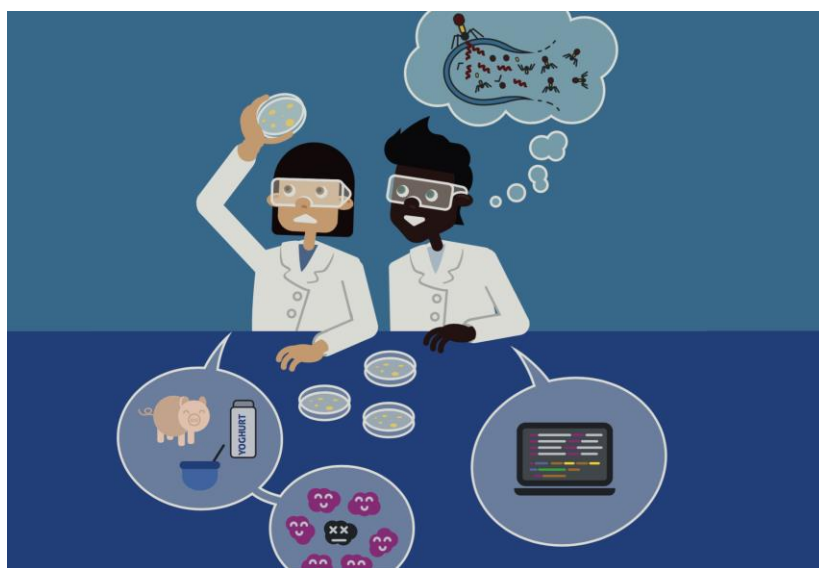




KOMPENDIUM

MIKROBIOMET

Biotech Academy Camp 2021



NAVN: _____

GRUPPE: _____

Biotech Academy Camp 2021

Velkommen til Biotech Academy Camp 2021. Dette kompendium vil introducere dig til relevant teori ift. årets tema og laboratorie øvelser. Du forventes ikke at forstå det hele, da det også vil blive gennemgået i løbet af campen. Dog bør du have et godt overblik over, hvad kompendiet indeholder og hvad du skal lave i løbet af ugen.

I år vil Biotech Academy Camp sætte fokus på mikrobiomet.

Anden halvdel af kompendiet er en laboratorieintroduktion som indeholder tre dele. **1)** Først finder du en introduktion til arbejde i et GMO-laboratorie, **2)** derefter vil der være et længere afsnit med øvelser som i skal udføre på den første halvdel af campen. Her skal i undersøge et mikrobiom, mere specifikt fæces prøver fra grise (bare rolig, vi har indsamlet prøverne og afvejet dem. I skal blot tilføje forskellige reagenser til prøven). Undervejs skal I kontrollere jeres resultater med forskellige hyppigt brugte metoder indenfor bioteknologi. **3)** Sidste halvdel af ugen har fokus på yoghurt og analyse af bakterievækst heri. I vil stå for at lave jeres egen yoghurt, hvorefter I skal isolere og undersøge bakterien som gror i yoghurten.

God læsning! – Vi glæder os til at møde jer

Bedste hilsner Mads og Charlotte

noVO
nordisk
fonden

Benefiting people and society

Carlsberg
Mindelegat

novozymes®
Rethink Tomorrow

CHR HANSEN

Improving food & health

Pearson

DTU Bioengineering
Department of Biotechnology and Biomedicine

DNA sense

Indhold

Mikrobiomet	5
Tarmmikrobiomet	5
Probiotika og præbiotika	6
Udvalgte forskningsresultater i tarmmikrobiomet	7
Bakterier	7
Gram-positive og Gram-negative bakterier	8
Anaerobe og aerobe bakterier	8
Bakteriedyrkning	8
Vækstmedie	10
Selektion af bakterier	11
Det genetiske udtryk	11
DNA – Livets molekyle	11
RNA – Det alsidige molekyle	13
Proteiner – Cellens håndlangere	13
Proteinsyntesen	13
DNA Replikation i bakterier	14
Transskription: Fra DNA til RNA	16
Initiering	17
Elongering	18
Terminering	18
Translation: Fra mRNA til polypeptid	18
Initiering	20
Elongering	20
Terminering	20
Bioteknologiske metoder	22
DNA-ekstraktion	22
Nanodrop	22
Polymerase Chain Reaction (PCR)	22
Valg af primere - kopiernes start og stop	23
Faserne i en PCR-cyklus	23
Gelelektroforese	25

Sekventering og bioinformatik	27
Fylogeni	27
Krav til gener for anvendelse i evolutionære studier	28
Ribosomalt RNA	28
Sekventering	29
Bioinformatik og sequence alignment	31
Kildehenvisninger	32
Sikkerhed i laboratoriet	34
Laboratorieaffald	35
Tips til laboratoriearbejde	35
Dag 1: Lørdag	37
Øvelse 1: Pipettering	37
Dag 2: Søndag	39
Øvelse 2: DNA ekstraktion	39
Øvelse 3: Kontrol med Nanodrop	42
Dag 3: Mandag	43
Øvelse 4: 16s rRNA PCR	43
Øvelse 5: Kontrol med gel-elektroforese	46
Dag 3: Mandag	48
Øvelse 6: Inokulere yoghurt	48
Dag 4: Tirsdag	48
Øvelse 7: Støbning af selektive plader	48
Øvelse 8: Udpladning af yoghurt på selektive plader	49
Dag 5: Onsdag	50
Øvelse 9: Undersøge plader + mikroskoper	50
Øvelse 10: Isolere bakterie fra plader	53
Dag 6: Torsdag	54
Øvelse 11: Gro bakterier til vækstforsøg	54
Øvelse 12: Bestemme væksthastigheden	54

Teori

Mikrobiomet

Mikrobiomer er en samling af mikroorganismer, der kan findes overalt – på din hånd, i din mave, i yoghurt og på planter blot for at nævne nogle eksempler. Mikrobiomet kan ikke ses med det blotte øje, men indvirker i høj grad på overlevelsen af arter og sundheden af visse miljøer (jf. ovenstående).

Mikrobiomet er et kæmpe forskningsområde, som har fået stor opmærksomhed de seneste 15 år. Vi har dog brugt de gavnlige mikroorganismer til mange andre processer førhen. Den danske bioteknologi-virksomhed, Chr. Hansen laver f.eks. kulturer, som er samlinger af mikroorganismer, til store dele af verdens mejeriproduktion og bryggeriets Carlsberg har anvendt gær til ølbrygning siden 1800-tallet.

Til trods for, at mikrobiomerne altid har eksisteret i kroppen, så er der først påvist sammenhænge mellem f.eks. tarmbakterierne og metaboliske sygdomme (som diabetes) de seneste årtier. Tarmmikrobiomet kaldes sågar endnu et vitalt organ/system. I dette teorikompendium fokuserer vi på tarmmikrobiomet, idet laboratorieøvelserne viser dette forskningsområde. Tarmmikrobiomet er det bedst forståede og mest diverse mikrobiom i kroppen og indeholder 10 gange flere celler end menneskekroppen^{1,2}.

Tarmmikrobiomet

Mikrobiomet ændrer sig betydeligt i løbet af livet. Et spædbarn fødes uden et mikrobiom, men eksponeres ved en naturlig fødsel, allerede i fødselskanalen for moderens vaginale mikrobiom og dertil ofte tarmmikrobiomet fra moderens fæces. Når amningen opstartes, viderefører moderen, gennem modermælken, både vigtige antistoffer, men også bakterier til bl.a. tarmsystemet. Mikrobiomet udvikles dermed gradvist og er yderst afhængigt af individets miljø. På den måde kan mikrobiomet anses som et fingeraftryk for et individ.

Tarmens mikrobiom domineres af bakteriegrupperne *Firmicutes* (f.eks. *Lactobacillus*) og *Bacteroidetes* (f.eks. *Provetella*) samt i mindre grad af *Proteo-* og *Actinobakterierne*. Figur 1 viser forekomsten af varierende bakteriegrupper i tarmmikrobiomet gennem menneskelivet. I de fleste tilfælde er et diversit mikrobiom fordelagtigt, dog består 99% af tarmmikrobiomet af de samme 30-40 arter^{1,3}.

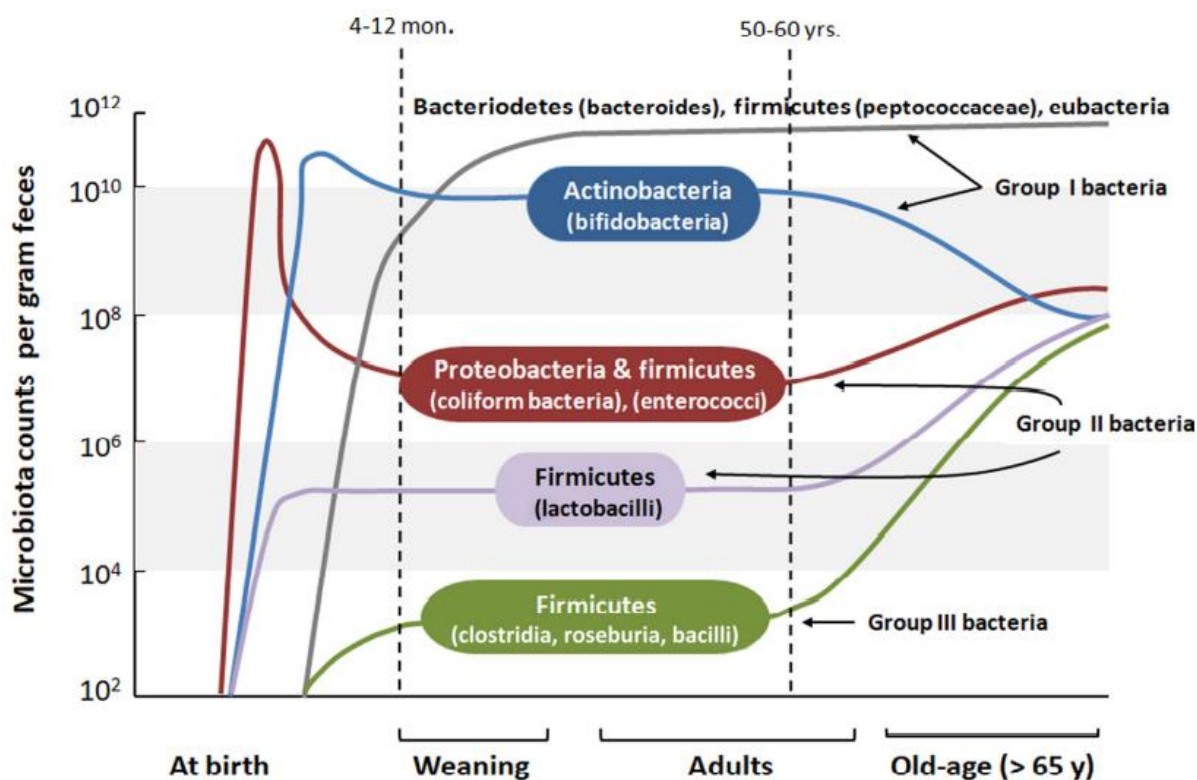


FIGURE 1.2 Changes in the fecal microbiota with increased age.

Figur 1 Fra: Gut microbiota in health and disease s. 4³

På Biotech Academy Camp 2021 vil I komme til at undersøge tarmmikrobiomet hos grise i forskellige livsstadier.

Probiotika og præbiotika

Tarmmikrobiotaen kan påvirkes af mange forskellige faktorer, herunder medicin og mad. I forskningens verden arbejdes der ofte med begreberne probiotika og præbiotika til kontrol af bl.a. tarmmiljøet.

Probiotika defineres som levende og veldefinerede mikroorganismer, som udgør helbredsmæssige fordele. Probiotika er måske et nyt begreb for dig, men hvis du nogensinde har fået fortalt, at du skulle spise yoghurt, hvis du havde ondt i maven, så kender du muligvis allerede til deres effekt. Ondt i maven kan nemlig skyldes en ubalance i tarmmiljøet, og yoghurt indeholder en masse bakterier, blandt andet bakterieslægten *Lactobacillus*, som har en lang historie som probiotika. Disse ”gode” bakterier kan ved tarmproblemer være med til at genetablere mikrobiomet og dermed skabe mindre ubehag. Probiotika har mange fordele, herunder regulering af immunfunktionen samt forbedring af tarmbarrierens integritet og enzymdannelse.

Præbiotika stimulerer selektivt gavnlig vækst af værtens mikroorganismer og medvirker derfor til et bedre tarmmiljø. Strukturelt er præbiotika ofte kulhydrater, da de kan fungere som næringsstoffer for bakterierne. Kulhydraterne er som oftest komplekse og kan ikke nedbrydes af kroppen selv. Præbiotikas effekter inkluderer beskyttelse mod patogener, øget mineraloptagelse og forbedret stofskifte⁴.

Udvalgte forskningsresultater i tarmmikrobiomet

- Hjernen og tarmmikrobiomet kommunikerer, gennem både det immune-, endokrine og neurale system⁵.
- Børn født vaginalt modsat kejsersnit har anderledes tarmmikrobiomer helt op til 7-årsalderen, hvilket kan resultere i livsstilssygdomme¹.
- Udvikling af diabetes type 1 påvirkes af lav diversitet i tarmen, hvor specifikke bakteriegrupper kan have særlig stor indflydelse⁶.

Bakterier

Bakterier er prokaryote celler, modsat mennesker og planter, der er eukaryote. Prokaryote celler afskille sig fra eukaryote på en række punkter, men I kan huske det på, at prokaryote celler ikke har en cellekerne og DNA'et derfor ligger frit i cellen.

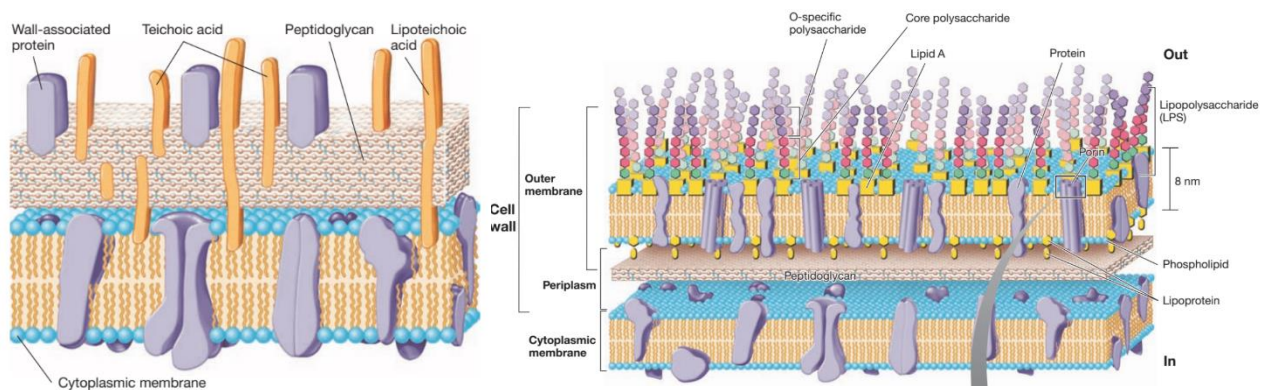
Selvom bakterier kan være meget forskellige, har de samme grundlæggende struktur. Rundt om cellen findes cellemembranen, der adskiller cellens indhold fra det omkringliggende miljø. Cellemembranen er med til at regulere, hvad der kommer ind og ud af cellen. Inde i cellen er cytoplasmaet, der består primært af en flydende komponent, som vi kalder cytosol, og dernæst uopløselige cellekomponenter, som f.eks. ribosomer. Ribosomerne består både af ribosomalt RNA (rRNA) og proteiner og det er disse små biologiske maskiner, der er ansvarlige for proteinsyntesen. Det er altså her, der bliver lavet proteiner ud fra messenger RNA (mRNA), det vi i daglig tale bare kalder RNA.

Udenom cellemembranen findes cellevæggen, som både beskytter cellen og er med til at bestemme dens form. Cellevæggen er opbygget af lange kæder af en bestemt type sukker, peptidoglycan. Derfor kaldes cellemembranen også peptidoglycanlaget. Nogle bakterier har endnu en cellemembran udenom cellevæggen.

Gram-positive og Gram-negative bakterier

For at identificere og klassificere bakterier inddeles de ofte kategorier. Man kan f.eks. inddele bakterier i Gram-positive og Gram-negative, afhængigt af antallet af cellemembraner cellen har. Dette kan påvises ved Gram-farvning. Farveskiftet hos de Gram-positive bakterier (se figur 2a) sker når pigmentet som benyttes til Gram-farvning, binder til peptidoglycan molekyler i cellevæggen. Eksempler på Gram-positive bakterier inkluderer bl.a. slægterne *Staphylococcus* og *Listeria*.

Gram-negative bakterier (figur 2b) kontratfarves, da deres cellevæg er omkredset af *endnu en* cellemembran, som pigmentet ikke kan trænge igennem. *E. coli* er en Gram-negativ bakterie. Enkelte bakterier, som fx *Mycobacterium tuberculosis* og *Mycobacterium leprae*, kan ikke klassificeres korrekt ved Gram-farvning og kaldes derfor Gram-variable.



Figur 2: Fra venstre: a. Grampositiv cellemembran b. Gramnegativ cellemembran.

