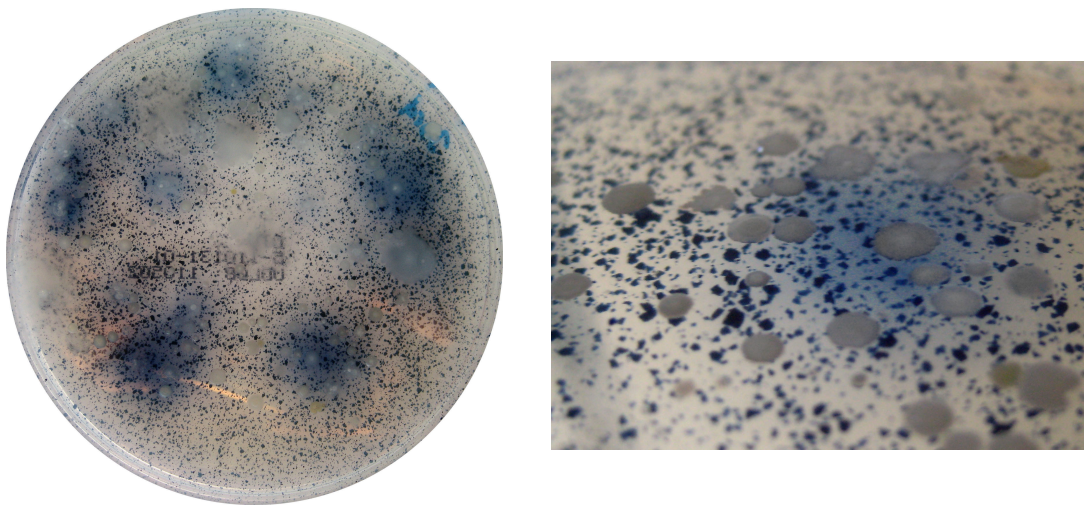
- Hvis der er meget kondensvand på agarpladernes låg rystes det af i laboratorievasken.
- Prøven udtages med pipetten. Hvis røret med bakterierne har stået for længe, rystes det igen, og der ventes 1 minut før prøven udtages. Spidsen føres ned i væsken. 20 µl væske udtages og overføres til en agarplade. Væsken stryges



forsigtigt ud over hele agarpladen med en blå podenål. De 20  $\mu$ l væske vil relativt hurtigt opsuges af pladen, men bakterierne fordeles alligevel ud over pladen.

- c) 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 varme tolerante bakterier generelt er de mest interessante når det gælder cellulaser. Evt. kan agarpladerne inkuberes et døgn mere, hvis kolonierne ikke er store nok.
- d) Noter temperatur og inkuberingstid i skemaet på side 20.

Husk at inkubere i poser for at undgå udtørring og kontaminering.



Figur 1. Til venstre ses en udpladning af jordbakterier. Til højre ses et nærbillede af en cellulaseproducerende bakteriekoloni.

## 2.3 Rendyrkning (3. og 4. dag)

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. Skan strekkoden for at se hvordan det gøres.<sup>34</sup> 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).



Strekkode 3. Video om renstrygning.

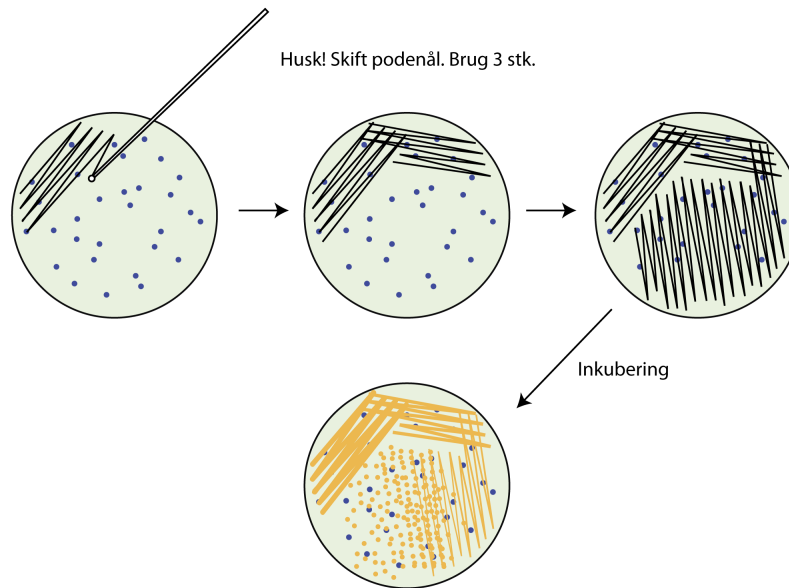
I renstrygningen gælder det om kun at få fat en bakteriekoloni, ellers vil der være flere forskellige bakterier på rendyrkningspladen. Når man med podenålen har opsamlet en koloni som man kan se med det blotte øje, vil der være rigtig mange bakterier på podenålen. Hvis det er lykkedes kun at tage materiale 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.

