

## TRANSFORMASJON AV *E. COLI* MED GFP

### Hensikt

Hensikten med forsøket er å få en grunnleggende forståelse for hvordan genetisk modifiserte organismer (GMO) kan fremstilles og hvordan dette fører til nye egenskaper hos organismen (i dette tilfellet antibiotikaresistens og produksjon av grønt fluorescerende protein i bakterier).

### Bakgrunn

Mange bakterier har i tillegg til sitt kromosomale DNA noen små, sirkulære DNA-molekyler med ekstra, fordelaktige gener. Disse DNA-molekylene kalles plasmid-DNA og kan overføres mellom bakterier ved en prosess kalt transformasjon som også foregår i naturen. Eksempel på et gen som finnes i plasmid-DNA er  $\beta$ -lactamase som koder for et enzym som bryter ned antibiotikumet ampicillin. Bakterier som uttrykker dette genet er derfor resistente og kan vokse i nærvær av ampicillin som hindrer celledeling ved å hemme syntese av bakterienes cellevegg. Transformasjon og rekombinant DNA-teknologi er i dag et viktig verktøy for å lage genmodifiserte organismer med nye egenskaper til f.eks. medisinsk bruk. GFP er et protein som opprinnelig ble isolert fra maneten *Aequorea victoria*. Det absorberer blått lys og sender ut grønt lys i respons, et fenomen som kalles fluorescens. I forskning er GFP et mye brukt verktøy bl. a. for å merke proteiner slik at man kan følge deres lokalisering i cellen ved hjelp av fluorescensmikroskopi. Man kan også erstatte den proteinkodende sekvensen til et gen med *gfp* for å studere hvordan genet reguleres, altså hvor og når i cellen proteinet uttrykkes. I dette forsøket transformeres *E. coli* med plasmidet pFluoroGreen (pGFP) som inneholder genene for  $\beta$ -lactamase og grønt fluorescerende protein (GFP). Uttrykket av *gfp*-genet reguleres med en genetisk av/på-bryter, en såkalt inducerbar promotor som skrur genet på kun i nærvær av molekylet isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG). Bakterier som har tatt opp plasmidet selekteres derfor med ampicillin, og i nærvær av IPTG vil transformantene i tillegg uttrykke GFP og dermed fluorescere grønt i langbølget UV-lys.



### Aktuelle læringsmål

*Naturfag, bioteknologi.* Forklar begrepene krysning og genmodifisering og gi eksempler på hvordan bioteknologi brukes til modifisering av egenskaper hos planter og dyr.

*Biologi 2, bioteknologi.* Forklar hvordan genmodifiserte organismer kan fremstilles, drøft hvordan dette kan brukes innenfor medisin, produksjon av mat og biologisk forskning, og hvilke følger dette kan ha for miljøet.

*Teknologi og forskningslære 1, Teknologi, naturvitenskap og samfunn.* Beskriv prinsipper og virkemåte for noen moderne instrumenter i industri, helsevesen eller forskning, og gjør rede for nytten og eventuelle skadevirkninger.

## LÆRERNOTATER

### Utstyr

**Medfølgende innhold:** *E. coli* BactoBeads, pGFP plasmid-DNA, ampicillin, IPTG, CaCl<sub>2</sub>, vekstnæring (growth additive), LB-agar, LB-medium (Recovery Broth), små petriskåler, store petriskåler, små engangs-pipetter, 10 ml engangspipetter, tannpirkere, podenåler/inokuleringsløkker, mikrosentrifugerør. Forsøkssettet inneholder materialer til 10 elevgrupper.

**Oppbevaring:** Se tabellen under for oppbevaring av de ulike reagensene. Øvrige komponenter oppbevares ved romtemperatur.