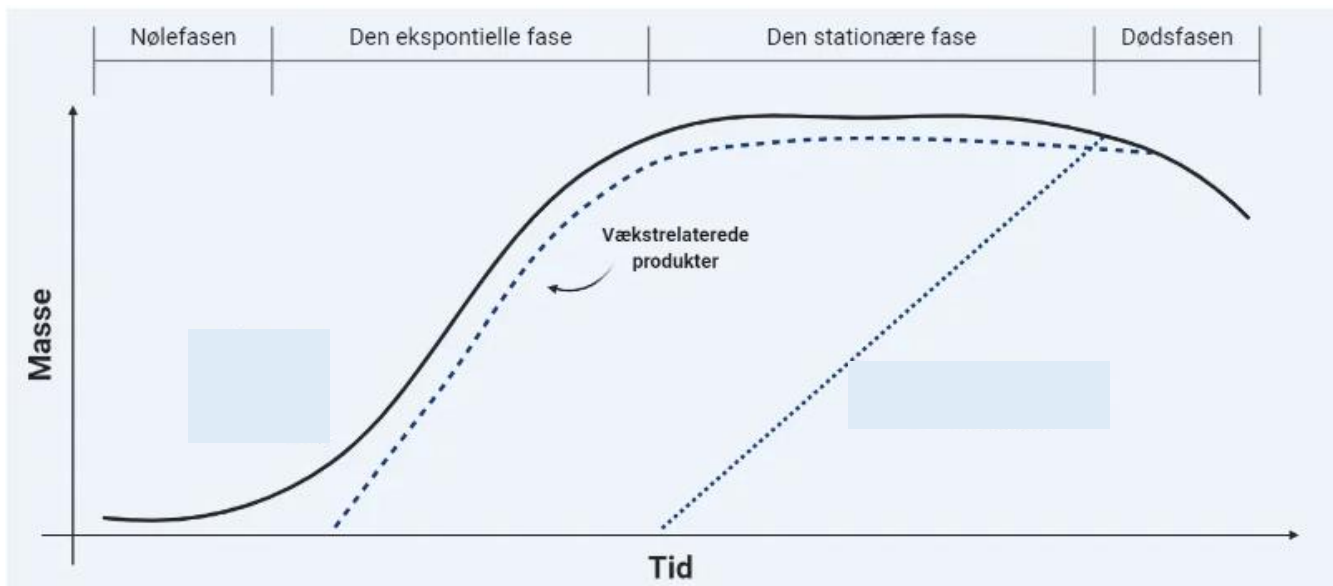
Anaerobe og aerobe bakterier

I forrige afsnit blev bakterierne kategoriseret efter deres reaktion på Gramfarvning. I dette afsnit inddeles der efter en specifik vækstbetingelse, nemlig ilt. Aerobe bakterier findes ved næsten alt omkring os, da de lever i miljøer med ilt, mens de anaerobe bakterier lever steder uden ilt, f.eks. i tarmen. Tarmen inddeles i sektioner - oralt til analt og iltindholdet svækkes jo længere man kommer ned i systemet.

Hvis du har dyrket bakterier i løbet af din gymnasietid, er det sandsynligvis aerobe organismer. De dyrkes nemlig nemt, mens anaerobe bakterier kræver særlige væstkamre uden ilt. Hvis du vil lære mere om disse kamre, kan du se denne video: <https://bit.ly/3a070Yh>

Bakteriedyrkning

Mikroorganismers vækst følger vækstmodellen (se figur 3). I vækstmodellen inddeles væksten i de følgende fire faser: nølefasen, den eksponentielle fase, den stationære fase og dødsfasen.



Figur 3 Bakterievækstkurven.

I **nølefasen** (kaldes også lagfasen) er cellerne lige blevet overført fra et brugt vækstmedie til et friskt, og de skal derfor vænne sig til de nye vækstbetingelser. Mikroorganismene omstrukturerer deres stofskifte, og de begynder at lave cellekomponenter forbundet med vækst. Mikroorganismene kan vokse i cellestørrelse, men de vil næsten endnu ikke dele sig. Antallet af mikroorganismer vil dermed være nogenlunde konstant. Nølefasen kan vare kortere eller længere tid, afhængigt af cellernes tidligere vækstbetingelser.

I **den eksponentielle fase** har cellerne vænnet sig til vækstbetingelserne, og de kan formere sig ved celledeling. Fordi én celle deler sig i to, er antallet af mikroorganismer eksponentielt stigende.

For eksempel har mikroorganismer som bakterien *Escherichia coli* en generationstid (hvor lang tid det tager at fordoble celleantallet) på 20 minutter, mens gærsvampen *Saccharomyces cerevisiae* har en generationstid på 90 minutter; andre typer af organismer som dyre- og planteceller har derimod generationstider på adskillige timer eller sågar døgn.

I **den stationære fase** er cellepopulationen ikke længere i vækst. Det kan enten skyldes, (1) at mikroorganismene har opbrugt næringsstofferne; (2) at der har ophobet sig affaldsstoffer i vækstmediet, som dræber mikroorganismene eller hæmmer deres vækst; eller (3) at der simpelthen ikke er plads tilbage for mikroorganismene til at dele sig yderligere. Der sker igen en omstrukturering af stofskiftet i mikro-

organismerne, men de begynder nu at lave cellekomponenter forbundet med overlevelse og stress. Antallet af mikroorganismer vil dermed være konstant, fordi antallet af nydannede celler er nogenlunde lig antallet af døende celler. Nogle af de mikroorganismer, der dør, vil sprænges ved cellelysering, hvormed deres nedbrydningsstoffer kan udnyttes som næringsstoffer af andre mikroorganismer, der på den måde stadig kan vokse.

I **dødsfasen** har cellerne ikke længere gode nok vækstbetingelser til at kunne opretholde de nødvendige livsprocesser. Det kan være mangel på næringsstoffer eller ophobning af affaldsstoffer, som dræber mikroorganismerne. Fordi antallet af døende celler overstiger antallet af nydannede celler, er antallet af mikroorganismer i populationen aftagende. Typisk er dødsraten i dødsfasen væsentligt lavere end vækstraten i den eksponentielle fase.

Vækstmedie

For at få vores bakterier til at gro, bliver vi nødt til at give dem de rigtige forhold. Bakterierne har brug for organiske stoffer, mineraler og salt for at kunne vokse. Hvis man blander alle disse stoffer i de rigtige proportioner, har man lavet et vækstmedie. Der findes en del forskellige vækstmedier, og indholdet afhænger af, hvilke organismer man vil gro.

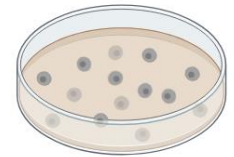
Det medie, som vi vil benytte os af, er **LB-medie** (kort for Lysogeny Broth medie), da det er et simpelt og effektivt medie. For at lave 1 liter LB-medie skal man blande 10g/L tryptone, 5g/L gærekstrakt og 10g/L natriumklorid i 1 liter vand. Tryptonen er en blanding af peptider (proteiner), som er bakteriernes kilde til aminosyrer. Gærekstrakt består af lyserede gærceller, det vil sige, at cellevæggen er fjernet. Dette er bakteriens kilde til sukker, mineraler og anden næring. Natriumklorid er normalt køkkensalt, som celler også har brug for.

Udover flydende medie baseret på vand kan man også lave et solidt medie, som man støber i petriskåle. Et solidt medie er stadig baseret på LB mediet, men udover tryptone, gærekstrakt og natriumklorid tilføjer man også 15g/L agar. Agar er en smagløs hvid substans, der kommer fra røde algers cellevægge. Agar smelter og bliver flydende ved 85°C og bliver solid igen ved 32-40°C. Disse karakteristika gør, at agar er optimalt at bruge til et solidt medie.

Agarplader er et andet navn for petriskåle, der indeholder et solidt medie baseret på agar. Agarplader bliver primært brugt til at sprede cellerne ud på en overflade. Celler, der bliver spredt ud på en agarplade og får lov til at gro, er lette at identificere, da de bliver synlige, som små farvede prikker (også kaldet **kolonier**). Hver koloni er et resultat af mange millioner af celler, der befinder sig på samme sted (figur 4). Det er vigtigt at kunne sprede cellerne ordentligt ud på en agarplade for at kunne tælle de resulterende kolonier.



Agar plade uden kolonier



Agar plade med kolonier
Figur 4 Agarplader, figur lavet med Biorender

Selektion af bakterier

Vælger man et godt medie kan de fleste bakterier gro. Dog kan det være fordelagtigt at selektere for specifikke bakterier. Man kan i store træk anvende to metoder på en agarplade.

1. Der indsættes en **selektionsmarkør** i sin bakterie, det kan f.eks. være antibiotikaresistens, hvilket betyder, at hvis man udplader denne bakterie på en plade med antibiotika, vil den gro, mens ikke-resistente mikroorganismer vil blive hæmmet af antibiotikaen. En selektionsmarkør kan også være en farve, hvorved ens bakterie på den måde adskiller sig fra de andre. Kort sagt hjælper en selektionsmarkør os altså med at vælge (eller selektere) de mikroorganismer, vi leder efter, ved at ændre på organismen.
2. Agaren er selektiv. Her er det kun muligt for en specifik gruppe mikroorganismer at gro, da petriskålens vækstmedie har et særligt fordelagtigt næringsindhold til denne bakteriegruppe, mens det hæmmer andre. Metode nr. anvender dermed mikroorganismens ydre miljø til at selektere.

Når vi går i laboratoriet, anvender vi metode nr. 2. Vi vil her forsøge at gro *Lactobacillus* fra yoghurt.

Det genetiske udtryk

For at kunne forstå teorien bag syntesebiologi skal du have en fundamental forståelse for DNA, RNA og proteiner. Disse tre komponenter vil nemlig være inkorporeret overalt i teorikompendiets mange emner.

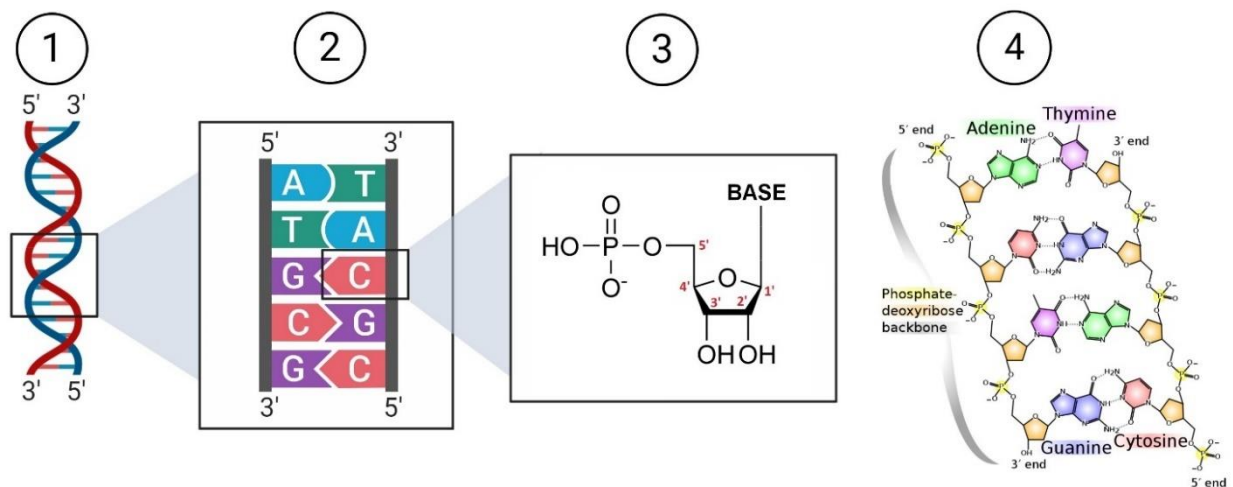
DNA – Livets molekyle

DNA er et molekyle, der bærer genetiske instruktioner til udvikling, funktion, vækst og reproduktion af alle kendte organismer og mange vira. DNA står for deoxyribonukleinsyre og består oftest af to DNA-streng. Hver DNA-streng består af en masse **nukleotider**, der er kovalent bundet sammen. Et nukleotid

består af en fosfatgruppe, et pentosesuktermolekyle (deoxyribose) samt en nitrogenholdig base. I DNA findes der fire forskellige baser; **cytosin** (C), **guanin** (G), **adenin** (A) og **thymin** (T) (se figur 5).

Grundet DNA-strengens opbygning, har DNA-strengen også en retning. Det vil sige, at DNA-strengen har to ender, der adskiller sig fra hinanden. Disse to ender kaldes for henholdsvis **5'-enden** og **3'-enden** (se figur 5.4). 5'-enden bliver ofte beskrevet som DNA-strengens begyndelse, hvor det første nukleotid har en fosfatgruppen, som stikker ud fra sukkerets 5. carbon atom. I modsætning til 5' –enden bliver 3'-enden kaldt for DNA-strengens afslutning. Her har det sidste nukleotid i DNA-strengen en hydroxylgruppe (–OH-gruppe) fra sukkerets 3. carbon atom, der bliver eksponeret (figur 5.3). Når nye nukleotider skal tilføjes til DNA-strengen, vil det nye nukleotid danne en binding mellem dens 5'-fosfat til DNA-strengens 3'-hydroxylgruppe. Dermed vokser strengen fra sin 5'-ende mod sin 3'-ende.

De to DNA-strenger er snoet omkring hinanden og danner en struktur, der minder om en snoet stige. Denne struktur kaldes for en **dobbelthelix**. På ydersiden af dobbelthelixa sidder DNA-strengenes fosfatgrupper og suktermolekyler. Dette kaldes også for DNA'ets **backbone**. De fire forskellige typer baser findes på indersiden af helixen. De sørger for, at de to kæder sidder sammen, da baserne danner par med hinanden via hydrogenbindinger (figur 5.2, 5.4).



Figur 5 DNA's opbygning (1) Dobbel strengtet DNA helix der er opbygget af (2) komplementære nukleobaser. (3) Nukleobaser består af en sukkerdel en fosfor del og en nitrogenholdig base. Der er 5 carbon atomer i vores sukker, navngivet 1'-5', det er ud fra disse carbon atomer, vi navngiver enderne på vores DNA-kæde. (4) DNA's kemiske opbygning med nukleobaser, sukker og den negativt ladet fosfor samt DNA's 5' og 3' ender. Hentet fra Wikipedia (Madeleine Price Ball).

De fire forskellige baser laver en specifik pardannelse med hinanden. Cytosin (C) danner par med guanin (G), og adenin (A) danner par med thymin (T) (figur 5.2). De to DNA-strengene i dobbelthelixen løber i modsatte retninger. Det betyder, at 5'-enden af en streng er parret med 3'-enden af dens matchende streng. Man siger, at DNA-strengene er **antiparallele** (figur 5.2, 5.4).

RNA – Det alsidige molekyle

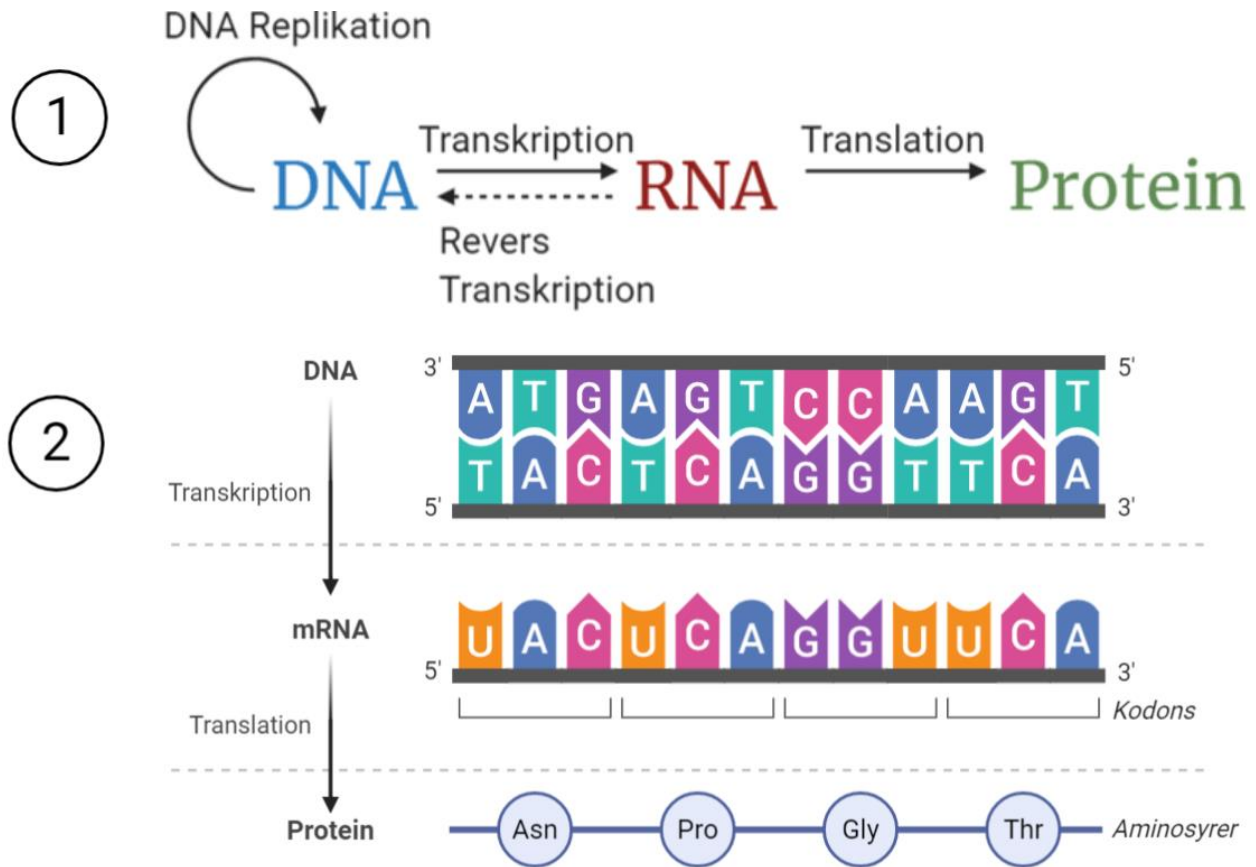
RNA består, ligesom DNA, af en kæde af nukleotider og har utrolig mange forskellige funktioner i cellen. I modsætning til DNA, er RNA enkeltstrengt og har små ændringer i sin sukkergruppe. En anden vigtig forskel mellem DNA og RNA er, at en af de fire nitrogenholdige baser i RNA er anderledes. Her erstattes basen thymin (T) med basen uracil (U). Der er mange forskellige typer RNA, herunder messenger RNA (mRNA), ribosomalt RNA (rRNA) og transfer-RNA (tRNA) samt primere. Disse fire typer vil blive introduceret undervejs i teorikompediet.

