

HANDS ON BIOTECH

EKSPERIMENT 5

Biodiversitet i jordprøver

LONE ALS EGEBO
LARS HAASTRUP PEDERSEN

TEORI
ELEVVEJLEDNING
LÆRERVEJLEDNING

EKSPERIMENT 5

Biodiversitet i jordprøver

Hands on Biotech – Biodiversitet i jordprøver

© Lone Als Egebo, Lars Haastrup Pedersen, Aalborg Universitet

Forfattere og faglig redaktion:

Lone Als Egebo og Lars Haastrup Pedersen

Illustrationer: Lotte Thorup

Kemiske strukturtegninger og reaktionsskemaer: Hanne Wolff

BioRender-illustrationer: se kildeliste

Omslag: Lotte Thorup

Shutterstock.com: Chokniti-Studio

Grafisk tilrettelægning: Lotte Thorup

1. udgave, 1. oplag 2023

ISBN: 978-87-89383-95-8

Udgivet af Aalborg Universitet – Institut for Kemi og Biovidenskab

Projektet er støttet af Novo Nordisk Fonden.

Kildeliste findes på projektets hjemmeside:

<https://www.bio.aau.dk/forskning/projekter/hands-on-biotech>

Dette hæfte er beskyttet i medfør af gældende dansk lov om ophavsret. Kopiering må kun ske i overensstemmelse med loven. Det betyder f.eks. at kopiering til undervisningsbrug kun må ske efter aftale med Copydan Tekst og Node.



Ege-Bøger



Indhold

FORORD	5
TEORI	7
Ribosomer og 16S-rRNA-genet.....	8
Oprensning af DNA.....	8
Fluorometri	9
Vask af PCR-produkt.....	10
Nanoporesekventering.....	10
Bioinformatik	12
Arbejdsspørgsmål	12
ELEVVEJLEDNING	13
Flow.....	13
DEL A - EKSTRAKTION OG OPRENSNING	
AF DNA FRA JORDPRØVE	14
Materiale pr. gruppe	14
Fremgangsmåde.....	16
DEL B - MÅLING AF DNA-KONCENTRATION	17
Materialer	17
Fremgangsmåde.....	18
DEL C - OPFORMERING AF BAKTERIELT 16S-DNA.....	19
Materialer	19
Fremgangsmåde.....	20
DEL D - OPRENSNING AF OPFORMERET 16S-DNA.....	22
Materialer	22
Fremgangsmåde.....	22
DEL E - MÅLING AF DNA-KONCENTRATION	
EFTER PCR-OPRENSNING.....	24
Materialer og fremgangsmåde.....	24
DEL F - SEKVENTERING OG BASE-CALLING AF 16S-DNA	24
Tidsforbrug.....	24
Materialer	24
Fremgangsmåde.....	25
Øveopgave: Load prøver i brugte Flongle-flowceller	26
DEL G - DATABEHANDLING FRA SEKVENTERING	30
Fremgangsmåde.....	30
Efterbehandling	32
ARBEJDSARK	33
LÆRERVEJLEDNING	35
Læreplanen.....	35
Teori.....	35
Flow.....	36
Kommentarer til eksperimentet	36

Forord

Dette hæfte **Biodiversitet i jordprøver** er skrevet i tilknytning til udviklingsprojektet 'Hands on Biotech', der er støttet af Novo Nordisk Fonden. Projektet er et samarbejde mellem Aalborg Universitet, Institut for Kemi og Biovidenskab, og konsulentfirmaet Ege-bøger.

Materialet er målrettet undervisningen i bioteknologi/biologi i gymnasiet.

I projektet har deltaget lærere fra følgende nordjyske gymnasier: Aalborg Katedralskole, Aalborghus Gymnasium, Frederikshavn Gymnasium, Hasseris Gymnasium, Hjørring Gymnasium og Thisted Gymnasium.

Fagområdet bioteknologi omhandler teknologisk udnyttelse af biologiske systemer. I 'Hands on Biotech' er der arbejdet med bioteknologien inden for tre hovedområder:

- Fermentering og cellen som fabrik
- Separation og oprensning
- DNA-analyser

Nærværende hæfte knytter sig til hovedområdet 'DNA-analyser', og består af teori, elevvejledning og lærervejledning til forsøget **Biodiversitet i jordprøver**.

En særlig tak skal rettes til Jørn Clausen, Aalborghus Gymnasium.

Susan Hove Hansen, Racika Kirshnakumar, Nicolai Sundgaard Bekker, Celine Petersen og Rasmus Hansen Kirkegaard, AAU.