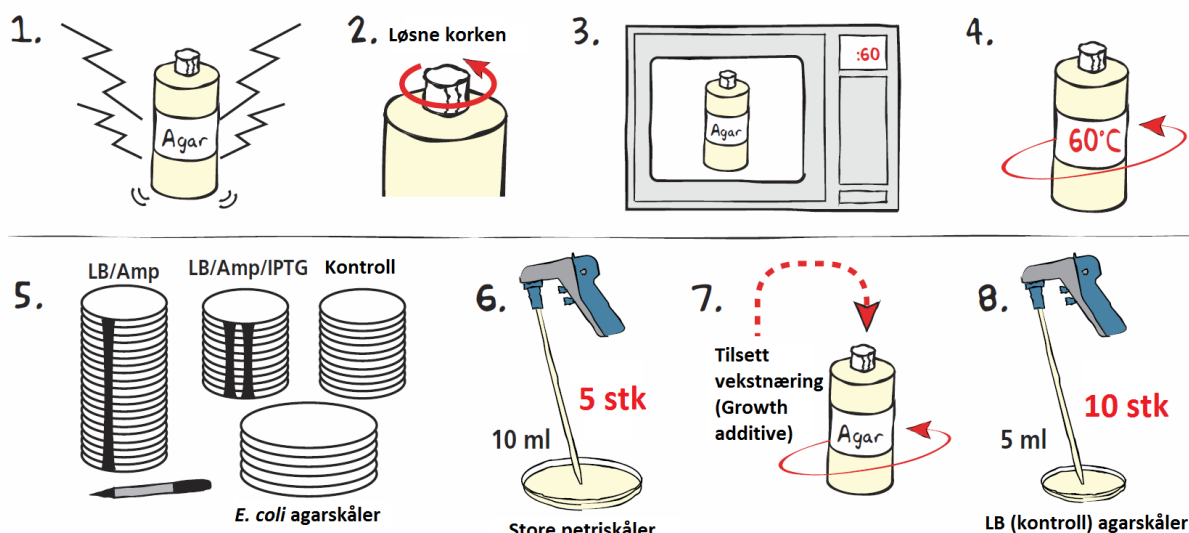
Rør	Innhold	Oppbevaring
A	BactoBeads <i>E. coli</i> vertsceller	Romtemperatur
B	pFluoroGreen (pGFP) plasmid-DNA	- 20 °C
C	Ampicillin (antibiotikum)	- 20 °C
D	IPTG	- 20 °C
E	CaCl <sub>2</sub>	Romtemperatur
	Growth Additive	- 20 °C

**Nødvendig tilleggsutstyr** (foreslåtte varenumre i parentes): vannbad (37 °C og 42 °C, 0666.02), inkubator (0670.20), is/ kjølespann (0676.00).

**Anbefalt tilleggsutstyr** (foreslåtte varenumre i parentes): Hansker (0860.46-49), mikropipetter (0144.05) og pipettespisser (0144.31), pipettefyller (0153.30), reagensrørrister (0657.90), stativ for mikrosentrifugerør (0311.60), UV-lampe (2871.10), vernebriller med UV-filter (0850.60).