### Materialer:

- Hvide podenåle
- Agarplader med blå korn
- Tape og poser til agarpladerne
- Speedmarker eller tusch
- Varmeskab 30-60°C
- Bægerglas eller lign. til brugte podenåle

- a) Agarpladerne fra sidst findes frem og de fremkomne kolonier observeres.
- b) 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.
- c) 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 på næste side).
- d) Herefter tages en **NY** podenål som føres en enkelt gang igennem den afsatte streg og derefter spredes ned over agarpladen i zigzag-bevægelser.
- e) Denne procedure gentages med endnu en **NY** podenål som føres igennem det netop afsatte spor.

<sup>4</sup> Eller gå ind på [www.biotechacademy.dk/undervisningsprojekter/darwin/LabTek%20videoer.aspx](http://www.biotechacademy.dk/undervisningsprojekter/darwin/LabTek%20videoer.aspx)



Figur 2. Mønster for renstrygning. Husk at skifte podenål. 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.

## 2.4 Registrer jordprøve online

Hver gruppe skal oprette sig på [www.darwin2.cbs.dtu.dk](http://www.darwin2.cbs.dtu.dk). Efter at have oprettet en gruppe og registreret medlemmerne, indberettes jordprøverne med de informationer som løbende er noteret i skemaet på side 20. Senere, når en af bakterierne er undersøgt kan man opdatere siden med den nye information som vil kunne ses på det landsdækkende kort.

### 3 IDENTIFIKATION AF BAKTERIESTAMME

#### 3.1 DNA-ekstraktion og PCR amplifikation (dag 5)

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:

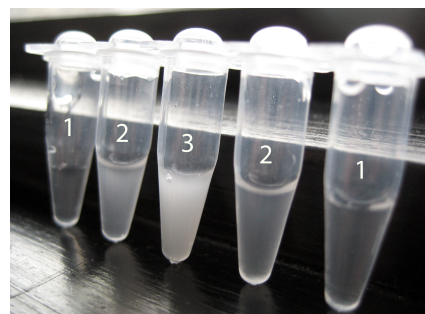
- PCR-maskine
- 8 PCR-rør
- Hvide podenåle (små)
- Pipetter og pipettespidser
- Plastik poser til brugte pipettespidser og podenåle
- Renstrøgne kulturer
- Ny agarplade
- MilliQ-H<sub>2</sub>O
- ReddyMix
- Primermix A (16S rRNA)
- Primermix B (endo-1,4- $\beta$ -glucanase)
- Primermix C ( $\alpha$ -amylase)
- Sprit til bordene

**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.

a) Til hvert af to PCR-rør overføres 100  $\mu$ l MilliQ-H<sub>2</sub>O.

b) Én koloni samles op fra gruppens egen rendyrkede plade med en hvid podenål og overføres til de 100  $\mu$ l MilliQ-H<sub>2</sub>O 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). Disse friske agarplader skal senere sendes ind til Novozymes, hvis PCR-reaktionerne viser at der måske er fundet en ny bakterie.

c) På samme måde samles en koloni op til dobbeltbestemmelse fra en anden gruppes renstrykning med en hvid podenål og overføres til de 100  $\mu$ l MilliQ-H<sub>2</sub>O i det andet PCR-rør.