Proteiner – Cellens håndlangere

I én enkelt celle er der et utal af forskellige proteiner. Proteiner er opbygget af én eller flere kæder af **amino-syrer**. Disse aminosyrekæder kaldes for **polypeptider**. Der er 20 forskellige slags aminosyrer, der kan bruges til at lave et protein, og hver aminosyre har forskellig struktur og kemisk adfærd. Antallet af aminosyrer på polypeptidet varierer fra protein til protein. Antallet af polypeptider, som et protein er opbygget af, varierer også. Proteiner kommer derfor i rigtig mange forskellige størrelser, former og typer, og hvert enkelt protein har et specifikt formål. Tilsammen er de livsnødvendige for cellens – og derfor organismens - overlevelse.

Proteinsyntesen

I 1956 opdagede Francis Crick en af de vigtigste koncepter i molekylærbiologiens historie, der blev betegnet '**Det Centrale Dogme**'. Det Centrale Dogme beskriver strømmen af genetisk information inde i en celle. DNA koder for RNA via transskription, og RNA koder for protein via translation (figur 6). DNA kan desuden kopieres og videregive sin genetiske information til en ny celle via replikation. Man har aldrig i naturen observeret en strøm af genetisk information fra protein til protein, eller fra protein til RNA, eller fra protein til DNA. Med andre ord kan man sige, at når den genetiske information er videregivet til proteinniveau, så er den genetiske information fastlåst, og aminosyresekvenserne kan dermed ikke blive videregivet mellem generationerne.



Figur 6 Det centrale dogme.

DNA Replikation i bakterier

Under en celledeling skal en celle kopiere sit DNA, gennem DNA replikation. Det kopierede DNA separeres derefter i to datterceller, der arver den samme genetiske information som modercellen. DNA-replikation er **semikonservativ**, hvilket betyder, at hver streng i en DNA-dobbelthelix fungerer som en skabelon til syntesen af en ny, komplementær streng. Det vil sige, at efter DNA-replikationen er færdig, er der to DNA-kopier, hvor hver dobbelthelix har en "gammel DNA-streng" og en helt ny DNA-streng. Da mikroorganismer er nødt til at kunne kopiere deres DNA meget hurtigt og med meget få fejl, gør de brug af forskellige proteiner, der arbejder sammen for at sikre, at DNA-replikation udføres så nøjagtigt som muligt ⁷.

Før DNA'et kan blive kopieret, skal de to DNA-strengene adskilles fra hinanden. For at gøre dette, bruges specifikke enzymer kaldet **DNA-helikaser**. DNA-helikaser binder til et kort segment i DNA'et, hvor de derefter adskiller de to DNA-strengene fra hinanden og danner to Y-formede strukturer, der kaldes for

replikationsgafler (figur 7). Disse to replikationsgafler udgør tilsammen et kompleks, der kaldes for en **replikationsboble**. Segmentet kaldes for **"Origin of replication" (ORI)**, og her starter syntesen af ny DNA. *E. coli* har, som de fleste bakterier, en enkelt ORI-sekvens på dets kromosom (se figur 7). Denne sekvens har for det meste A / T-basepar (som holdes sammen af færre hydrogenbindinger end G / C-basepar), hvilket gør DNA-strengene lettere at adskille. For at sikre, at de to adskilte strenge ikke genforenes, binder der sig en masse strukturstabiliserende proteiner til både de enkeltstrengede DNA-regioner i replikationsboblen og de dobbeltstrengede DNA-regioner udenfor replikationsboblen.

Når DNA-helikasen har adskilt de to DNA-strengene fra hinanden, og replikationsgaflerne er dannet, er DNA'et klar til at blive kopieret. Syntetiseringen af den nye DNA-streng bliver hovedsageligt af specifikke enzymer kaldet **DNA-polymeraser**. Disse enzymer tilføjer nukleotider en ad gangen til den voksende DNA-kæde. Dette gør DNA-polymerasen ved at bruge den ene DNA-streng som skabelon til at inkorporerer de nukleotider, der komplementerer skabelonen. Disse nukleotider bliver altid tilføjet til 3'-enden af DNA-strengen.

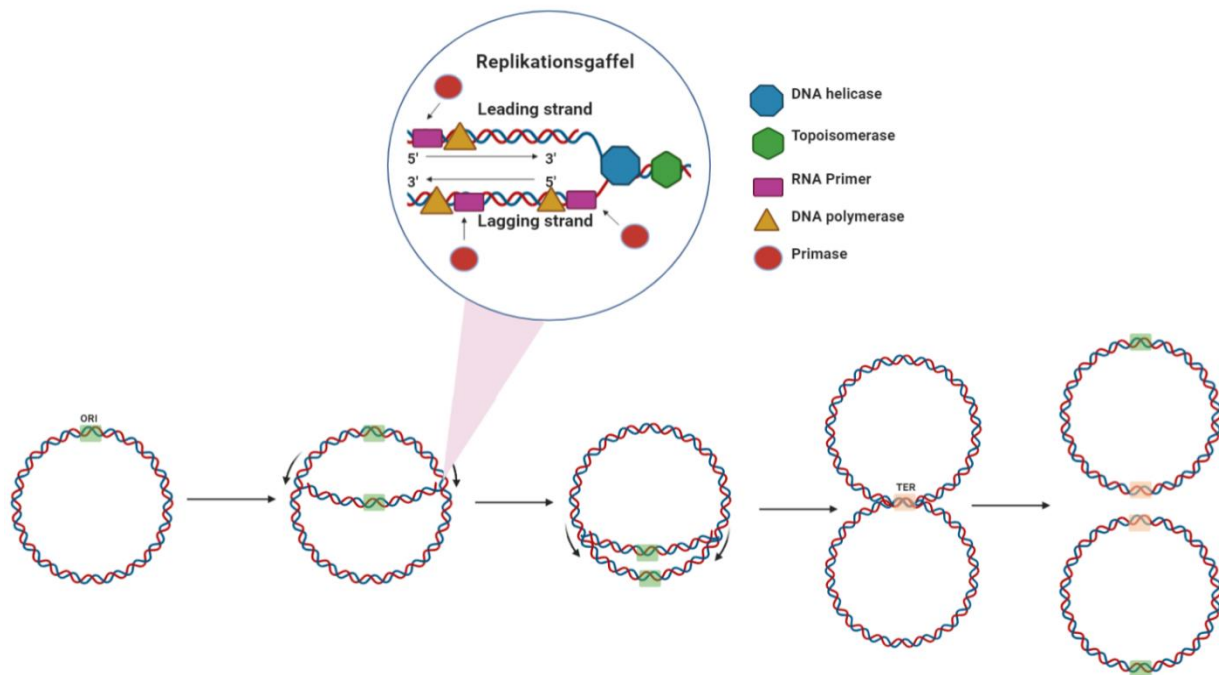
Men DNA-polymeraser kan ikke starte en ny DNA-kæde fra bunden. De kan kun binde nye nukleotider til en forudgående eksisterende streng. Der er brug for en **primer**, som er et kort stykke RNA, der bliver sammensat af et enzym kaldet **primase**. Primere er komplementære til en specifik DNA sekvens og sætter sig på DNA'et, så DNA-polymerasen har et sted at starte. Senere udskiftes primeren med DNA, og DNA-polymerasen kan herefter overtage DNA- syntesen (figur 7).

Det er vigtigt at pointere, at DNA-polymeraser kun kan syntetisere DNA i 5' til 3' retning, og dette skaber et problem under replikation, da dobbeltstrengt DNA, som tidligere nævnt, altid er antiparallel. Det vil sige, at den ene streng løber i 5' til 3' retningen, mens den anden løber i 3' til 5' retningen.

Den nye streng, der kører fra 5' til 3' mod replikationsgaflen, er den lette. Denne streng fremstilles kontinuerligt, fordi DNA-polymerasen bevæger sig i samme retning som replikationsgaflen. Denne kontinuerligt syntetiserede streng kaldes for **leading strand**. Den anden nye streng, der løber fra 5' til 3' væk fra replikationsgaflen, er vanskeligere (figur 7). Denne streng bliver lavet i fragmenter, fordi DNA-polymerasen bevæger sig væk fra replikationsgaflen. Det betyder, at DNA polymerasen skal genmonteres på det nyligt eksponerede DNA, som replikationsgaflen har efterladt sig. Denne vanskelige streng, der er lavet i fragmenter, kaldes for **lagging strand** (figur 7). De små fragmenter kaldes for **Okazaki-fragmenter**.

Leading strand kan syntetiseres ud fra én enkelt primer, hvorimod lagging strand har brug for en ny primer til hvert Okazaki-fragment.

Afslutning af DNA-replikation forekommer, når to modsat orienterede replikationsgaffler mødes og smelter sammen for at skabe to separate og komplette dobbeltstrengede DNA-molekyler. (figur 7).



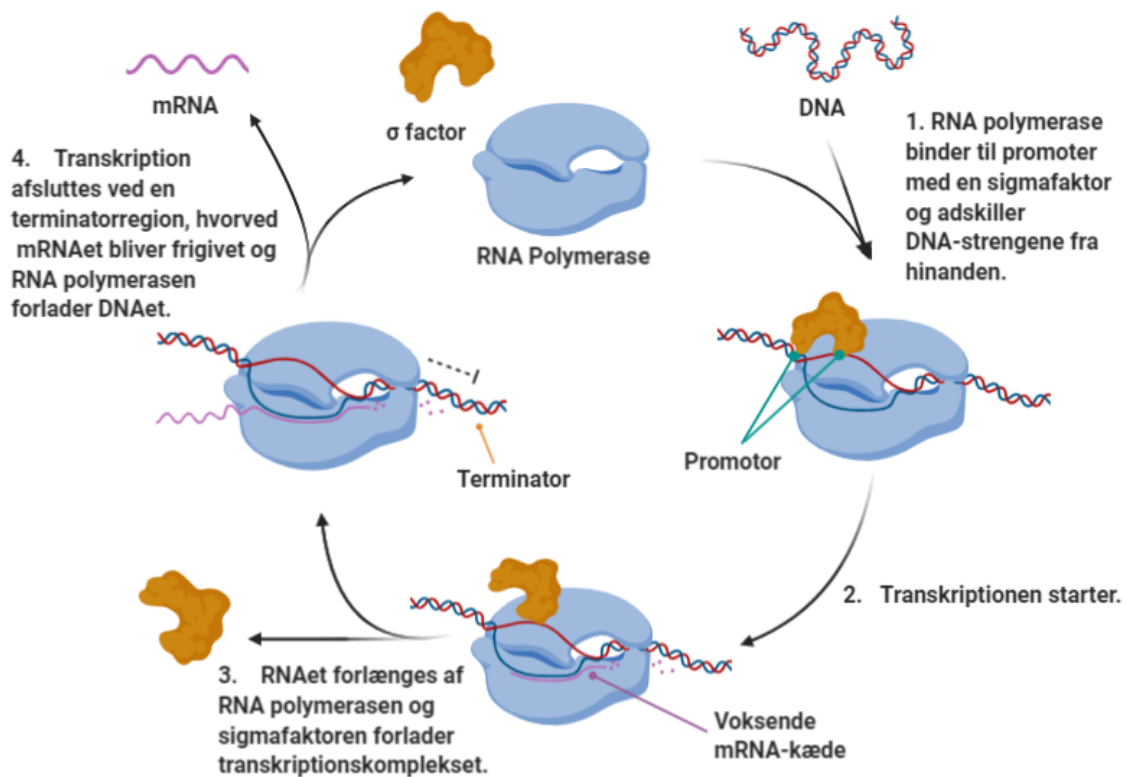
Figur 7 DNA-replikation af et kromosom. Replikationsgafflen indeholder både DNA'ets Leading- og lagging strand. På lagging strand syntetiserer primasen en masse primere. På leading strand er der kun brug for én enkelt primer. DNA-helikasen er ansvarlig for at separere de to DNA-streng, og topoisomerase hjælper med at stabilisere DNA'et, når det bliver "lynet op" af helikasen. DNA-polymerasen sørger for at syntetisere den anden streng ved hjælp af primerne fra primasen. Replikationen starter i ORI.

Transskription: Fra DNA til RNA

Ordet **transskription** beskriver en proces, hvori oplysninger skrives over. I biologiens verden beskriver transskription en proces, hvor en gensekvens bliver kopieret og oversat til den korresponderende RNA-kode. Transskription er det første led i at få et gen udtryk. Information kodet i genet bruges til at konstruere et funktionelt produkt, såsom et protein. For et proteinkodende gen bærer RNA-kopien den information, der er nødvendig for at opbygge et polypeptid, der senere folder sig til et funktionelt protein. Transskription af et gen foregår i tre trin: 1. Initiering, 2. Elongering og 3. Terminering (se figur 8). De færreste gener bliver transskriberet konstant. Cellerne regulerer i stedet omhyggeligt transskription af hvert gen individuelt eller for en lille klynge af gener, der bliver transskriberet samtidig.

Initiering

Når cellen gerne vil transskribere et gen, binder **RNA-polymerase** til en sekvens på DNA'et, der kaldes for en **promotor**. Denne sekvens findes lidt før genets begyndelse. Hvert gen har sin egen promotor. Når RNA polymerasen binder til promotoren, adskiller RNA-polymerase DNA-strengene, hvilket blotlægger den enkeltstrengede DNA-skabelon, der er nødvendig for transskription. For at de rette gener transskriberes er det derfor yderst vigtigt at RNA-polymerasen binder til den rette promotor. Dette gøres ved hjælp af et protein, der kaldes for en **sigmafaktor (σ -faktor)**. Dette protein muliggør specifik binding af RNA-polymerase til promotoren. Den specifikke σ -faktor, der bruges til at initiere transskription af et givet gen, vil variere afhængigt af genet og af de miljømæssige signaler, der er nødvendige for at starte transskription af dette gen. Den valgte promotor for RNA-polymerasen afhænger altså af den associerede σ -faktor (figur 8.1).



Figur 8 Transskriptionen af DNA til RNA udføres af enzymet RNA-polymerase, der binder til en specifik promotorregion på DNA'et, med hjælp fra en specifik sigma-faktor. Polymerasen er derefter i stand til at initiere transskription ved at åbne det spiralformede DNA, hvilket tillader at det enkeltstrengede DNA kan fungere som en skabelon. Efter inkorporering af de første få nukleotider begynder enzymets affinitet at falde, indtil sigma-faktoren frigøres fra komplekset. Transskriptionen fortsætter indtil den når en terminatorregion, hvorefter mRNA'et bliver frigivet og RNA polymerasen kobler sig fra DNA'et.

Elongering

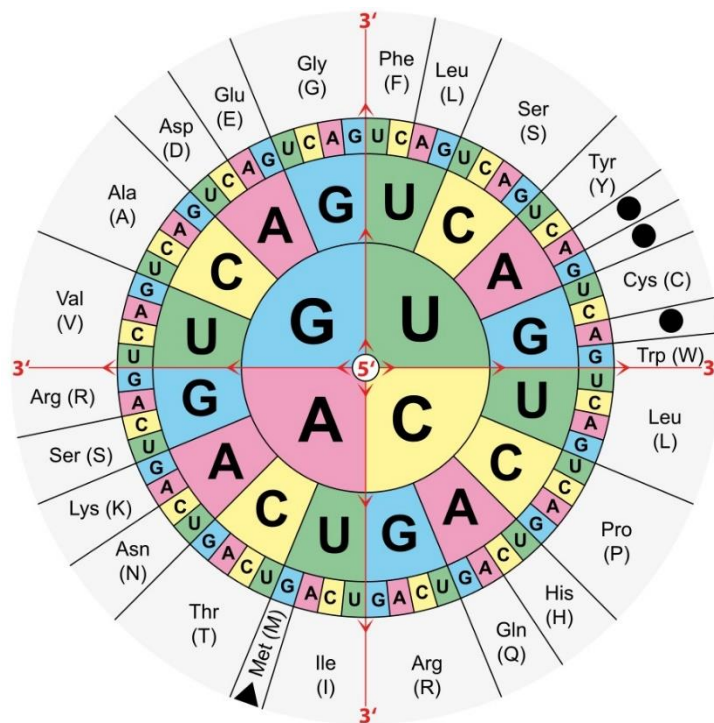
Når RNA-polymerasen har bundet sig til promotoren sammen med σ -faktoren, bliver DNA-skabelonens sekvens herefter læst én base ad gangen (figur 8.2). Samtidig med at baserne bliver læst, bygger RNA-polymerasen en RNA-streng med komplementerende baser. Denne RNA-streng vokser i 5' \rightarrow 3' - retningen. RNA-strengen bærer præcis den samme sekvens, som den DNA-streng, der ikke bruges som DNA-skabelon. Den resulterende RNA-streng indeholder blot basen uracil (U) i stedet for thymin (T). Efter de første par baser er lavet på den voksende RNA-streng dissocierer σ -faktoren sig fra **transskriptionskomplekset**, og RNA polymerasen fortsætter syntetiseringen af RNA-strengen på egen hånd (figur 8.3).

Terminering

RNA-polymerasen fortsætter transskriptionen, indtil den møder en sekvens på DNA'et, der får den til at stoppe. Dette sker, når RNA polymerasen transskriberer en DNA-sekvens, der kaldes for en **terminator**. Når RNA-polymerasen møder en terminator, stopper RNA-polymerasen transskriptionen og RNA polymerasen falder af DNA-strengen (figur 8.4). Et RNA-produkt, der er klar til at blive oversat af ribosomet, kaldes et **messenger RNA (mRNA)**. I bakterier er den nye mRNA-streng klar til at blive oversat lige efter transskription. Translationen af mRNA'et kan faktisk starte, mens transskription stadig foregår, og mange ribosomer er ofte knyttet til mRNA-strengen, mens den bliver syntetiseret, dette kaldes et polysom.