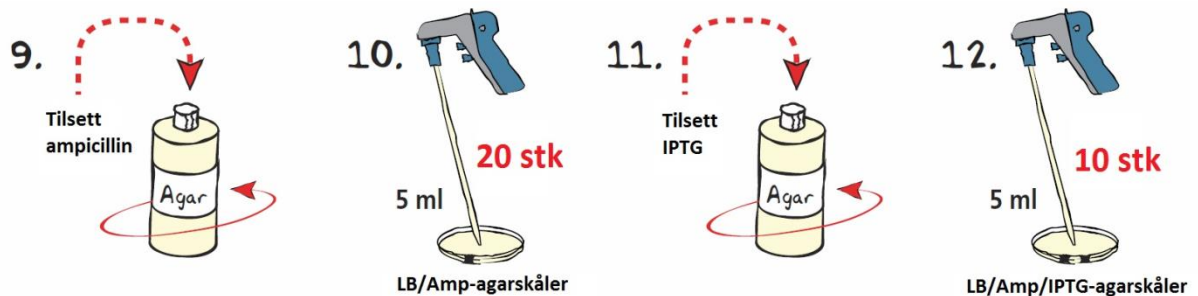
### Forberedelser

**Støping av agarskåler (bør utføres 2-7 dager før forsøket)**



1. Rist flasken kraftig for å bryte agaren opp i mindre biter.

- Løsne korken på agarflasken og la den sitte løst på slik at dampen slippes ut under oppvarmingen i neste trinn.
- Varm agarflasken i en mikrobølgeovn på høy effekt i 60 sekunder for å smelte agaren. Ta flasken ut av mikrobølgeovnen og bland ved å rotere på flasken. Fortsett oppvarmingen i 30 sekunders intervaller til agaren er fullstendig løst (den er da helt klar og uten små partikler). Pass på at det ikke koker over.
- Kjøøl ned agaren til 60 °C mens flasken roteres slik at varmen fordeles likt.
- Merk de små petriskålene (Ø60 mm) som følger med en tusjpen mens agarmediet nedkjøles:
  - Åpne den første plasthylsen og stable alle de 20 skålene på bordet.
  - Lag en strek med tusjpen langs siden av stabelen slik at alle skålene får en stripe på siden. Dette skal bli LB/Amp-agarskålene.
  - Åpne neste plasthylse og stable 10 skåler på bordet.
  - Lag to streker med tusjpen langs siden av skålene. Dette skal bli LB/Amp/IPTG-agarskålene
  - De 10 siste, små skålene merkes ikke. Dette skal bli kontroll-skålene (LB-skålene). De 5 store petriskålene merkes heller ikke.
- Pipetter 10 ml av det avkjølte agarmediet i hver av de 5 store petriskålene. Pipetter forsiktig for å unngå bobler. Vipp petriskålen frem og tilbake for å dekke hele bunnen. Eventuelle bobler kan fjernes ved å sveipe en gassflamme over mediet. Sett på lokket og la stå.
- Tilsett hele volumet med vekstnæringen («Growth Additive») til flasken med resten av agarmediet. **NB! Reagenser må kun tilsettes til agarmedium nedkjølt til 60 °C (så varmt at du så vidt kan holde i flasken uten å brenne deg) da enkelte reagenser degraderes ved høyere temperaturer.** Sett på lokket og bland godt ved å rotere flasken.
- Pipetter 5 ml agarmedium i hver av de 10 umerkede, små petriskålene. **Husk å bruke en ren 10 ml pipette!**

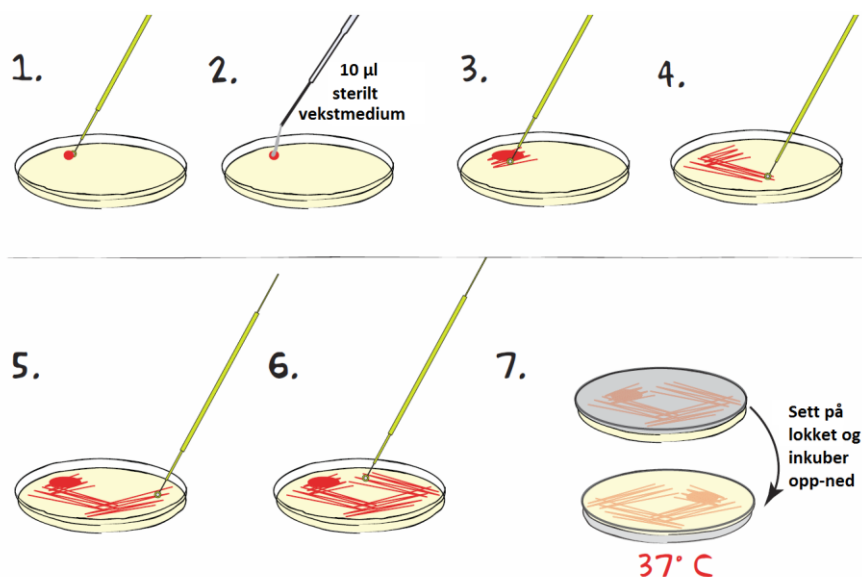


- Tilsett hele volumet med ampicillin (rør C) til flasken med resten av agarmediet. Sett på lokket og bland godt ved å rotere flasken
- Pipetter 5 ml LB/Amp-agarmedium i hver av de 20 små petriskålene merket med en stripe. **Husk å bruke en ren 10 ml pipette!**
- Tilsett hele volumet med IPTG-løsning (rør D) til flasken med resten av agarmediet. Sett på lokket og bland godt ved å rotere flasken.

12. Pipetter 5 ml LB/Amp/IPTG-agarmedium i hver av de 10 små petriskålene merket med to striper. **Husk å bruke en ren 10 ml pipette!**
13. La agarskålene stå minimum 20 minutter eller til agaren har stivnet. Når agarskålene er helt stivnet lagres de opp-ned i en lukket plastpose (f.eks. plasthylsen de kom i eller i en brødpose) i kjøleskap (4 °C). Sett skålene i romtemperatur på morgenen den dagen forsøket skal utføres (evt. ved 37 °C 30 minutter før bruk).

### Klargjøring av *E. coli* agarskåler

*E. coli* agarskålene bør forberedes på ettermiddagen dagen før forsøket for best resultat. Klargjøring av skålene for lang tid i forveien kan gi redusert transformasjonseffektivitet.



1. Ta en BactoBead ut av glasset (A) med en steril podenål og overfør den til utkanten av en stor *E. coli* agarskål og sett lokket på skålen igjen. Sett umiddelbart lokket på glasset med BactoBeads igjen for å begrense at BactoBeads utsettes for fuktighet i luften.
2. Løs BactoBead ved å tilsette 10 µl sterilt vekstmedium («Recovery Broth») eller sterilt vann.
3. Stryk podenålen frem og tilbake gjennom den oppløste BactoBead for å lage et primærutstryk i toppen av agarskålen. Pass på at du ikke dytter podenålen ned i agaren.
4. Stryk podenålen gjentatte ganger gjennom primærutstryket til en ren del av agarskålen.
5. Roter agarskålen og stryk podenålen gjentatte ganger gjennom sekundærutstryket til en ren del av agarskålen.
6. Roter agarskålen en gang til. Stryk podenålen flere ganger gjennom den tredje utstrykingen til en ren del av agarskålen. Dette skal gi isolerte bakteriekolonier.
7. Sett lokket på agarskålen og inkuber opp-ned ved 37 °C i 16-20 timer.
8. Gjenta trinnene 1-7 for resten av de fire store agarskålene.