Figur 3. Kogelysat med forskellige mængde bakterier. 1: For lille en mængde bakterier. 2: Perfekt mængde bakterier. 3: For stor mængde bakterier

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

- d) Sug op og ned et par gange med en pipette, hvis bakterieklumperne ikke er opslemmet.
- e) PCR-rørene placeres i de små huller i PCR-maskinen. Husk at lukke låget på PCR-rørene fuldstændigt, da væsken ellers fordamper.
- f) Indstil PCR-maskinen til små PCR-rør ved at dreje viseren, når maskinens låg er lukket.
- g) Start PCR-maskinen på programmet "Lysis". Opvarmningen i PCR-maskinen gør at bakteriecellerne lyserer (bakterierne sprænges), hvorved DNA'et kommer ud i opløsningen. Den resulterende opløsning kaldes *kogelysat*.

**Programmet "lysis" i PCR- maskinen:**

99 °C i 10 minutter

Herefter 12°C til programmet stoppes

**3.2 PCR-reaktion – opformering af DNA'et (dag)**

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 proof-reading, 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 enkeltstreng DNA, også kaldet ssDNA, hver på 20-30 nukleotider.

Tabel 2. Eksempel på hvordan gruppe 7 ville kunne mærke sine 6 PCR-reaktioner.

Kogelysat	Primersæt A	Primersæt B	Primersæt C
Eget kogelysat	7-7A	7-7B	7-7C
Gruppens 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:

- a) Til PCR-rør navngivet med prøvenummer og primersæt overføres **15,0 µl ReddyMix** med pipette.
- b) 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).
- c) Til sidst overføres **10,0 µl MilliQ-H<sub>2</sub>O**.

Nu mangler der blot primere for at blandingen er færdig. Sørg for at der til hvert rør tilsættes det rigtige primersæt!

- d) 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.
- e) 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 PCR-maskinen 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 af            94 °C i 30 sek. (denaturering af DNA)

                                 52 °C i 30 sek. (annealing, primere bindes)

                                 72 °C i 1 min 45 sek. (DNA-syntese)

72 °C i 7 min (færdiggørelse DNA-syntese)

12 °C indtil der slukkes for programmet.

Den sidste del er med for, at rørene kan stå natten over i PCR-maskinen



### 3.3 Gelelektroforese (6. dag)

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.<sup>5</sup>



Stregkode 4. Video om Gelelektroforese.

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 DNA-ekstraktionen ikke har virket. Hvis der kommer bånd i den rigtige størrelse med primermix B, er genet for endo-1,4- $\beta$ -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  $\alpha$ -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.

<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>7</u>	<u>8</u>	<u>9</u>	<u>10</u>	<u>11</u>	<u>12</u>	<u>13</u>	<u>14</u>	<u>15</u>	<u>16</u>	<u>17</u>	<u>18</u>	<u>19</u>	<u>20</u>
<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>7</u>	<u>8</u>	<u>9</u>	<u>10</u>	<u>11</u>	<u>12</u>	<u>13</u>	<u>14</u>	<u>15</u>	<u>16</u>	<u>17</u>	<u>18</u>	<u>19</u>	<u>20</u>

<sup>5</sup> Eller gå ind på [www.biotechacademy.dk/undervisningsprojekter/darwin/LabTek%20videoer.aspx](http://www.biotechacademy.dk/undervisningsprojekter/darwin/LabTek%20videoer.aspx)



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

### Materialer:

- Gel kar inkl. støbeform, endestykker, kamme og ledninger.
- Strømforsyning
- Vægt
- Kogende vandbad eller mikroovn
- Engangshandsker
- 250 ml flaske til agar
- 1000 ml kolbe til at fortynde buffer
- Agarose
- 50x TAE-buffer – HUSK: Fortyndes 50 gange i demineraliseret vand
- SYBR-safe
- Alle seks PCR-produkter
- DNA stige (DNA standardreference med kendte størrelser)
- Grydelapper

### Først støbes gelerne

Se hvordan en gel støbes ved at skanne Stregkode 4. 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:

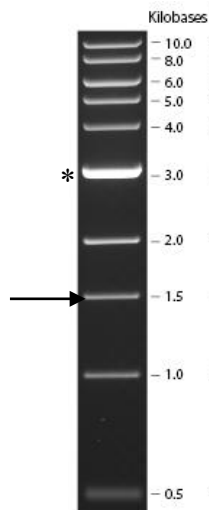
- a) Der afvejes ~ 1,5 gram agarose som overføres til en 250 ml flaske.
- b) Der tilsættes 150 ml 1x TAE-buffer (**3 ml 50x TAE buffer** + 147 ml vand).
- c) Agarosen opløses i vand ved kogning i en mikrobølgeovn. Sørg for at låget sidder løst, så dampen kan komme ud. Afhængig af typen af mikrobølgeovn (effekten) tager det ca. 1-2 minutter per flaske. Undgå at agaren 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.