Translation: Fra mRNA til polypeptid

Ved translation bliver informationerne, der er gemt i mRNA'et, brugt til at opbygge et polypeptid, der kaldes for et ribosom. mRNA indeholder instruktionerne til opbygningen af et polypeptid, læst i grupper af tre RNA-nukleotider (adenin (A), uracil (U), cytosin (C) og guanin(G)). Disse grupper kaldes for **kodons** (som også kaldes tripletter). Et enkelt kodon koder for én specifik aminosyre. Et **startkodon**, med sekvensen AUG, koder for aminosyren methionin og beskriver, hvor i mRNA-sekvensen translationen skal begynde. Herfra afkodes mRNA-sekvensen kodon for kodon indtil ribosomet møder et **stopkodon** (UAA, UAG og UGA), der markerer translationens afslutning. I forhold til alle andre slags kodons, så koder et stopkodon IKKE for en specifik aminosyre. Det generelle kodon-aminosyre oversættelse betegnes **den genetiske kode** (figur 9).



Figur 9 Den genetiske kode. Figuren viser hvilke aminosyrer, som de forskellige kodons koder for. For at finde ud af, hvilken aminosyre ens kodon repræsenterer, skal man starte fra midten og bevæge sig udad. Man vælger her fra de forskellige nukleotider, der findes i ens kodon. F.eks. hvis man har et kodonet GAG, starter man i det midterste G-felt, hvorefter man går videre til A-feltet og til sidst til det yderste G-felt. Ud fra dette kan man se, at kodon GAG koder for aminosyren Glu (E). Startkodonet er AUG, hvilket også er anvist med en sort pil. Slutkodons er UAA, UAG og UGA. Dette er anvist med sorte prikker. Hentet fra Wikipedia (Robert Kohlmann).

Men hvordan bliver denne oversættelse formidlet af cellen? Cellen formidler translationen primært ved hjælp af transfer RNA og ribosomer.

Transfer RNA (tRNA) forbinder mRNA-kodons til den specifikke aminosyre, som de koder for. På den nederste del af hvert tRNA (figur 10) er der en sekvens på tre nukleotider, der kaldes for et **antikodon**, som kan binde til specifikke mRNA-kodons. Den øverste del af tRNA'et bærer den aminosyre, der er specificeret af det pågældende kodon. Der er derfor mange forskellige typer tRNA. Hver type læser én eller få kodons og bringer herefter den matchende aminosyre.

Ribosomerne er de strukturer, hvori polypeptiderne bliver bygget. De består af protein og **ribosomalt RNA (rRNA)**. Hvert ribosom har to underenheder, en stor og en lille, der samles omkring mRNA'et, der skal oversættes. Ribosomet er udstyret med nogle vigtige domæner, hvor tRNA'et kan finde deres matchende kodons på mRNA-skabelonen og levere deres aminosyrer. Ribosomet fungerer samtidig også som et enzym, der forbinder aminosyrer sammen for at skabe en kæde.

Translationen af RNA til protein, kan inddeles i samme faser som transskriptionen: Initiering, elongering og terminering. De tre faser ses på figur 10.

Initiering

Først samles ribosomet omkring mRNA'et, der skal læses, og det første tRNA binder sig på mRNA-strengen. Dette tRNA bærer aminosyren methionin, der matcher startkodonet AUG. Denne opsætning kaldes for initieringskomplekset. Den allerførste aminosyre methionin sætter sig på ribosomets P-domæne.

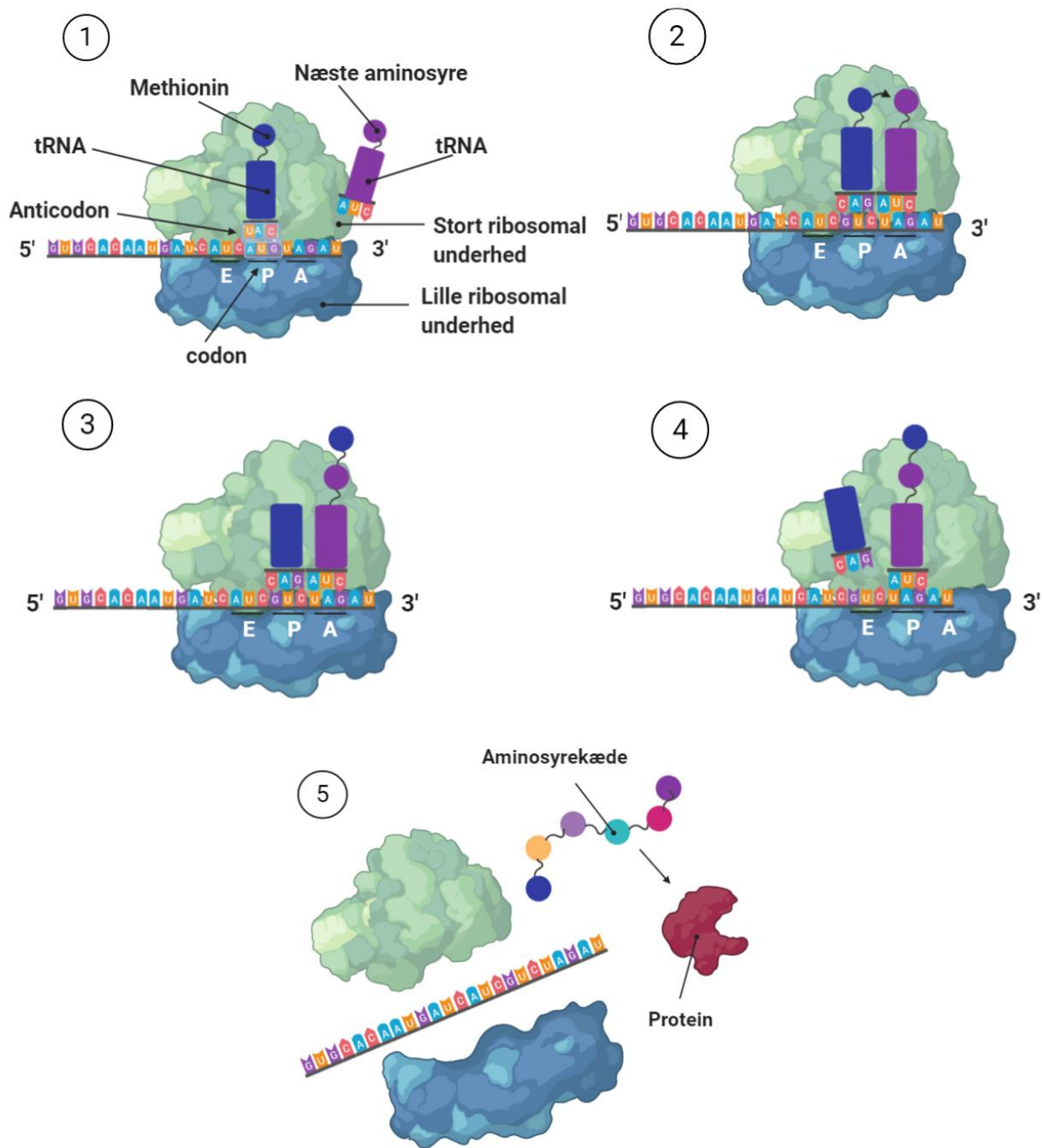
Elongering

Efter initeringskomplekset er dannet, kan aminosyrekæden forlænges. Her oversætter ribosomet et kodon ad gangen, og den korresponderende aminosyre tilføjes til den voksende aminosyrekæde. Hver gang et nyt kodon oversættes, overføres et tRNA med den rette aminosyre til ribosomets A-site. Når tRNA'et lander på A-sitet, vil dette starte en peptidbinding mellem den nye aminosyre og dens nabo i P-sitet (figur 10.3). Herefter mister den naboliggende tRNA sin aminosyre, og dette tRNA flytter over i E-sitet, hvorefter den frigøres. Det tRNA, der nu har en ekstra aminosyre, driver herefter over i P-sitet og tRNA'et er nu klar til at give den voksende kæde videre til det næste tRNA.

Terminering

Under den sidste fase skal det færdige polypeptid frigøres. Polypeptidet bliver frigjort, når et stopkodon bliver oversat af ribosomet. Sekvensen på dette stopkodon kan være UAG, UAA eller UGA. Disse kodonsekvensen udløser en række hændelser, der adskiller polypeptidkæden fra dens tRNA, og den kan herefter løsrive sig fra ribosomet. Translationen er hermed afsluttet. Efter translationens afslutning kan polypeptidet stadig være nødt til at gennemgå forskellige slags modifikationer for at blive foldet til et funktionelt protein. Det skal også ofte sendes til det rigtige sted i cellen eller kombineres med andre polypeptider, før det kan gøre sit job.

Hvis du vil vide mere om molekylærbiologiens centrale dogme, anbefaler vi at du ser videoerne dedikeret til emnet på biostriben: <https://bit.ly/3mupSnh>



Figur 10 Translation. 1: komponenterne der er nødvendige for at translationen af mRNA'en kan gennemføres. tRNA'en identificere de forskellige codons i mRNA'en og tilføjer de rigtige aminosyrer ud fra anticodone. 2: aminosyren der sidder på tRNA'en bliver overført til den næste tRNA der sidder i ribosomets A domæne. 3: Efter overførslen af aminosyren flytter tRNA'erne et domæne længere ned og 4: den tRNA uden aminosyre bliver tabt mens tRNA'en på P domænet er klar til at give den voksende aminosyre kæde videre til den næste tRNA i rækken. 5: Når alt mRNA'en er læst står man tilbage med en aminosyre kæde (polypeptid) der kan folde sig til det færdige protein.

Bioteknologiske metoder

I det følgende afsnit vil du blive præsenteret for de bioteknologiske metoder, som du skal bruge i løbet af campen.

DNA-ekstraktion

Til Biotech Academy Camp 2021 er der blevet opsamlet fæcesprøver fra grise. Fæces er fyldt med DNA, som befinder sig i de enkelte celler. For at kunne analysere, hvilke bakterier der findes i prøverne, og derved undersøge mikrobiomet, skal DNA'et blotlægges. På campen anvender vi et kit fra Qiagen til at ekstrahere DNA. De præfabrikerede kits er en meget simpel metode, der giver kvalitetsresultater, som professionelle forskningslaboratorier også bruger.

Princippet bag DNA-ekstraktionen består i (1) lysere/ødelægge cellerne i fæcesprøven vha. varme, (2) adsorbere/binde DNA til en silicamembran, (3) udvaske urenheder og (4) eluere DNA fra kolonnen (som kan binde specifikt for DNA). Vi ender dermed med DNA i en buffer, hvori der hverken findes protein, nukleaser eller andre urenheder. Herfra bevares DNA'et bedst ved -20°C . (Qiagen DNA stool handbook, 2012)

Nanodrop

DNA-ekstraktionen frigør DNA'et, men vi har ingen idé om kvaliteten af ekstraktionen. Koncentration og kvalitet bestemmes derfor med et NanoDrop fluorospektrometer, hvor der afpipetteres 1 uL prøve. Maskinen sender lys gennem prøven og registrerer derfra DNA-indholdet. Vi ønsker, at der skal være mellem 75-300 ng/uL DNA i prøven.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase Chain Reaction er en molekylærbiologisk teknik, der bliver brugt til at opformere specifikke DNA-sekvenser. PCR bliver brugt til detektion og identifikation af organismer eller biologisk materiale, der indeholder DNA. PCR bliver også hyppigt brugt som et vigtigt redskab i kloning og genmodificering.

PCR udnytter en af naturens egne enzymer, som spiller en vigtig rolle i det centrale dogme, nemlig DNA-polymerasen. Til PCR bruges DNA-polymerasen til at opformere en specifik DNA-sekvens. PCR gennemgår en række cyklusser, hvor hver DNA-sekvens bliver kopieret én gang per cyklus. Så hvis man starter med 2 ens DNA-streng, vil man efter første cyklus have 4 DNA-streng. Hvis man kører en PCR med 30 cyklusser, ender man ud med $1.073.741.824$ ens streng DNA, hvilket svarer til 2^{30} (figur 11).

Valg af primere - kopiernes start og stop

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. Den streng, enzymet bruger som skabelon, skal altså gå modsat, dvs. fra 3' til 5'. Det betyder, at de to nødvendige primeres sekvenser skal vælges, så den ene baseparrer til startstedet på den ene streng, og så den anden baseparrer til den anden strengs startsted. Da strengene er modsatrettede, ligger det ene startsted altid samme sted som stopstedet på den modsatte streng.

Hvorfor startstedet på én streng samtidig er slutstedet på den anden streng, kan være lidt svært at forstå. Men det skyldes, at de DNA-streng, som dannes i den første cyklus, også vil fungere som skabelon i den næste fordoblingscyklus, men nu for den modsatte streng og retning. Derfor er strengen ikke længere, når DNA-polymerasen kommer frem til det oprindelige startsted - som derfor bliver et stopsted.

Faserne i en PCR-cyklus

Hver cyklus er delt op i tre forskellige faser, der har hver deres temperatur og varighed. De angivne temperaturer varierer efter hvilke primere, der anvendes.

1. Opvarmning (denaturering af DNA)

Det dobbeltstrengede DNA, der skal bruges som skabelon i reaktionen, skal først denatureres ved høj temperatur (ca. 95 °C) nogle sekunder. Dette gør DNA'et enkeltstrengt, så hver streng kan få bygget en ny komplementær streng senere i PCR-cyklussen.

2. Nedkøling (binding af primere til DNA)

Temperaturen sænkes til omkring 60 °C, hvor de tilsatte primere vil kunne binde til startstederne på det enkeltstrengede DNA.

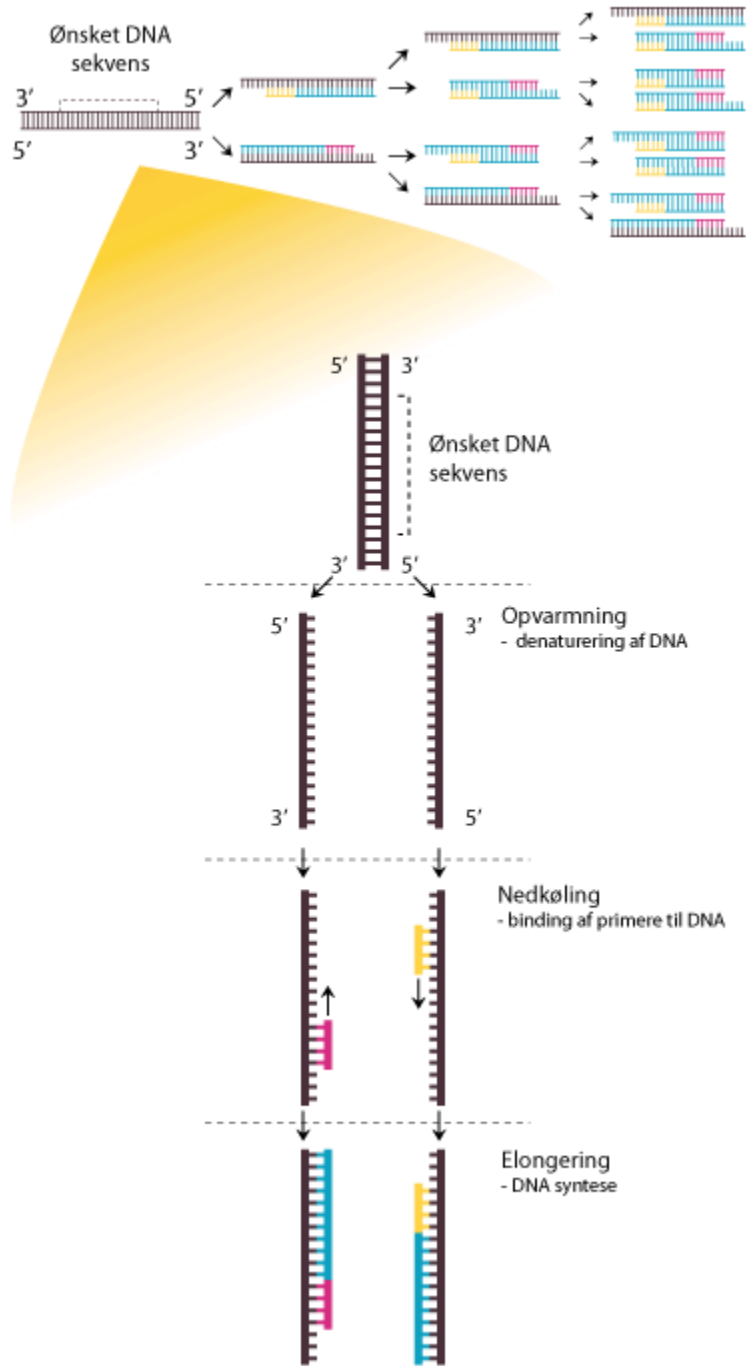
3. Elongering (dannelse af de nye, komplementære DNA-streng)

Temperaturen hæves til 72 °C, hvor DNA-polymerase binder til primerne ved startstederne og bygger videre på de nye, komplementære DNA-streng. DNA-polymerasen fortsætter, så længe temperaturen ikke hæves, og så længe der stadig er skabelon-DNA til rådighed. Varigheden af trinnet beregnes derfor, så cyklussen først genstarter, når hele den interessante DNA-sekvens er forlænget (elongeret).

En PCR med 30 cyklusser varer gerne 2-3 timer.

Hvis du vil vide mere om PCR, anbefaler vi at du ser videoerne dedikeret til emnet på biostriben:

<https://bit.ly/35DMjjP>



Figur 11 Opkopieringen af en specifik DNA-sekvens med PCR.