Merk! Hvis bakterieveksten på agarplatene blir helt tett slik at det ikke er mulig å plukke separate kolonier kan elevene i stedet stryke en podenål over agarskålen slik at løkken blir full av celler som overføres til CaCl<sub>2</sub>-løsningen i punkt 3 i elevveiledningen.

### På forsøksdagen

1. Sett vannbadene på hhv. 37 °C og 42 °C, og inkubatoren på 37 °C.
2. Alikvoter 1 ml CaCl<sub>2</sub>-løsning (rør E) i mikrosentrifugerør (ett rør til hver elevgruppe) og plasser rørene på is.
3. Alikvoter 1,5 ml LB-medium («Recovery Broth») i mikrosentrifugerør (ett rør til hver elevgruppe) og la stå i romtemperatur.

### Alikvotering av pFluoroGreen (pGFP) plasmid-DNA (gjøres på forsøksdagen eller dagen før)

1. Sett røret med plasmidet pGFP (rør B) på is for å tine.
2. Merk 10 mikrosentrifugerør «pGFP». Hver elevgruppe skal ha ett rør.
3. Bland innholdet i røret godt og dunk røret mot bordet for å samle hele volumet i bunnen.
4. Pipetter 12 µl plasmid-DNA til hvert rør. Sett på lokket og plasser rørene på is.

Reagenser og utstyr til hver elevgruppe
1 rør CaCl <sub>2</sub>
1 rør pFluoroGreen (pGFP) plasmid-DNA
1 rør LB-medium (Recovery broth)
2 LB-Amp agarskåler (med en stripe)
1 LB-Amp-IPTG agarskål (med to striper)
1 LB agarskål (umerket)
4 sterile 1 ml pipetter
2 sterile podenåler
Tannpirkere
I tillegg deler to grupper en <i>E. coli</i> agarplate

Etter forsøket destrueres alt genmodifisert materiale og utstyr som har vært i kontakt med dette som beskrevet i avsnittet «Avfallshåndtering» i elevveiledningen.

### Forsøks tid

Transformasjon og utstrykning på agarskåler: 45-90 min.

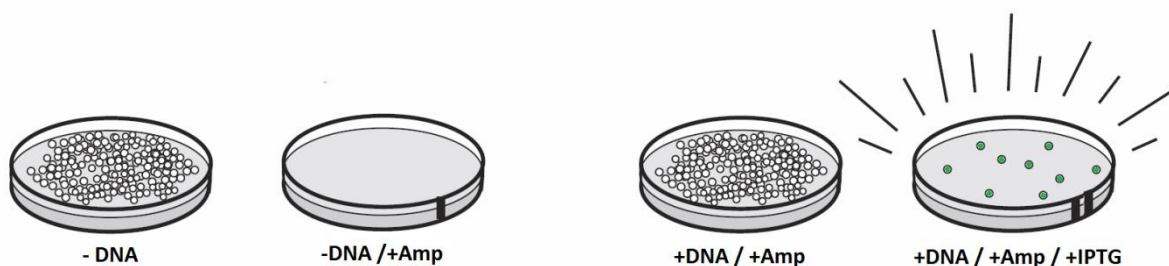
Inkubasjon over natt

Resultatvurdering og bestemmelse av transformasjonseffektivitet: ca 15 min.

### Resultatanalyse og diskusjonsspørsmål – fasit

1. Forventede resultater:
  - DNA                      Sterk bakterievekst som kan dekke hele overflaten (teppevekst) fordi det ikke er noen antibiotikaseleksjon. Hvite kolonier.
  - DNA/+Amp              Ingen vekst fordi agaren inneholder ampicillin mens plasmidet (pGFP) som gir ampicillinresistens ikke er tilstede. Cellene er derfor ampicillinsensitive.
  - +DNA/+Amp              Transformerte bakteriekolonier som uttrykker ampicillinresistensgenet og dermed kan vokse på agarskåler tilsatt ampicillin. Koloniene er hvite.
  - +DNA/+Amp/+IPTG      Transformerte bakteriekolonier som fluorescerer grønt under langbølget UV-lys. Bakteriene uttrykker ampicillinresistensgenet og kan dermed

vokse på agarskåler med ampicillin. I tillegg uttrykker bakteriene grønt fluorescerende protein (GFP) fordi agarmediet er tilsatt IPTG som er nødvendig for at *gfp*-genet skal uttrykkes.