### Nu kan gelen loades

- h) Hvert hold loader de 6 PCR-produkter. For hvert PCR-produkt overføres 10  $\mu$ l 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-buffere. Husk at notere hvilken gruppe der loader og hvad der loades i de forskellige brønde.
- i) Der påsættes 10  $\mu$ l markør 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 (120 V, 400 mA, 45 minutter). Husk at DNA'et løber mod plus-polen (DNA er negativt ladet pga. af fosfat grupper), så det er vigtigt, at strømkablerne er monteret rigtigt (sort/blå = negativ / rød = positiv).
- 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.<sup>6</sup>



Hvis PCR-reaktionen er forløbet som den skal, vil PCR-produktet 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 venstre ses et billede af standardreferencen. Enheden for de forskellige båndstørrelser er bp (basepar). 16S rRNA PCR-produkter skal ligge omkring det tredje bånd fra bunden (se pilen) 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 (markeret med \*).

<sup>6</sup>[www.biotechacademy.dk/undervisningsprojekter/darwin/Eksperimenter/Protokol%20til%20fotoudstyr.aspx](http://www.biotechacademy.dk/undervisningsprojekter/darwin/Eksperimenter/Protokol%20til%20fotoudstyr.aspx)

## 4 HJÆLP NOVOZYMES MED AT FINDE NYE ENZYMER

Hvis det er lykkedes at finde andre cellulaseproducerende bakterier end *B. subtilis* og *B. licheniformes* er Novozymes meget interesseret i at se nærmere på dem. Hvis begge grupper analysere af en bakterie viser at der er fundet en ny bakterie kan den renstrøgne agarplade sendes til Novozymes. Dvs. hvis begge grupper har et bånd der viser PCR-produkt af 16S rRNA-genet, men ikke har nogen bånd der viser endo-1,4- $\beta$ -glucanase eller  $\alpha$ -amylase. Der skal desuden vedlægges et print af gelfotos, hvor det er tydeligt markeret hvor de tre forskellige PCR-produkter er loadet. Det er også vigtigt at alle informationer om prøven sendes med. Log ind på [darwin2.cbs.dtu.dk](http://darwin2.cbs.dtu.dk), find prøven, tryk ”vis udskrift” og print. Pak udprintet ned sammen med agarpladen og gelfotos i en plasticpose og send det afsted. Jordprøven skal ikke medsendes.

### Der skal vedlægges:

- Agarplader med rene stammer
- Print af gelfotos
- Prøveskemaet tilhørende bakterien

Det hele kommer i en pakke og sendes til:

**Att. Preben Nielsen**  
**Novozymes A/S**  
**Krogshøjvej 36, 1BS.19**  
**2880 Bagsværd**

## 5 EVALUERING

Vi håber at projektet er gået godt, men for at det også kan gå godt i fremtiden er det vigtigt at du evaluerer projektet. Scan koden eller gå ind på <http://goo.gl/7vuUb>, giv os din mening, og hjælp os med at gøre tingene bedre fremover.



## 6 PRØVESKEMAER

### 6.1 Oversigtsskema

Dette skema kan hjælpe med at holde styr på prøverne. Mærk alle prøver med holdnr. og prøve nr., så hold 4 vil f.eks. mærke deres 7. prøve med 4-7. Se eksemplet herunder.

Prøvenr.	Type	Note	Dato
4-7	Renstrygning	Kaspers 2. rendyrkning. Helt ren	28/3 2034

I type kolonnen skrives om prøven er en agarplade eller en PCR-reaktion osv. Noten kan specificere lidt mere præcist hvad der er i prøven. Skrive både dato på prøven og her i skemaet.

Prøvenr.	Type	Note	Dato

## 6.2 Prøveskema – Information om isolat

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

### Forklaringer:

**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.