Gelelektroforese

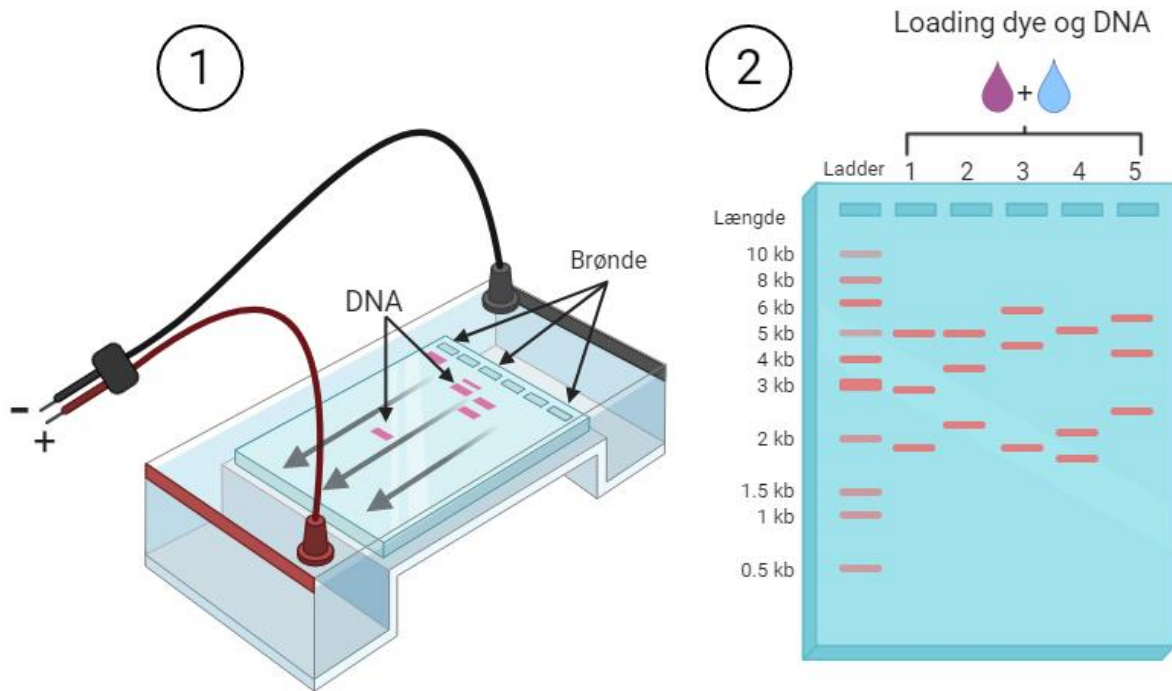
Gelelektroforese er en adskillestetnik, hvorved man kan separere- og identificere forskellige DNA-strengene eller proteiner i en opløsning. Gelelektroforese er et nyttigt redskab, da adskillelsen af DNA kan bruges til at måle antallet af basepar i en DNA prøve eller bekræfte om ens forsøg har resulteret i den korrekte DNA-længde. Efter man har kørt en gelelektroforese, vil man se millioner af DNA-fragmenter, som adskilte lysende bånd i forskellige længder. De korteste DNA strengene vil rejse længst igennem gelen.

Men hvordan separeres DNA'et i gelen? I gelelektroforese udnytter man DNA'ets naturlige negative ladning. Denne negative ladning kommer fra DNA'ets fosfatgrupper, der optræder i hvert nukleotid (figur 12). I en gelelektroforese bliver DNA'et udsat for et elektrisk spændingsfelt, der har en negativ pol og en positiv pol. Da DNA er negativt ladet, vil det blive tiltrukket af den positive pol.

Der skal syv vigtige komponenter, der indgår i at lave en gelelektroforese: DNA, en gel, et elektroforese-kammer med et spændingsfelt, en DNA ladder, en loading dye, en DNA stainer og en buffer.

1. Når man laver en gelelektroforese, støber man først sin gel. En gel består af polysacchariden **agarose**, der er blandet sammen med vores buffer og en **DNA-stainer**, der er vigtigt for at kunne visualisere sine bånd under UV-lys. Gelen bliver først varmet op, og når den efterfølgende er kølet ned, vil agarosen størkne, og blandingen får en geléagtig tekstur. I den størknede gel er der en masse små **porer** (huller), der fungerer ligesom hullerne i en si. Disse huller gør, at bevægelsen gennem gelen bliver sværere for DNA'et, jo længere distancen i gelen er, og jo længere DNA'et er. Det er derfor, at de kortere DNA-strengene vandrer gennem gelen hurtigere end de længere strengene. Forskellen i DNA-strengenes egenskab til at vandre gennem gelen gør at, man kan sortere DNA'et alt efter dets størrelse.
2. Gelen bliver herefter nedsænket i et elektroforesekammer, hvorefter en **bufferopløsning** hældes ned i elektroforesekammeret, så den lige akkurat dækker gelen. Bufferopløsningen er med til at holde pH'en stabil og beskytter gelen mod at udtørre. Ioner i bufferopløsningen er med til at lede strømmen under gelelektroforesen (figur 12.1).
3. De usynlige DNA-fragmenter (fra ens PCR) bliver herefter blandet med en lille smule **loading dye**, der er farvet og indeholder en koncentreret sukkeropløsning. Dette er ofte glycerin. Dette gøres for at visualisere DNA'et.

4. Herefter placerer man sin DNA-prøve i nogle fordybninger (kaldet brønde), der er placeret for enden af sin gel. Glycerinen sørger for, at DNA'et synker lettere til bunds i brøndene. Udover at tilføje DNA'et i sine brønde, tilføjer man også en **DNA ladder** i oftest én eller to af brøndene. DNA ladder er en blanding af DNA-fragmenter i kendte længder (figur 11.2). Da vi kender længden på ladderens DNA-fragmenter, kan vi sammenligne de resulterende bånd fra vores egen DNA-prøve med båndene fra DNA ladderen. Vi får dermed et godt overblik over hvor lange vores egne DNA-fragmenter er.
5. Efter vores DNA-prøve og DNA ladderen er tilføjet til brøndene, starter man sin gelelektroforese ved at tænde for spændingsfeltet. Når man tænder for spændingsfeltet, vil det negativt ladede DNA blive tiltrukket af den positive pol i elektroforesekammeret. Det betyder, at DNA'et vil vandre gennem gelen mod den positive pol.
6. Efter gelelektroforesen er gennemført, kan man ved hjælp af UV-lys se sit DNA som små bånd på gelen (figur 12.2). Grunden til at man bruger UV-lys er, at den tilføjede DNA stain binder sig til DNA'et og lyser op under UV-lys.



Figur 12 Gel elektroforese. (1) Gelen ligger nedsunken i vores bufferopløsning. DNA'et bliver tiltrukket af den positive elektrode og vandrer derfor i pilenes retning gennem gelen. (2) Man tilføjer sin DNA Ladder i den første brønd og sin loading dye og DNA i de resterende brønde. Vi kan herefter se, hvordan DNA-fragmenterne bliver vist efter gelen er kørt ved hjælp af UV-lys. I brønden til venstre er vores DNA ladder, hvor vi kender længderne på dens DNA-fragmenter. Vi kan ud fra DNA-ladder se, hvor lange vores DNA-fragmenter er i prøverne, der er i brøndene navngivet 1-5.

Hvis du vil vide mere om gel elektroforese, anbefaler vi at du ser videoerne dedikeret til emnet på biostriben: <https://bit.ly/3kp39XS>

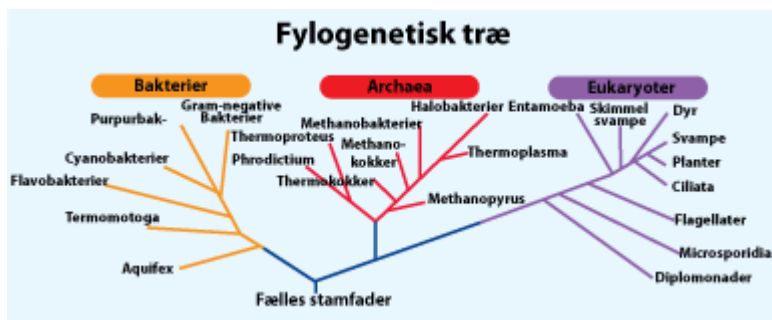
Sekventering og bioinformatik

Fylogeni

Fylogeni er en beskrivelse af evolutionshistorien og slægtsforholdene mellem forskellige organismer.

Et fylogenetisk træ illustrerer disse forhold i et diagram hvor hvert forgreningspunkt i træet angiver en teoretisk fælles "forfader" for enhederne længere ude af grenen.

Protein- eller DNA/RNA-sekvenser er særdeles velegnede til at opstille de evolutionære forhold, idet man ved sammenligning af sekvenserne kan se, hvor nært beslægtede organismer er. Jo længere tid organismerne har udviklet sig hver for sig, jo mere forskellige er de. I figur 13 ses et eksempel på et fylogenetisk træ.



Figur 13 Skitse af et fylogenetisk træ.

Inden man kan sammenligne gener eller proteiner mellem forskellige organismer, er det nødvendigt at kunne identificere dele af molekylerne som oprindeligt har været ens. Dette stiller krav til det gen eller protein, der anvendes. Med udgangspunkt i genet skal det først og fremmest være til stede og have samme funktion i alle organismer, der undersøges. Dette skal sikre at dele af genet er konserveret dvs. uændret på tværs af de forskellige organismer. Derudover er det også nødvendigt, at der er dele af genet, som er stærkt varierende mellem forskellige organismer, således at der kan kendes forskel på to nært beslægtede arter. Kravene til anvendelse af gener i evolutionære studier er opsummeret i det følgende:

Krav til gener for anvendelse i evolutionære studier

- Genet skal være til stede og have samme funktion i alle organismer da en sammenligning ellers ikke er mulig. Det vil sige, at dele af genet skal være konserveret.
- Dele af genets sekvens skal være forskellig fra art til art. Der skal være områder på genet som er stærkt varieret, således at der kan kendes forskel på to nært beslægtede arter.
- Der må ikke være sket overførsel af genet mellem forskellige arter.

Ribosomalt RNA

Gensekvensen for **ribosomalt RNA** (rRNA) er den hyppigst anvendte DNA-sekvens til konstruktion af fylogenetiske træer, da genet opfylder de beskrevne krav (se ovenfor).

rRNA findes i alle levende organismer og (1) har samme funktion i translationsprocessen i alle organismer, (2) har udviklet sig langsomt nok til, at der er konserverede sekvenser i genet samt (3) er hovedelementet i ribosomer og har derfor en stor understøttende rolle i proteinsyntesen.

rRNA findes i store mængder i cellerne, da det sikrer, at organismene kan have mange ribosomer og derved hurtigt danne en masse nye proteiner, f.eks. hvis miljøet ændrer sig. Ribosomet består af fire

rRNA **subunits** samt en masse proteiner. For prokaryoter analyseres især 16S rRNA, som er RNA-delen af den lille subunit/proteindel til ribosomet. Dette gen anvendes, da det har en passende størrelse. Det er relativt hurtigt at sekventere og langt nok (ca. 1550 nukleotider) til at give en pålidelig fylogenetisk analyse.

Man kan sammenligne forskellige sekvenser af 16S rRNA ved hjælp af bioinformatik-programmer. I eukaryoter findes en lignende subunit, som kan **sekventeres** og analyseres. Denne er dog lidt større og betegnes 18S rRNA.

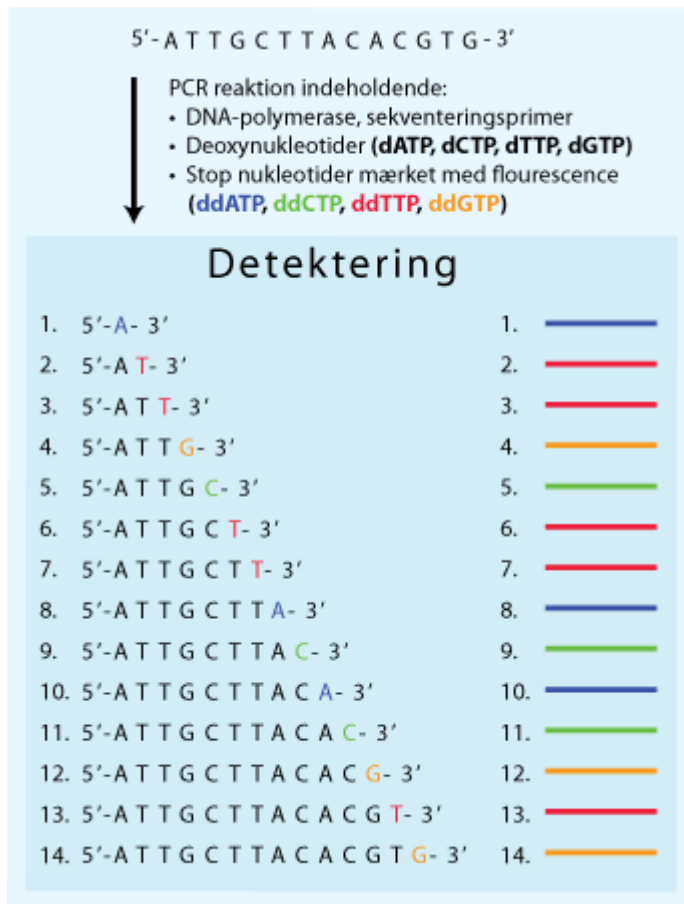
Før man kan sammenligne sekvenser af 16S rRNA fra forskellige organismer, er det naturligvis nødvendigt at sekventere genet. Inden sekventering er det nødvendigt at opformere genet, så man har en masse kopier. Dette gøres ved hjælp af PCR.

Ved at sammenligne 16S rRNA sekvenser kan man adskille organismer på artsniveau og opefter. Det er således ikke muligt at se forskel på to individer inden for samme art ved at analysere de to 16S rRNA sekvenser.

Sekventering

Når man laver en sekventering, ønsker man at finde rækkefølgen af baserne i et stykke ukendt DNA. En DNA-sekvens er netop rækkefølgen af baserne for et bestemt stykke DNA. I følgende afsnit er der fokus på Sanger-sekventering (figur 14).

Ved DNA-sekventering benyttes også en PCR-reaktion, og princippet er det samme som ved opformering af DNA. Der tilsættes DNA-polymerase, primer (dog kun én primer) og nukleotider (dNTP, hvor N står for en nukleobase, dvs. enten A, T, C eller G) samt nogle modificerede nukleotider, som stopper replikationen. Disse stop-nukleotider er di-deoxynukleotider (ddNTP) som er mærket med hver sit fluorescerende stof der kan detekteres. Når PCR-reaktionen er løbet til ende, vil der pga. stopnukleotiderne være opstået DNA-fragmenter med forskellig størrelse. Alle fragmenterne starter det samme sted, nemlig med den primer man har anvendt i reaktionen. Fragmenterne stopper med et ddNTP. der fluorescerer i en farve. Farven angiver hvilket nukleotid der er på den pågældende position. DNA-fragmenterne kan adskilles efter størrelse ved gelektroforese. Fragmenterne vil trænge igennem gelen med forskellig hastighed – de små hurtigst og de store langsomt. Nu kan sekvensen af DNA aflæses, ved at se hvilken farve de enkelte bånd fluorescerer. Det afslører hvilket stopnukleotid der er tale om. I figur 14 vil det DNA-fragment, der trænger hurtigst gennem gelen være mærket med en blå fluorescens, som svarer til basen A, og det kan derfor konkluderes at det første nukleotid i sekvensen er A.



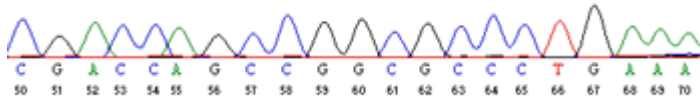
Figur 14 Princippet bag sekventering

Det er ofte robotter, der udfører DNA-sekventering. Detektionen fungerer ved, at der sendes laserstråler mod DNA-fragmenterne, hvilket giver et bestemt udslag af fluorescens. Signalet af fluorescens hørende til et bestemt DNA-fragments stopnukleotid opsamles i et datasæt på en computer.

Et eksempel på et udsnit af sådan datasæt ses i figur 15. De forskellige toppe viser, hvilket nukleotid, der er blevet detekteret i den givne position. Nogle steder kan der opstå tvivl om hvilken base, der er korrekt. Det ses ved overlappende toppe. Grunden til, at der fremkommer to toppe oven i hinanden er at teknikken ikke er perfekt. Det kan f.eks. være svært at adskille meget små fragmenter fra hinanden, og de kan derved blive detekteret samtidigt.

Højden af toppene indikerer hvor stærkt detektionssignalet er. Når der kun er en top til stede, vil det ikke spille nogen rolle. Hvis der derimod fremkommer to toppe, hvor den ene er lav, og den anden er

høj, vil computeren indsætte basen for den højeste top på denne position. Computeren vil i dette tilfælde markere positionen, så det er muligt at se at der er to muligheder for den givne position.

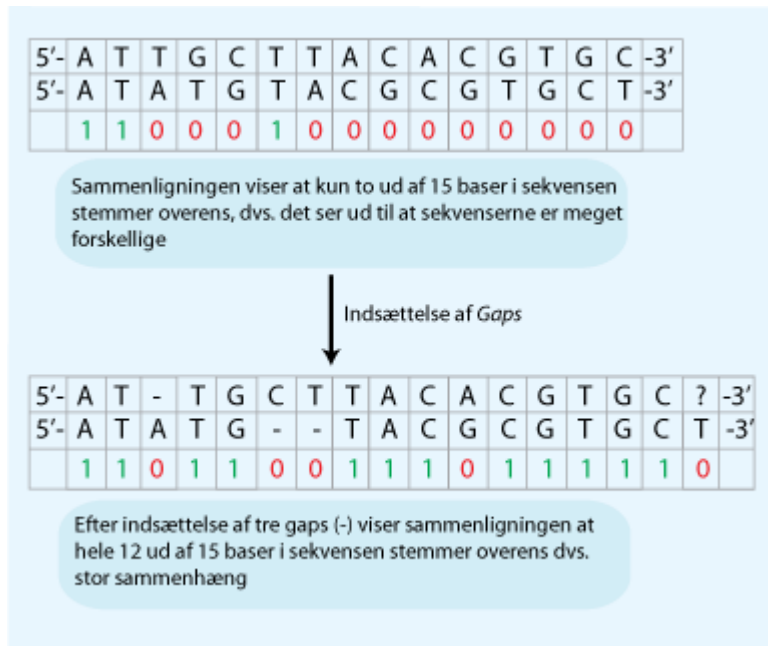


Figur 15 Eksempel på datasæt for DNA-sekventering. Hver base giver et bestemt fluorescens-udslag.