2. I forsøket er det brukt 50 ng (0,05 µg) DNA pr. transformasjon, endelig volum er 500 µl (0,5 ml), utstrøket volum er 250 µl (0,25 ml).

$$\frac{\text{Antall transformanter}}{\mu\text{g DNA}} \times \frac{\text{Endelig volum (ml)}}{\text{utstrøket volum (ml)}} = \text{Antall transformanter per } \mu\text{g}$$

Eksempel dersom du teller 40 kolonier på +DNA/+Amp/+IPTG-skålen:

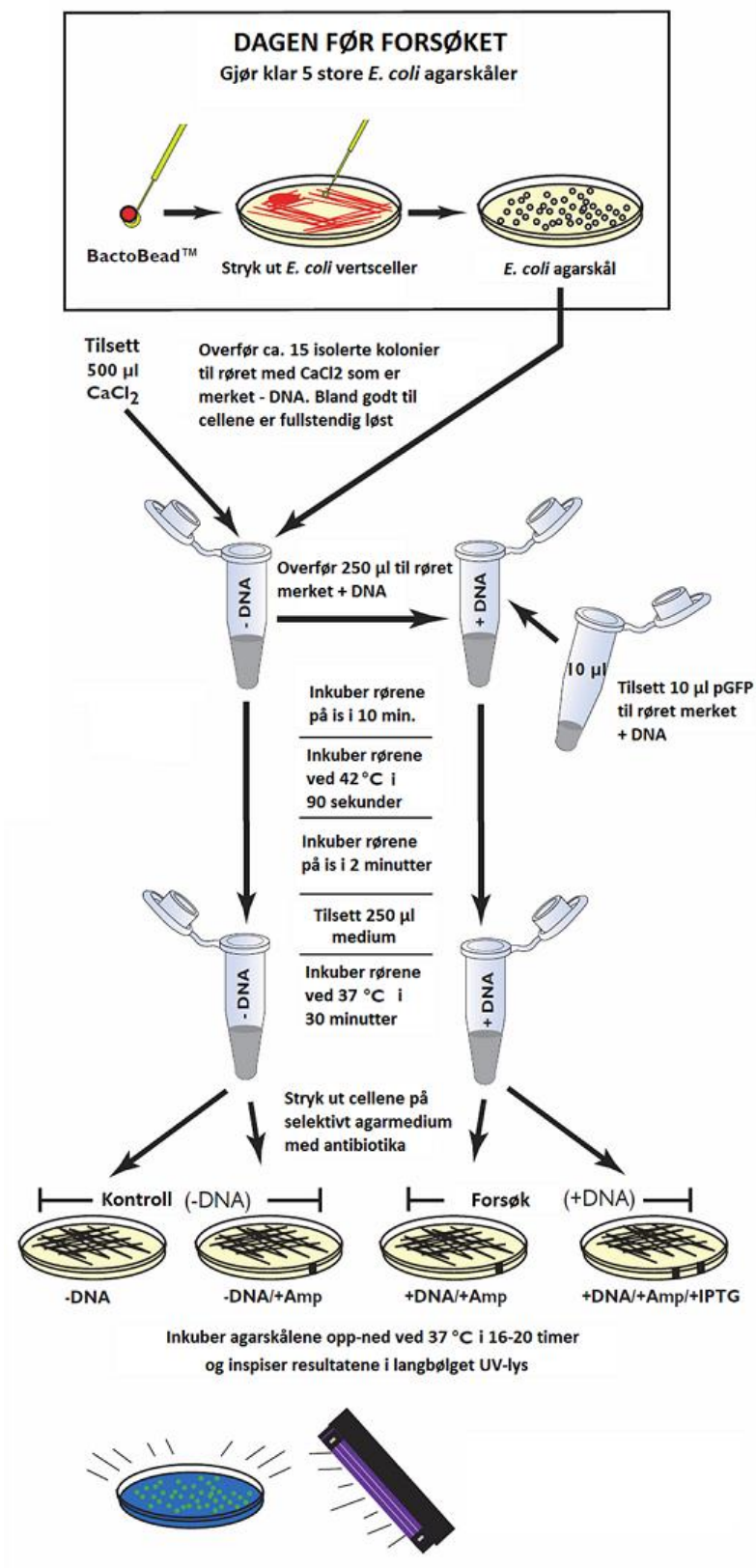
$(40 \text{ transformanter}/0,05 \mu\text{g}) \times (0,5 \text{ ml}/0,25 \text{ ml}) = 1600 (1,6 \times 10^3) \text{ transformanter pr. } \mu\text{g DNA}$

Transformasjonseffektivitet ligger normalt mellom  $1 \times 10^5$  og  $1 \times 10^8$  transformanter pr. µg DNA.