Bioinformatik og sequence alignment

Når DNA er sekventeret, er det muligt at sammenligne med andre DNA-sekvenser ved at sammenholde sekvenserne base for base. Denne sekvenssammenligning kaldes på engelsk for **sequence alignment**.

Hvis sekvenserne ikke er lige lange, eller når der er brug for det, indsættes **gaps** som forlænger et stykke af sekvensen. Hvis de ikke blev indsat, ville to relativt ens molekyler se ud til at være vidt forskellige. Indsættelsen af gaps er illustreret i figur 16 nedenfor. I figur 17 er vist hvordan et sequence alignment output i praksis kan se ud.



Figur 16 Sequence alignment med indsættelse af gaps. Et-tallerne viser når der er overensstemmelse mellem de to sekvenser, mens 0'erne viser at der ikke er overensstemmelse. Efter indsættelse af gaps viser de to sekvenser ret stor lighed.

```

1  ATGTATACACGGCTCTTTTTAAAGATTAAATCAGAATCGTGATTTAAGTGGATTGGAAC 60
   |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
1  ATGTATTACACGGCTCTTTTTAAAGTTTAAATCAGAATCGTGCTTTAAGTGGATTCCAAC 60

61  GAGTTTGTGTCATATTTAATATTTGGCTTCCAAGAAGAGGATCCTAGCAGCCAAAAGGAG 120
   |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
61  GAGTTTGTGTCATATT-AATATTTGGCTTCCA-GAAGAGGATCCTAGCAGCCAAAAGGAG 118

121 TCTTTAATTTTACCAATCTCCGGACCCCAATGGTTAGGAAATCTGAACACCGTTCAGCT 180
   |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
119 TCTTTAATTTTACCAATCTCCGGACCCCAATGGTTAGGAAATCTGAACACCGTTCAGCT 178

181 ATATGTTGTTTGGCTCTTCTAAAAGCCAAATCGGATCAAGTACCAATTGATGAGTAACG 240
   |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
179 ATATGTTGTTTGGCTCTTCTAAAAGCCAAATCGGATCAAGTACCAATTGATGTTGTAACG 238

241 GAGACTATTAACITTTCCCTTTGGCGGTGAGGATTCTCCAGAAGCTTCTGGCATGTGGGTC 300
   |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
239 GAGACTACCAACTTTAACTTTGGCGGTGAGGATTCTCCAGAAGCTTGGGGCATGTGGGTC 298

301 ACGGCCAGCCACGAGGGAATGATGCGCTTCTGGACATCTCATATGGAACCAATTCGAACG 360
   |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
299 ACGGCCAGCCACGAGGGAATGATGCGCTTCTGGACATCTCACTTGAACCAATTCGAACG 358

361 GCATCGTCGGAAAGCATCTGTATGAGTTATGCTTCTTTAATAATGGAAAAGTGCACTCT 420
   |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
359 GCATCGCCGGAAGCATTGTATGAGTTATGCTTCTTTAATAATGGAAAATGCAATCT 418

```

Figur 17 Sequence alignment output. Stregerne angiver hvor der er sammenhæng mellem de to sekvenser.

Når man har at gøre med små DNA-stykker, vil man godt kunne udføre denne sammenligning ved selv at kigge på sekvenserne, men som regel er DNA-sekvenserne så lange, at det er nødvendigt at bruge en computer. For eksempel er DNA-sekvensen for 16S rRNA ca. 1550 nukleotider lang.

Der er udviklet computerprogrammer til at lave disse sekvenssammenligninger, og de kan godt sammenligne mange sekvenser på en gang. Ud over at indsætte gaps er programmerne lavet til at genkende de vigtigste områder på sekvenserne. Disse dele kaldes ankerpositioner. Når sekvenssammenligningerne er gennemført, er det muligt at se, hvor meget sekvenserne hver især ligner hinanden, og derudfra opstille fylogenetiske træer. Hvis to sekvenser er meget ens, skal de ligge tæt ved hinanden på træet.

Kildehenvisninger

1. Yang, I. *et al.* The Infant Microbiome. *Nursing Research* **65**, (2016).
2. Evans, J. M., Morris, L. S. & Marchesi, J. R. The gut microbiome: the role of a virtual organ in the endocrinology of the host. *Journal of Endocrinology* **218**, (2013).
3. *Human Microbiota in Health and Disease*. (Elsevier, 2018). doi:10.1016/C2017-0-01893-1.
4. Sanders, M. E., Merenstein, D. J., Reid, G., Gibson, G. R. & Rastall, R. A. Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* **16**, (2019).

5. Grenham, S., Clarke, G., Cryan, J. F. & Dinan, T. G. Brain?Gut?Microbe Communication in Health and Disease. *Frontiers in Physiology* **2**, (2011).
6. Giongo, A. *et al.* Toward defining the autoimmune microbiome for type 1 diabetes. *The ISME Journal* **5**, (2011).
7. Schaaper, R. M. Base selection, proofreading, and mismatch repair during DNA replication in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 23762–23765 (1993).

Laboratorieintroduktion

Sikkerhed i laboratoriet

Sikkerheden i laboratoriet er til for, at alle kommer sunde og raske hjem fra campen, og for at udstyret skal holde. Gør derfor, som underviserne siger! Følger man ikke sikkerhedsreglerne, kan man ikke være deltager på campen.

1. Læs protokollen grundigt igennem for at se, om der er særlige sikkerhedsforhold, som du skal være opmærksom på.
2. Vask **ALTID** hænder, når du kommer ind i laboratoriet, og når du forlader det.
3. Sprit bordet af før og efter brug (samt ved spild) med 70% Ethanol og papir.
4. Rør ikke ved dit ansigt eller dit hår, når du er i laboratoriet.
5. Løb ikke i laboratoriet, og sid ikke på bordene.
6. Der må **IKKE** indtages mad og drikke i laboratoriet - heller ikke tyggegummi.
7. Kitler hører til i laboratoriet - **IKKE** i undervisningslokalerne, på toiletterne, uden for bygningen etc. Med andre ord: Tag ikke kitlerne ud af laboratoriet.
8. Gør dig bekendt med, hvor der findes brandslukker og øjensskyl.
9. Brug handsker, når det er indikeret i øvelsesvejledningen. Kommer der farlige kemikalier på handskerne, så smid dem ud, vask hænder og tag nye handsker på.
10. Hjælp altid din lab-partner.
11. Der må ikke åbnes vinduer i laboratoriet.
12. Sæt håret op, hvis det er langt, og gem tørklædeender i kitlen, vi vil ikke have hår i forsøgene eller ved åben ild.
13. Smid fast affald fra forsøg i de gule affaldsspande – de er beregnet til affald fra genmodificerede organismer (GMO).
14. Flydende affald fra forsøg (GMO-affald) skal hældes i en beholder til GMO-affald. Disse er placeret ved håndvaskene i laboratoriet.
15. Hvis du bruger kontaktlinser, skal du bære et skilt, der viser det, så de kan fjernes, hvis du får noget i øjnene.
16. Kun lukkede sko må anvendes i laboratoriet. Tasker og overtøj hører ikke til i laboratoriet.
17. Mobiler må gerne være i lommen, men må ikke tages op herfra.
18. Spørg hellere en ekstra gang om hjælp, end at gøre noget du er usikker ved eller i tvivl om, hvordan skal udføres eller udregnes.
19. Spørg en hjælpelærer om en introduktion hver gang i bruger et nyt instrument (spektrofotometer, centrifuge, thermomixer m.m.)

HUSK ALTID AT FØLGE SIKKERHEDSREGLERNE I LABORATORIET!

Laboratorieaffald

- 1.** I vores laboratorier er alt affald klassificeret som klinisk risikoaffald, og det skal derfor i de gule affaldsbeholdere (og ikke i normale skraldespande). De små skraldeposer på bordene skal også heri, når de er fyldte.
- 2.** Hæld aldrig opløsninger eller kemikalier tilbage til den flaske, du hældte fra – overskud betragtes som affald. Tag derfor kun hvad du har brug for – du kan altid hente mere.
- 3.** Væsker, der skal smides ud, hældes i dunke til flydende biologisk affald, medmindre underviserne giver besked om andet.

Tips til laboratoriearbejde

- 1.** Markér straks rør, plader m.v., så I ikke bytter om på prøver eller glemmer, hvad der er i. Markér tydeligt med både indhold, jeres initialer/gruppenavn og dato. Markér beholdere på siden og på låget. Markér agarplader på den del som indeholder medie/agar, ikke på låget. Skulle låget falde af kan du blot tage et nyt låg og pladen vil stadig være markeret korrekt.
- 2.** Hæld sterile mikrocentrifugerør ud af beholderen på en af afsprittet overflade i stedet for at stikke din hånd ned i posen med alle rørene for at minimere risikoen for kontamination. Kontamination er når der kommer urenheder i jeres prøver. Ofte vil det være bakterie eller svampe som kommer fra jeres hud, udånding eller luften.
- 3.** Rør ikke ved kanten af mikrocentrifugerør. På den måde undgår I kontamination.
- 4.** Når I skal pipettere sterilt, tændes gasflammen, og der arbejdes tæt på flammen. Drigalskispatler må steriliseres i flammen, så ethanolen på spatelen antændes. Hold ikke spatelen derind for længe, da den bliver varm. Lad derefter spatelen køle af, inden I lader den røre jeres celler. Pipetter må ikke stikkes ind i gasflammen.

Overview laboratoriearbejde Biotech Academy Camp 2021



Biotech Academy

Lørdag

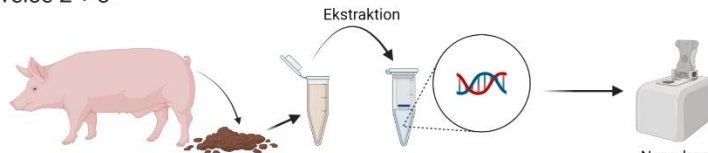
Øvelse 1



Pippetering og
spektrofotometri

Søndag

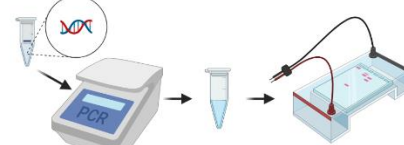
Øvelse 2 + 3



DNA ekstraktion
og kontrol med Nanodrop

Mandag

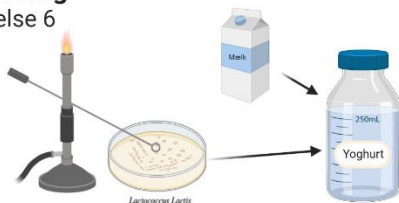
Øvelse 4 + 5



16 rRNA PCR
og kontrol med gelelektroforest

Mandag

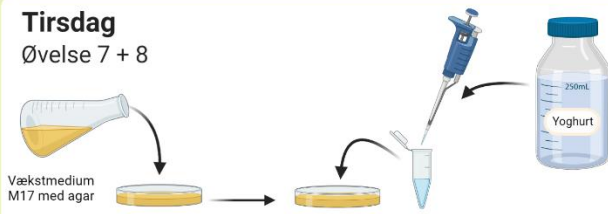
Øvelse 6



Inokulere yoghurt

Tirsdag

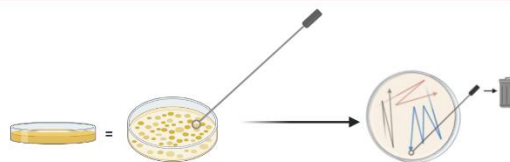
Øvelse 7 + 8



Støbning af plader og
udpladning af yoghurt

Onsdag

Øvelse 9 + 10



Undersøge plader via mikroskopi
og isolere bakterier fra plader

Torsdag

Øvelse 11 + 12



Gro bakterier til vækstforsøg
og bestemme væksthastighed

Dag 1: Lørdag

Øvelse 1: Pipettering

I denne øvelse vil I blive introduceret til laboratoriet, lave en fortyndings række og øve jeres pipettering.

Materialer:

- Spektrofotometer
- 2 kuvetter
- Saftevand
- Demineraliseret vand (fra den orange vandhane)
- Ukendt prøve
- 2 mL mikrocentrifugerør

Fremgangsmåde:

1. Lav 2 mL af følgende fortyndinger af saftevand i mikrocentrifugerør: 1x – 2x – 4x – 6x – 8x – 10x – 50x – 100x
x hentyder til antallet af gange saftevanden fortyndes. Dvs. 1x er ufortyndet saftevand mens at 2x er halv saftevand og halv vand. 100x er 1 del saftevand og 99 dele vand.
2. Mål absorbans på 500 nm for hver fortynding og notér resultatet.
Før brug af spektrofotometer spørg en hjælpelærer for introduktion.
 - Kalibrer spektrofotometeret
 - Start med den højeste fortynding (100x): Tilsæt 1 mL af fortyndingen til en kuvette.
 - Sæt kuvetten i spektrofotometeret.
 - Mål absorbansen (ved 500 nm)
 - Gentag nu med den næsthøjeste fortynding (50x). I behøves ikke at kalibrere spektrofotometeret igen.
3. Husk at hav en nulprøve! – dvs. en kuvette med vand. Gem denne gennem hele forsøget

Resultater:

Fortynding:	Absorbance målt:
1x	
2x	
4x	
6x	
8x	
10x	
50x	
100x	
Ukendt prøve	

Spørgsmål:

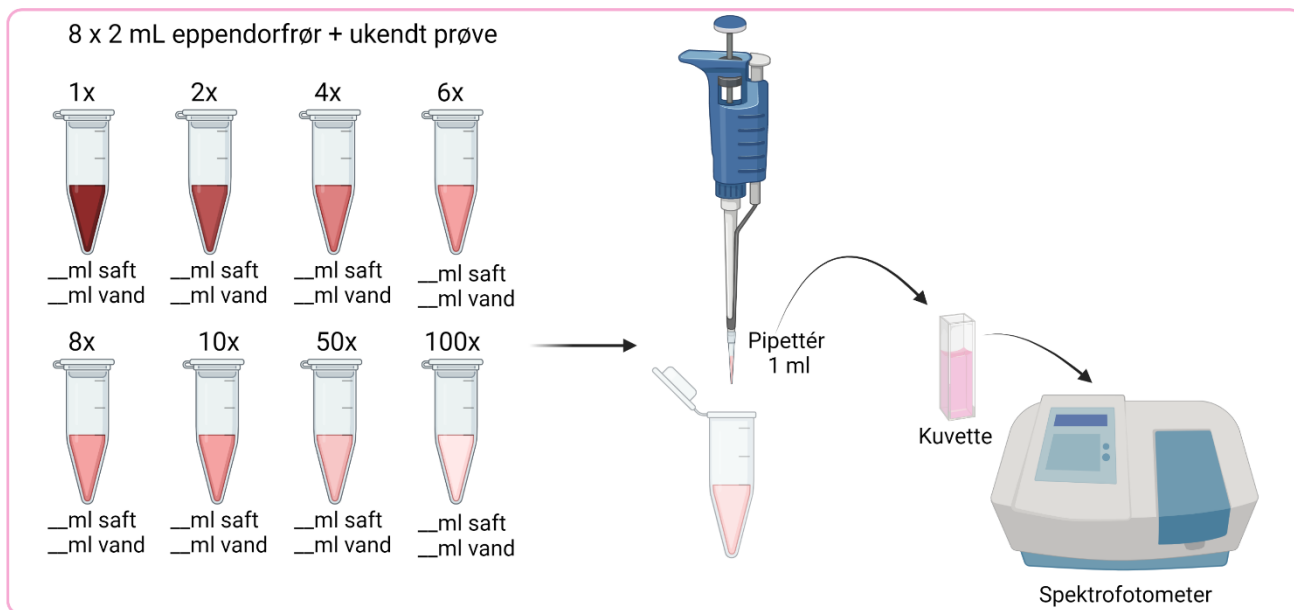
Lav en standardkurve e.g. i Excel over jeres data.

Lav en tendenslinje og udregn hvor den ukendte prøve ligger på linjen.

Hvor mange dele vand og hvor mange dele saftevand er der i den ukendte prøve? (skal være mellem 1 og 100)

Flowsheet:

Udfyld flowsheetet inden i går i laboratoriet!



DNA ekstraktion og 16s rRNA PCR

Dag 2: Søndag

Øvelse 2: DNA ekstraktion

I får udleveret et mikrocentrifugerør, hvor vi på forhånd har afvejet 100-200 mg fæces. Vi vil da benytte et DNA-ekstraktionskit til at ekstrahere DNA'et fra fæces prøven.

En detaljeret beskrivelse af kittet kan findes på følgende link: [DNA ekstraktion kit](#).

Materialer:

- Thermomixer
- Pipetter og spidser
- DNA ekstraktion kit
- Mikrocentrifugerør – 1.5 og 2 mL
- Vortex
- Centrifuge
- Ethanol 96 %
- Prøve med fæces fra gris

Fremgangsmåde:

Centrifugering udføres ved stuetemperatur på maksimal hastighed (18.000 x g).

Vær opmærksom på at få grundig introduktion til centrifugen inden brug! Særligt vigtigt er at den skal være afbalanceret inden den sættes igang.

Før start:

- Klargør en thermomixer ved 70 °C til brug i step 3 og 8. (Er gjort på forhånd af hjælpelærerne)
- Resuspendér eventuelt bundfald i Buffer A1 og InhibitEX Buffer ved at inkubere ved 37-70 °C.
- Tilføj ethanol til Buffer AW1 og Buffer AW2 (er muligvis gjort på forhånd, se på flasken)
- Mix (vend forsigtigt et par gange) alle buffere før brug.

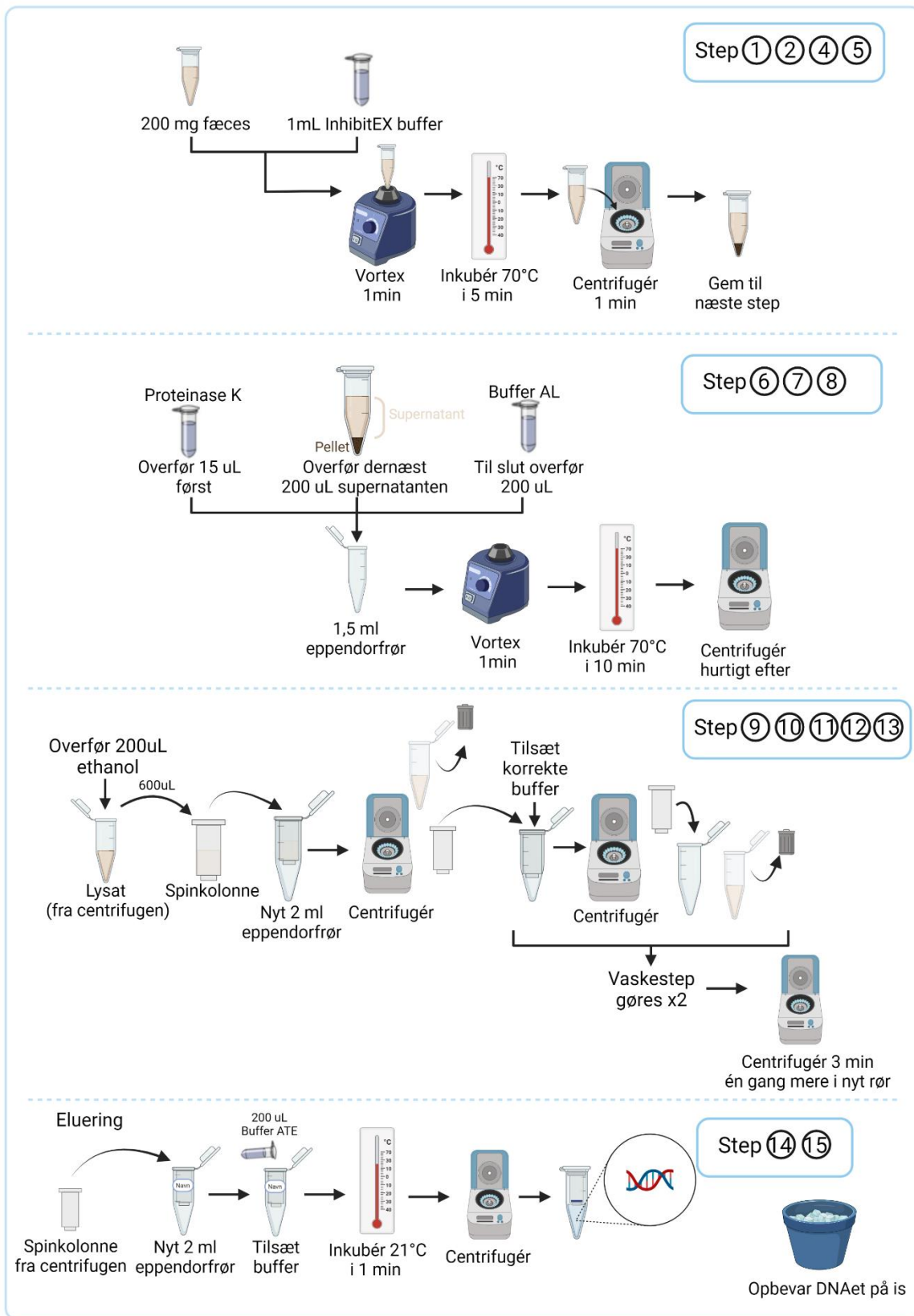
Ved start:

1. Afvej 200 mg fæces i en 2 mL mikrocentrifugerør (allerede gjort).
2. Tilføj 1 mL InhibitEX Buffer. Vortex i 1 min eller indtil prøven er tilstrækkelig homogen.
3. Inkuber opløsningen i 5 min ved 70 °C. Vortex i 15 sekunder.
4. Centrifuger prøver på maksimal hastighed i 1 min. Sørg for at afføringspartiklerne er bundfældet.
5. Tilføj 15 uL proteinase K i et nyt 1.5 mL mikrocentrifugerør.
6. Tilføj 200 uL af supernatanten fra step 4 i røret med de 15 uL proteinase K.
7. Tilføj 200 uL Buffer AL og vortex i 15 sekunder.
8. Inkuber ved 70 °C i 10 min.
Centrifuger kortvarigt for at fjerne kondens fra låget.
9. Tilføj 200 uL ethanol (96-100%) til lysatet fra step 8. Vortex kort og herefter centrifuger kortvarigt for at fjerne dråber fra låget.

10. Overfør forsigtigt 600 uL lysat fra step 9 til en QIAamp spin kolonne. Placer kolonnen i et 2 mL mikrocentrifugerør. Luk låget og centrifuger ved maksimal hastighed i 1 min. Placer kolonnen i et nyt 2 mL mikrocentrifugerør. Det gamle rør kan smides ud.
11. Åben forsigtigt kolonnen og tilføj 500 uL Buffer AW1. Centrifuger ved maksimal hastighed i 3 min. Opsamlingsrøret kan smides ud.
12. Åben forsigtigt kolonnen og tilføj 500 uL Buffer AW2. Centrifuger ved maksimal hastighed i 3 min. Opsamlingsrøret kan smides ud.
13. Placer kolonnen i et nyt opsamlingsrør. Centrifuger ved maksimal hastighed i 3 min.
14. Eluerings step: Her er det vigtigt at I benytter et rent mikrocentrifugerør som opsamlingsrør. Det er dette rør, hvor DNA, som er blevet ekstraheret fra fæcesprøven, befinder sig. I må derfor ikke smide dette rør ud! Husk at skriv på røret så I kan genkende det, og ved hvad det indeholder.
Overfør kolonnen til et mikrocentrifugerør (Skal være rent og have jeres navn/gruppenummer noteret på).
Tilføj 200 uL Buffer ATE til kolonnen. Inkubér ved stuetemperatur i 1 min. Centrifuger ved maksimal hastighed i 1 min for at eluere DNA'et.
15. Det oprensede DNA opbevares på is.

Flowsheet:

Udfyld flowsheetet på næste side inden i går i laboratoriet!



Øvelse 3: Kontrol med Nanodrop

I denne øvelse skal det kontrolleres at jeres DNA er blevet oprenset. Dette kan gøres med et NanoDrop Spektrofotometer, som måler UV-absorptionen fra DNA, og på denne måde kan måle koncentrationen. En detaljeret beskrivelse af det specifikke instrument i skal benytte kan findes på følgende link: [NanoDrop Lite Spectrophotometer](#).

A260/280 bør være omkring 1.8 for oprenset DNA og koncentrationen skal helst ikke være mindre end 30 ng/uL.

Materialer:

- Prøver med DNA fra øvelse 2
- Boks med is (DNA-prøverne skal altid opbevares på is)
- Pipette, spidser, Buffer ATE, laboratorie servietter - (kan findes ved Nanodrop spektrofotometeret)

Fremgangsmåde:

1. Opbevar jeres DNA prøver på is så vidt muligt. Gå med en hjælpelærer til bygning 223. Her vil I sammen med hjælpelæren benytte Nanodrop spektrofotometeret. Bygningen bruges også til forskning af ansatte fra DTU. Kig gerne rundt, men sørg for at holde jer til hjælpelæren og lad være med at røre eller flytte noget som ikke tilhører jer.
2. Vælg DNA på skærmen og vælg herefter dsDNA (double-stranded DNA)
3. Følg instruktionerne på skærmen.
Lav en baggrundsmåling (blank) – brug 1 uL Buffer ATE fra øvelse 2.
4. Løft målearmen, tør bufferen af med en tør laboratorieserviet.
5. Gentag baggrundsmålingen for at sikre at der er målt korrekt.
6. Løft målearmen, tør bufferen af med en tør laboratorieserviet.
7. Tilføj 1 uL af din prøve og tryk på 'Measure'.
8. Noter værdierne i tabellen nedenfor.
9. Løft målearmen, tør prøven af med en tør laboratorieserviet. Instrumentet er nu klar til næste måling.

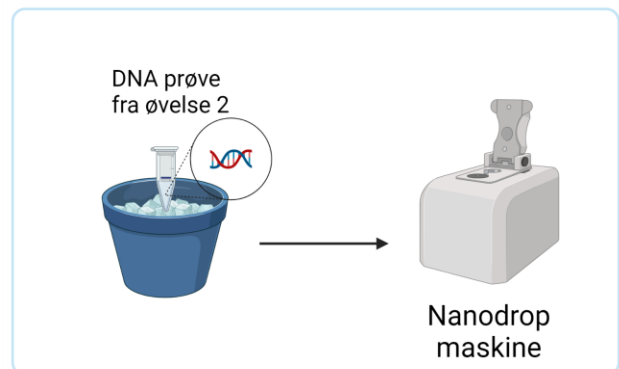
Resultater:

Prøve	Concentration ng/uL	A260/280
1		
2		

Spørgsmål og flowsheet:

Hvad er det i DNA som absorberer UV lys?

Hvorfor kan UV lys forårsage DNA skader?



Dag 3: Mandag

Øvelse 4: 16s rRNA PCR

Formålet er at opformere det ekstraherede DNA fra øvelse 2. Vi anvender dog ikke hele DNA'et, men kun det stykke, vi kalder for 16s rRNA genet (se teorikompendiet). DNA-stykket opformeres vha. PCR. Her tilsætter vi to primere kaldet 341F og 805R. Disse primere binder specifikt til hver deres side af 16s rRNA genet og starter opformeringen. Derudover har vi brug for en master mix, som indeholder alle de nødvendige reagenser for at reaktionen kan ske, herunder DNA polymerasen. Reaktionen sker i det vi kalder en PCR-maskine/thermocycler. Vi kalder den en thermocycler, da den netop virker ved skiftevis at hæve og sænke temperaturen. Det gør den i forskelle omgange/cykler. Normalt benyttes 30 cykler til en PCR-reaktion.

Materialer:

- 2x phusion hot start master mix
- Primers f (for forward) 10 μ M
- Primers r (for reverse) 10 μ M
- DNA Template
- H2O milliQ
- PCR-instrument (thermocycler)
- PCR-rør
- Boks med is

Fremgangsmåde:

1. Primers, DNA Template (jeres DNA prøve) og Phusion master mix holdes på is.
2. Notér på PCR-rørene med passende tekst. Her skrives både på siden og på låget. Det kan godt blive utydeligt efter de har været i PCR-maskinen.
3. Der laves et mastermix med alle reagenser, som skal bruges, bortset fra DNA-templaten som kan variere.
Til hvert rør tilføjes nedenstående mængde af hvert reagens. Dvs. I skal gange op med det antal rør I skal bruge. Lav hellere for meget end for lidt!
Primer f – 1 uL
Primer r – 1 uL
MilliQ vand – 7.5 uL
2x Phusion hot start master mix – 12.5 uL
4. Tilføj nu 3 uL DNA template og 22 uL af jeres master mix til hvert PCR-rør.
Total volumen i hvert rør = 25 uL
Lav duplikater af hver DNA prøve.

De følgende to step gøres sammen med en hjælpelærer

5. Det ene sæt PCR rør sættes i instrumentet. Sørg for at lågene er tætte så I undgår fordampning og skru låget på maskinen på. Det andet sæt sættes på is. **Det ene sæt skal vi sætte over i PCR maskinen i 223.**
6. Indstil maskinen til det følgende program:

Initial denaturation ved 95°C i 15 min.

Efterfulgt af 30 cykler:

Denaturation: 95°C i 30s

Annealing: 55°C i 30s

Elongation: 72°C i 1 min (15-30 sek pr kb)

Og til slut final extension i 5 min på 72°C

Når programmet er færdigt, sikrer maskinen en opbevaringstemperatur på 10 °C, så prøverne bevarer til vi henter dem.

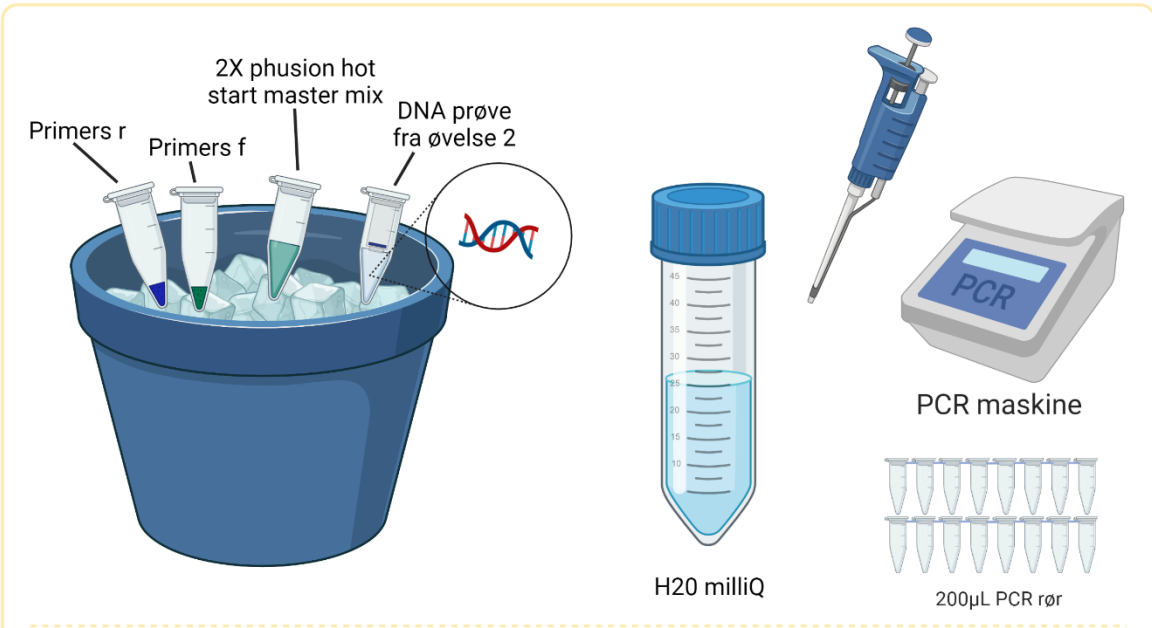
Spørgsmål:

Hvorfor kalder vi det PCR? (Hvad er det en forkortelse for, og hvordan beskriver det forsøget)

Hvad er 16s rRNA genet? Hvad koder det for? Og hvordan kan det bruges til at identificere bakterier?

Flowsheet:

Udfyld flowsheetet på næste side inden i går i laboratoriet!



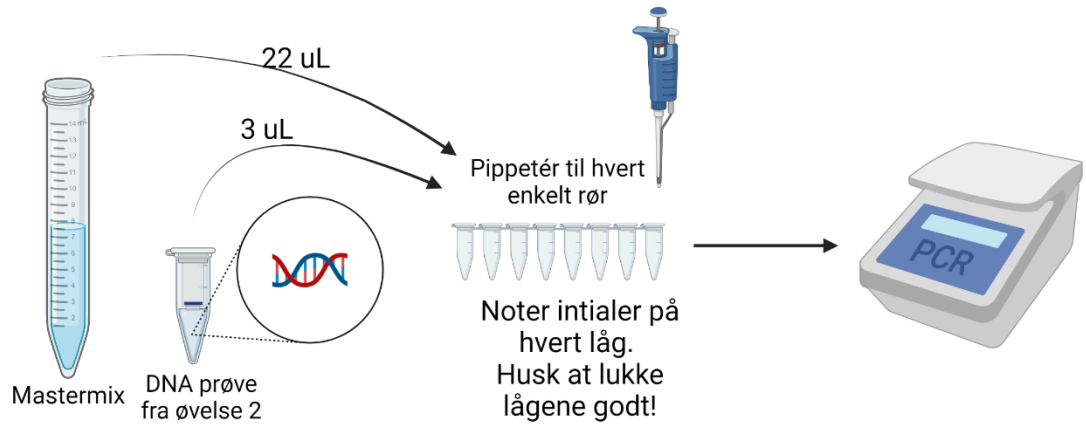
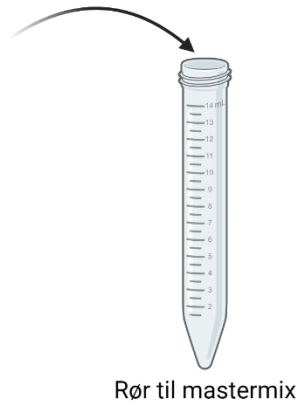
Udregn mængder til din master mix her

_____ X 1 uL Primer f = _____ uL
 Antal PCR rør

_____ X 1 uL Primer r = _____ uL
 Antal PCR rør

_____ X 7,5 uL MiliQ = _____ uL
 Antal PCR rør

_____ X 12,5 uL phusion hot = _____ uL
 Antal PCR rør start master mix



Øvelse 5: Kontrol med gel-elektroforese

Materialer:

- Gelelektroforese apparat
- Støbeform til gelen + støbeform til brøndene
- TAE buffer
- Agar
- Loading dye
- PCR prøver
- 1kb markør
- Staniol

Fremgangsmåde:

Alle step i dette forsøg skal gøres med en hjælpelærer der kontrollerer at I gør det korrekt.

Der bruges handske efter hjælpelæreres instrukser.

Efterfølgende vaskes der grundigt hænder.