3. *E. coli* kan gjøres kompetente ved behandling med kloridsaltet av metallkationer som kalsium. I tillegg vil alternerende kulde- og varmesjokk øke kompetensen. Metallionene og de brå temperaturendringene påvirker strukturen og permeabiliteten til celleveggen og –membranen slik at DNA-molekylene kan passere gjennom.
4. Vekstmediet (Recovery Broth) inneholder ikke ampicillin for at cellene skal få muligheten til å reparere den delvis nedbrutte celleveggen og –membranen og uttrykke de nyervervede genene uten ytterligere, veksthemmende påkjenninger.
5. En vellykket transformasjon vil ha kolonier på agarskålene merket «+DNA / +Amp» og «+DNA/ +Amp / +IPTG». På sistnevnte skål vil koloniene fluorescere grønt i langbølget UV-lys da mediet inneholder IPTG som gjør at bakteriene uttrykker proteinet GFP.
6. Noen mulige feilkilder som årsak til mislykket transformasjon:
- Plasmid-DNA er ikke tilsatt til røret merket +DNA.
  - Bakterieceller er ikke tilsatt til røret merket +DNA.
  - Upresis timing av varmesjokk-trinnet (trinn 8 i elevveiledningen).
7. Kilden til fluorescens kommer fra proteinet GFP som er kodet for av genet *gfp* i plasmidet pGFP.

# ELEVVEILEDNING – TRANSFORMASJON AV *E. COLI* MED GFP

## Flytskjema – oversikt over forsøket

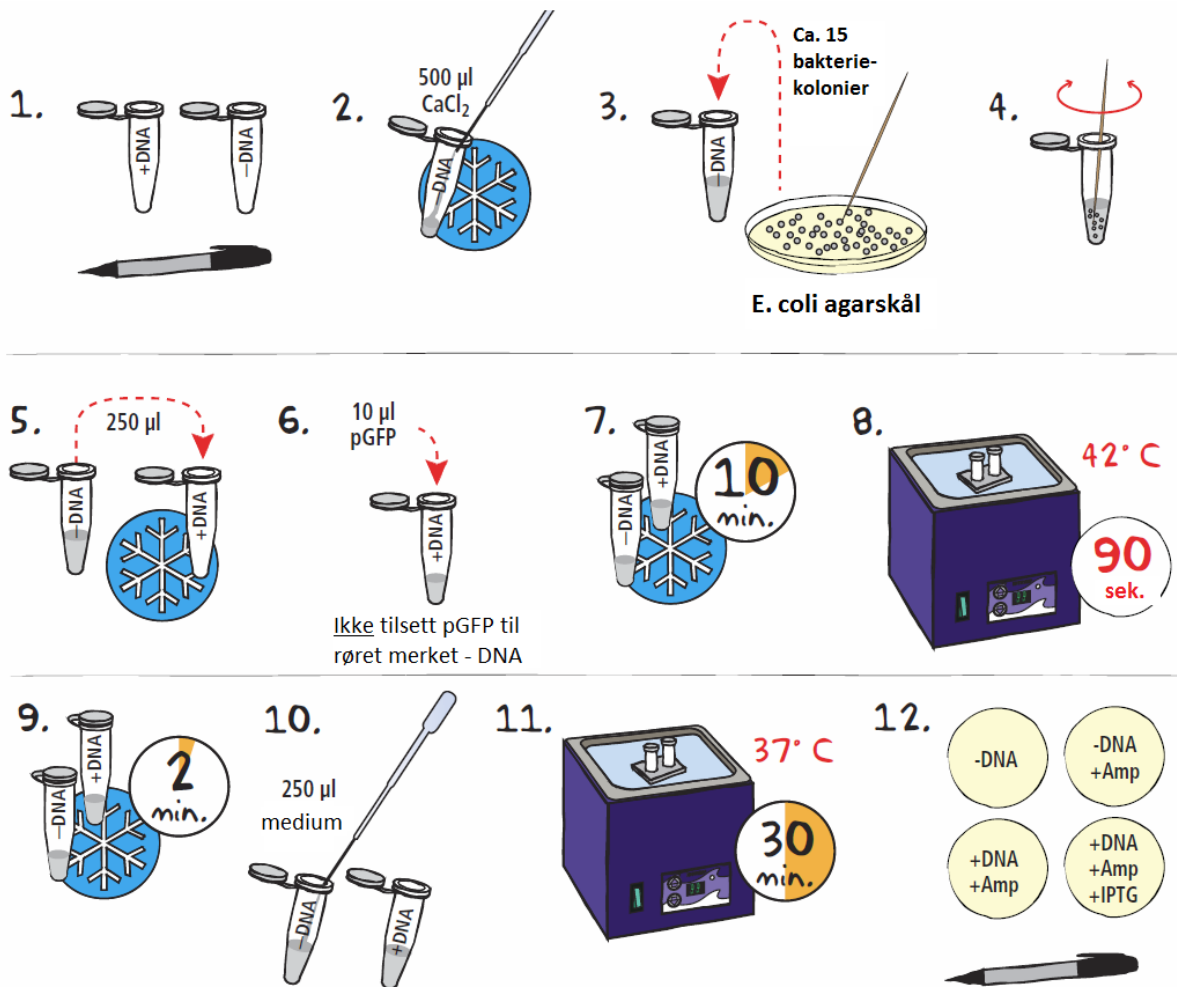


## Utførelse

### Laboratoriesikkerhet

Bruk hansker og vask hendene godt med såpe og vann etter å ha jobbet i laboratoriet.

### Transformasjon av *E. coli* med pGFP

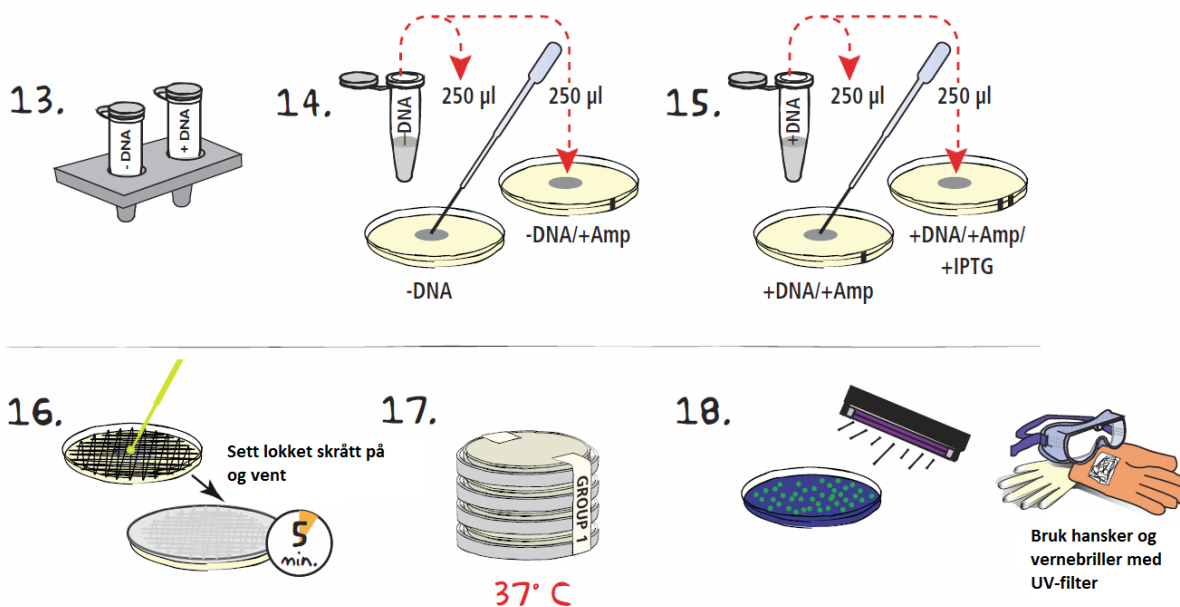


1. Merk et mikrosentrifugerør «+ DNA» og et annet «- DNA».
2. Overfør 500 µl iskald CaCl<sub>2</sub>-løsning til røret merket «- DNA».
3. Bruk en tannpirker til å overføre ca. 15 bakteriekolonier (hver koloni skal være 1-1,5 mm i diameter) fra en *E. coli* agarskål til røret merket «- DNA».
4. Gni tannpirkeren mot innsiden av røret for å løsne bakteriecellene. Resuspender cellene i CaCl<sub>2</sub>-løsningen ved å bruke en reagensrørrister eller pipettere opp og ned inntil det ikke er noen synlige celleklumper og celledensiteten er uklar.
5. Overfør 250 µl av celledensiteten til røret merket «+ DNA». Sett begge rørene på is.