Støbning af gel:

1. Hæld 30 mL af agaren ned i et støbekar (i støbekaret skal der være en plastik kam til at støbe brøndene)
2. Hurtigt efter tilføjes 20 uL SYBRsafe til gelen – SYBRsafe kan forårsage DNA skader, og derfor er det meget vigtigt at der benyttes handsker.
3. Læg staniol over (så vi undgår støv i gelen)
4. Vent omkring 20-40 min, til gelen er størknet.
5. Kontrollér at gelen er fast, inden I forsøger at tage den ud af støbekaret.

Loading af gel:

1. Læg støbeformen med gelen i elektroforesekarret.
2. Tilsæt 5 uL 6X loading dye til PCR-rørene. 6X betyder at reagenset skal fortyndes 6 gange.
3. Overfør gelen til et elektroforesekar.
4. Tilføj standarden (1 kb DNA ladder)
5. Påfør låget til elektrolysekarret. Dobbelttjek at låget vender rigtigt. Husk at DNA er negativt ladet.
6. Tænd på 100 V og lad gelen løbe i 20 min. Kontrollér, at der kommer luftbobler fra kobbertråden i karret, når der tændes.
7. Sluk apparatet og fjern gelen.

Gelen kontrolleres med UV-lys

1. Læg gelen på UV-pladen
2. Tag briller på
3. Tænd UV-lyset

Hjælpelæren vil desuden tage et billede til jer. **Forhåbentlig kan der printes. Ellers kan det ihvertfald gemmes som PNG-fil.**

Resultater:

Sæt billede af jeres gel ind her. Tegn størrelsen af de forskellige bånd på standarden.

Spørgsmål:

Hvordan bliver DNA strengene med forskellige længder adskilt?

Hvad kan gelelektroforese ellers bruges til? (her er svaret e.g. SDS PAGE, altså proteiner)

Yoghurt og vækstkurve

Dag 3: Mandag

Øvelse 6: Inokulere yoghurt

I denne øvelse skal vi inokulere mælk med en bakterie, med yoghurt som resultat.

Materialer:

- Plade med *Lactococcus Lactis* -bakterier (finsk yoghurtstamme)
- Mælk
- 250 mL Blue cap flaske
- Inokuleringsloop
- Varmeskab, 30°C
- Bunsenbrænder

Fremgangsmåde

1. Find mælk, flaske, inokuleringsloop og bunsenbrænder. Tænd bunsenbrænderen for at skabe et aseptisk miljø – og i følgende trin skal du arbejde nær bunsenbrænderen.
2. Overfør 150 mL mælk til din flaske.
3. Vejlederne har forberedt en plade med yoghurtbakterier, herfra overfører du nogle kolonier vha. inokuleringsloopet. Omrør grundigt med loopet for at overføre alle bakterierne fra skrabet.
4. Luk din flaske og sluk bunsenbrænderen.
5. Lad din flaske stå i varmeskab natten over (husk at notere gruppe på flasken). Bakteriernes temperatur-optimum er ved 30°C.

Dag 4: Tirsdag

Øvelse 7: Støbning af selektive plader

For at kunne gro og isolere de bakterier, der gror i yoghurten, har vi brug for nogle plader med et selektivt medie. Mediet har laktose som karbonkilde, hvilket gør, at *Lactococcus Lactis* gror godt. *L. Lactis* er den bakterie I har brugt til at lave jeres yoghurt. Pladerne laves ved at tilføje vækstmediet med agar. Agaren fungerer ligesom husblas, og størkner ved lave temperaturer.

Materialer:

- Vækstmedium M17 med agar (autoklaveret og i varmeskab)
- Petriskåle
- Renbænk
- Bunsenbrænder

Fremgangsmåde:

Notér på fire plader jeres gruppenummer, dato, og M17.

Følgende step udføres i en LAF bæk med sug (som sikrer, at pladerne ikke bliver kontamineret med bakterier)

1. Hæld omkring 30 mL agar fra agarflasken ud på en plade. 30 mL svarer til en halv til hel centimeter tykkelse.
2. Sørg for at agaren er ligeligt fordelt på pladen
3. Lad pladen stå med låget halvt på, så agaren kan størkne.
4. Når agaren er størknet lægges der låg på pladerne.

Pladerne kan nu tages ud af lab bænken, lægges i en pose og sættes på køl.

Spørgsmål:

Hvad betyder det at noget er autoklaveret?

Hvorfor skal mediet med agar autoklaveres? (steriliseres og agaren skal varmes op før det størkner)

Øvelse 8: Udpladning af yoghurt på selektive plader

I har nu lavet en yoghurt. Vi skal nu se om i er i stand til at isolere en bakteriekoloni fra jeres yoghurt.

Materialer:

- Plader fra øvelse 7
- Hjemmelavet yoghurt
- Mikrocentrifugerør
- Pipetter + spidser
- Drigalskispatler
- Bunsenbrænder

Fremgangsmåde:

Først skal der laves en fortyndingsrække af yoghurten.

1. Der tilsættes yoghurt til et 1.5 mL mikrocentrifugerør
2. Fra dette rør overføres 100 uL yoghurt til et nyt mikrocentrifugerør.
Der tilføjes yderligere 900 uL milliQ vand.
Pipetter op og ned så yoghurten fortyndes.
I har nu lavet en 10^1 fortynding af yoghurten.
3. På samme måde laves der yderligere en 10^2 , 10^3 og en 10^4 fortynding.

Fortyndingerne udplades – få en introduktion af en hjælperlærer før I går i gang!

1. Tænd bunsenbrænderen og arbejd i nærheden af denne.
2. Fra 10^1 overføres 150 uL til en M17 plade.
3. Drigalskispatlen dyppes i 96% ethanol og føres ind i flammen.
4. Vent et par sekunder efter ethanolen er brændt af på spatlen.
5. Fordel nu væsken rundt på hele pladen indtil væsken er næsten tørret ind.

Dette gentages med 10^2 , 10^3 og 10^4 fortyndingen.

Dag 5: Onsdag

Øvelse 9: Undersøge plader + mikroskoper

Enkelt kolonier skal gros til undersøgelse tidligt onsdag morgen! Hvis ikke der er kommet enkelt kolonier endnu må forsøget udsættes til om eftermiddagen. Evt bare tag en enkelt koloni, opløs den i meget lidt medie og kig i den.

Hav også en backup O/N kultur som vi selv har sat over.

Materialer:

- Phase contrast mikroskop
- 1 stak objekt glas
- 1 æske med dæk glas
- Immersion olie
- Linse papir (til rengøring af objektiverne)
- Objekt mikrometer (delt mellem flere hold, sørg for at passe særligt godt på det!)
- Jeres bakteriekultur
- Ethanol

Fremgangsmåde:

Før denne øvelse vil der fælles i teorilokalet blive gennemgået lidt teori om hvordan mikroskoperne virker samt, hvordan man benytter mikroskoperne.

God mikroskop praksis (GMP 😊)

Når en prøve er blevet placeret i holderen og I har fundet det rette fokus, så start med at undersøge på lavest forstørrelse (4x). Hvis I starter med at undersøge ved 100x og tilsætter immersion olie vil I ikke kunne gå tilbage og kigge på prøven ved fx 10x eller 40x. Det er ikke i alle tilfælde at man ønsker at bruge den største forstørrelse. Sørg desuden for ikke at røre ved objektivglassene! Skulle det ske kan man rengøre dem med linse papir og ethanol.

Justér kun på de ting ved mikroskopet som er nævnt i protokollen. Hvis I er en tvivl, så spørg en hjælpelærer. Husk at mikroskoperne er meget dyre, så pas godt på dem.

Find fokus: Dette kan gøres ved at tegne med tus på et objektglas og bruge det som prøve.

1. Tjek om du benytter det laveste objektiv/forstørrelse. Hvis ikke, så drej på objektivglassene så de står rigtigt.
2. Drej forsigtigt på den store fokus knap så holderen til jeres prøves løftes op mod mikroskopet. Drej indtil det ikke kan komme længere op. Sørg dog for at den ikke rammer objektivglasset!
3. Justér kondensoren og lysintensiteten så der kommer mest muligt lys.
4. Indstil forsigtigt fokus med den store knap. Justér med den lille fokus knap. Hvis I ikke kan finde fokus, start forfra med trin 2, 3 og 4.
5. Når fokuset er fundet juster da på kondensoren og lysintensiteten så I får det skarpeste billede.
6. Når I har fundet det rette fokus, kan I skifte til de andre objektiver. Benyt først 100x objektivet når I bruger jeres prøve, og husk at der skal tilføjes en dråbe immersion olie, når man bruger 100x objektivet.

7. Når I skifter objektiver, burde i stadig bevare fokus da de er synkroniseret. Det kan dog være at Iskal justere en smule.

Undersøg jeres prøve:

8. Placer en dråbe (omkring 1 uL) af jeres bakteriekultur på et objektglas. Læg forsigtigt et dækglas ovenpå dråben. Det er vigtigt at det gøres forsigtigt for at undgå at der dannes luftbobler.

9. Ud fra overstående protokol, undersøg jeres bakteriekultur og svar på spørgsmålene under næste punkt.

10. Når I benytter 100 x objektivet skal I sørge for ikke at skifte tilbage til 40 x objektivet. Hvis I gør det kontamineres det med immersion olie. Skulle det ske at der kommer olie på 40x objektivet kan i tørre det af med linse papir og ethanol.

100x objektivet benyttes ved at placere en dråbe olie ovenpå dækglasset og derefter dreje 100 x objektivet forsigtigt på plads.

11. Rengør mikroskopet

Når I er færdige med mikroskopet skal 100x objektivet rengøres for olie. Det gøres med linse papir og ethanol.

Spørgsmål:

Hvad er gennemsnitsstørrelse af cellerne i jeres bakteriekultur?

Var det forskellige arter eller lignede de hinanden?

Prøv at beskriv dem: Aflange? Runde? Bredde? Længde?

Øvelse 10: Isolere bakterie fra plader

Materialer:

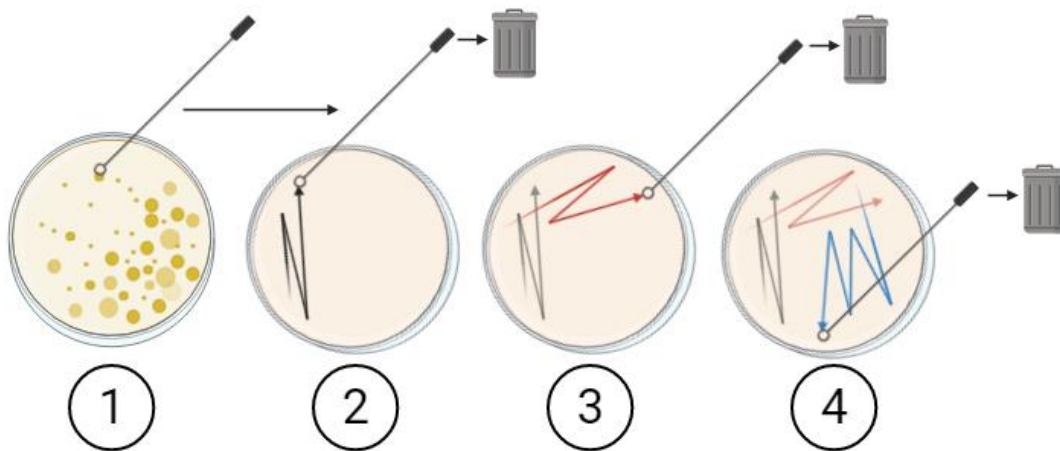
- Inokuleringsnåle
- Bunsenbrænder
- Plader med udpladet yoghurt
- Plader med M17 medie.

Fremgangsmåde:

At isolere en bakterie, kaldes også for renstrygning.

Hver person laver to renstrygninger, dvs. at I skal bruge 2 plader til hver person i gruppen.

Følg instrukserne på figuren og i figurteksten.

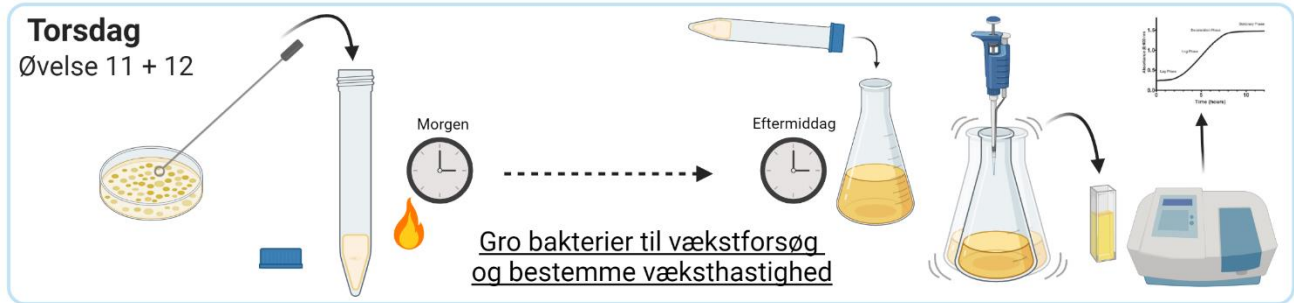


Figur 17: Renstrygnings metode. (1) Tag en frisk koloni fra jeres plade med en inokulerings loop. (2) Placer jeres inokulerings loop med kolonier på i den ene kant af en ny agarplade og følg mønsteret som anvist. Smid loopet ud efter brug. (3) Tag en ny inokulerings loop og følg mønsteret som anvist (det er vigtigt at krydse forrige strøg med det første strøg med den nye inokulerings loop). Smid loopet ud efter brug. (4) Tag en ny inokulerings loop og følg mønsteret som anvist. Smid loopet ud efter brug.

Spørgsmål:

Hvorfor er det vigtigt at ren stryge bakterier? (Bakterier kan være forskellige fra koloni til koloni)

Dag 6: Torsdag



Øvelse 11: Gro bakterier til vækstforsøg

Materialer:

- Inokuleringsloop
- 15 mL rør
- Medie
- Agarplade med enkeltkolonier

Fremgangsmåde:

Her skal vi sikre os at de bakterier som bruges til vækstforsøget i øvelse 12, er friske. Derfor inokulerer vi nu i 3 mL medie og lader dem inkubere indtil øvelsen.

1. Udtag, med inokuleringsloop, en af de kolonier I har isoleret i øvelse 10. Det er vigtigt at I kun får én koloni med.
2. Overfør kolonien til et 15 mL rør med 3 mL medie.
3. Sæt låg på røret
4. Sæt røret i varmeskab i minimum 10 timer

Øvelse 12: Bestemme væksthastigheden

Materialer:

- M17 medie
- Bakteriekultur (sat til inkubation om morgenen)
- Spektrofotometer (OD600)
- Kuvetter
- Vandbad
- Stopur
- Semilogaritmisk papir
- 250 mL rystekolbe

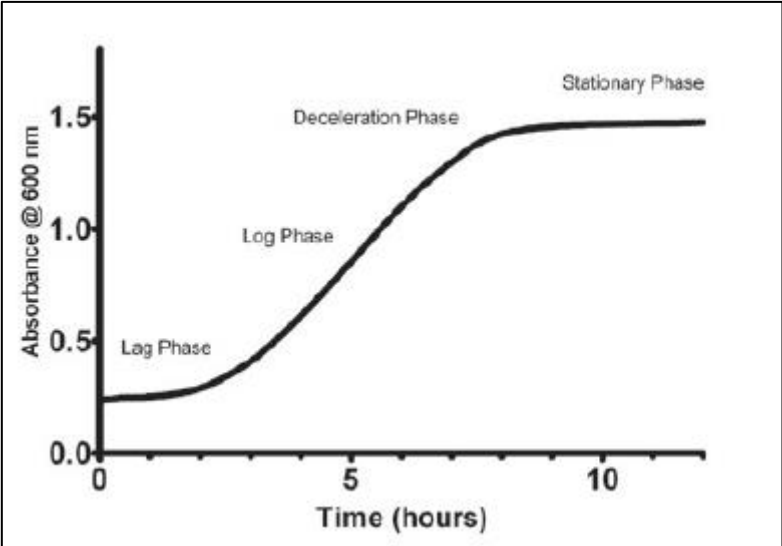
Fremgangsmåde:

1. Tilføj 100 mL medie til en 250 mL rystekolbe.
2. Stil kolben i vandbadet ved 37 °C og inkubér i ca. 10 min.
3. Når mediet er omkring de 37 °C, tilføjes bakteriekulturen som I klargjorde i morges.

4. Start tiden (start tid t=0). Notér også klokkeslættet hvis nu uret skulle gå ud. Sørg for at have kalibreret spektrofotometeret. Husk at gemme jeres nulprøve!
5. Sørg for at kolben bliver omrystet med høj nok fart til at mediet bliver iltet. Dvs. at der skal komme en smule bobler/skum når flasken rystes.
6. Biomassen er målt ca. hvert 10. minut (kan evt. justeres til hvert 20. min). En mL overføres til en kuvette og OD₆₀₀ måles med et Ultrospec 10 spektrofotometer. Den eksakte tid for OD målingen noteres i tabellen nedenfor sammen med den OD som blev målt.
7. Løbende gennem forsøget noteres der på et semilogaritmisk papir. På denne måde kan man se, hvilket stadie bakterierne er i (lag fase, log fase eller stationær fase).

Resultater:

Time (min)	OD



Figur 18. Plot der viser de forskellige faser af bakterievæksten under vækstforsøget. På x-aksen ses tiden i timer og på y-aksen absorbans målt ved 600 nm.

Spørgsmål:

Beregn generationstiden af jeres bakterie! Google evt. hvordan dette gøres. Generationstiden er et tal for hvor hurtigt jeres bakterier deler sig (hvor hurtigt de fordobles). http://textbookofbacteriology.net/growth_3.html link som viser hvordan det kan gøres.

Hvad måles der på når man måler OD? (reflekteret lys, fra celler)

Kan OD stige uden at antallet af celler stiger? (Ja, hvis cellerne ikke deler sig, men bare bliver større)