6. Tilsett 10 µl pFluoroGreen DNA (pGFP) til røret merket «+ DNA». **Viktig! Ikke tilsett pGFP til røret merket «- DNA».**
7. Inkuber rørene på is i 10 minutter.
8. Inkuber deretter rørene i et 42 °C vannbad i **nøyaktig** 90 sekunder. Bruk stoppeklokke!
9. Sett rørene umiddelbart tilbake på is og inkuber i 2 minutter.
10. Pipetter 250 µl medium «recovery broth» til hvert rør. Bland forsiktig ved å flikke på røret med fingeren.
11. Inkuber cellene i et 37 °C vannbad i 30 minutter.
12. Mens cellene inkuberer merkes undersiden av fire agarskåler som vist i tabellen under. Merk også alle fire skålene med navn og labgruppe.

- DNA	Plate uten stripe
- DNA / + Amp	Plate med en stripe
+ DNA / + Amp	Plate med en stripe
+ DNA / + Amp / + IPTG	Plate med to striper



13. Flytt cellene fra punkt 11 fra vannbadet til et stativ på lab-benken etter de 30 minuttene har gått.
14. Pipetter 250 µl cellesuspensjon fra røret merket «- DNA» til midten av hver av agarskålene merket «- DNA» og «- DNA / + Amp».
15. Pipetter 250 µl cellesuspensjon fra røret merket «+ DNA» til midten av hver av agarskålene merket «+ DNA / + Amp» og «+ DNA / + Amp / + IPTG». **Viktig! Bruk en ren pipettespiss.**
16. Stryk ut cellene over hele overflaten på agarskålene ved å bruke en podenål (inokuleringsløkke). Bruk én podenål til å stryke ut begge «- DNA»-prøvene og en ny podenål til å stryke ut «+ DNA»-prøvene. Sett lokket skrått på slik at skålene er nesten helt dekket og vent 5-10 minutter til cellesuspensjonen har trukket inn i agaren.

17. Sett lokket på alle skålene og stable dem oppå hverandre. Teip dem sammen og plasser stabelen opp-ned (med agarsiden øverst) i en 37 °C inkubator. Inkuber skålene i 16-20 timer (til neste dag). La skålene stå lenger dersom det ikke er noe bakterievekst.
18. Undersøk agarskålene for transformanter under langbølget UV-lys og fyll ut skjemaet under:

	- DNA	- DNA / + Amp	+ DNA / + Amp	+ DNA / + Amp / + IPTG
<b>Antall kolonier</b>				
<b>Kolonienes farge under UVA-lys</b>				

### **Avfallshåndtering**

Alt avfall som inneholder eller har vært i kontakt med genmodifiserte organismer (dvs. agarskåler, pipetter, podenåler, mikrosentrifugerør etc.) destrueres/inaktiveres ved en av to følgende metoder:

- Autoklaving ved 121 °C i 20 minutter
- Kjemisk inaktivering i 10 % klorinløsning: Tilsett 1 dl klorin til 9 dl vann. Legg alt materialet som skal destrueres i klorinløsningen i minimum 1 time (eller over natt). Bruk hansker, labfrakk og vernebriller.

Etter inaktivering kan avfallet kastes som restavfall/skylles ut i vasken.

### **Resultatanalyse og diskusjonsspørsmål**

- Beskriv resultatene på de ulike skålene. Hvordan er bakterieveksten på hhv. transformasjonsskålene og kontrollskålene?
- Transformasjonseffektiviteten er et mål på antallet transformerte celler pr. 1 µg DNA. Den indikerer derfor hvor vellykket transformasjonsforsøket har vært. Tell antall kolonier på agarskålen merket +DNA / +Amp / +IPTG. Bestem dretter transformasjonseffektiviteten ved bruk av formelen under.

$$\frac{\text{Antall transformanter}}{\mu\text{g DNA}} \times \frac{\text{Endelig volum (ml)}}{\text{utstrøket volum (ml)}} = \text{Antall transformanter per } \mu\text{g}$$

I forsøket er det brukt 50 ng (0,05 µg) DNA pr. transformasjon

Endelig volum er 500 µl (0,5 ml)

Utstrøket volum er 250 µl (0,25 ml)

3. Eksogent DNA kan ikke passivt trenge inn i *E. coli*-celler som ikke er kompetente. Hvilken behandling gjør cellene kompetente?
4. Hvorfor inneholder ikke vekstmediet (Recovery Broth) ampicillin?
5. Hvordan kan du se at transformasjonen har vært vellykket?
6. Nevn noen mulige feilkilder som årsak til mislykket transformasjon.
7. Hva er kilden til fluorescensen?