Studertermedhjælpere: Anne Johansen, Anne Kalinka Sand Knudsen, Isabell Raahauge Eriksen, Marie Riisgaard-Jensen, Mikkel Lyng Berndorf, Rikke Brønnum Nielsen, Sofie Zacho Vestergaard, Søren Heidelberg.

Lars Hastrup Pedersen,
Leder af projektet
Lektor, Ph.D.
Institut for Kemi og Biovidenskab
Aalborg Universitet

Lone Als Egebo,
Koordinator for projektet
Forfatter, Cand. Scient.
Ege-bøger – Formidling af naturvidenskab

E K S P E R I M E N T 5

Biodiversitet i jordprøver

En høj biodiversitet, det vil sige en stor mangfoldighed af liv, har afgørende betydning for stabiliteten af jordens økosystemer. Samtidig er beskyttelse af livet på land og bæredygtig udnyttelse af jorden en forudsætning for at kunne brødføde klodens stadigt voksende befolkning. Mikrobielle processer og omsætning af organisk stof i jorden er grundlaget for nitrogens kredsløb, som har direkte effekt på både vilde planters og landbrugsafgrøders vækst.

Kendskab til jordtypers mikrobielle biodiversitet er derfor en vigtig forudsætning for ansvarlig og bæredygtig naturforvaltning.

I økosystemer på land er biodiversiteten udfordret flere steder på kloden, se figur 1, hvor fx landbrugsjord udpines, skove fældes, og klimaforandringer skaber oversvømmelser, skovbrande og ørkendannelse.

Foto ikke tilgængelig.
Kan ses i den trykte udgave.

Figur 1. Landbrugsjord.

I dette eksperiment er formålet at oprense og sekventere bakterielt DNA fra forskellige jordprøver for at sammenligne jordtypernes bakterielle artsdiversitet. Artsdiversiteten af bakterier antages at være et mål for jordens generelle biodiversitet.

Alle eksperimenter og den tilhørende teori i Hands-on-Biotech-projektet forholder sig til FN's verdensmål for bæredygtig udvikling. I nærværende case bringes følgende verdensmål i spil, se figur 2.



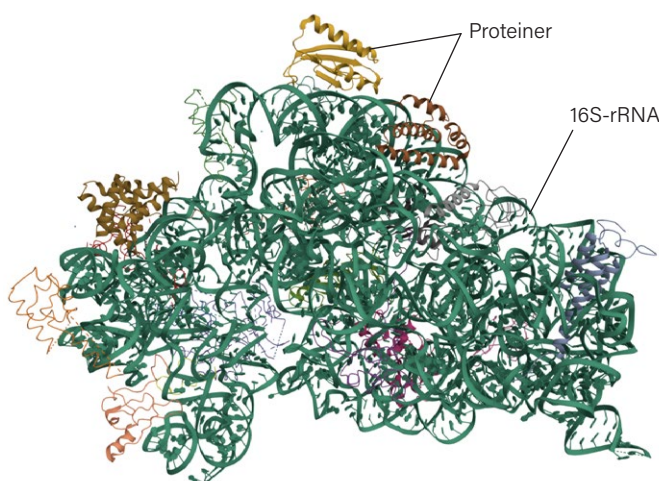
Figur 2. FN-verdensmål relevante i forhold til eksperimentet 'Biodiversitet i jordprøver'.

Ribosomer og 16S-rRNA-genet

Alle levende organismers celler indeholder ribosomer. Ribosomer er komplekse strukturer, hvor proteinsyntese foregår. Ribosomerne er selv opbygget af proteiner samt RNA-molekyler, der betegnes *ribosomalt RNA* (rRNA). Det har vist sig, at gener, der koder for rRNA, er særligt velegnede til at studere slægtskab mellem arter. I eksperimentet 'Biodiversitet i jordprøver' oprenses og sekventeres derfor DNA, der koder for ribosomalt RNA (rRNA) hos bakterier.

Når rRNA-gener er så velegnede til at studere slægtskab, skyldes det, at de findes hos alle arter, og at de koder for en veldefineret funktion. Det har endvidere vist sig, at mutationer forholdsvist sjældent videreføres i disse gener, hvilket understreger, at de har en central funktion for cellen. Endelig har rRNA-generne en passende længde til at give et nuanceret billede af det evolutionære slægtskab.

Ribosomer er sammensat af to enheder, der henholdsvis kaldes den store og den lille *subunit*. Figur 3 viser den lille subunit, og her ses bl.a. 16S-rRNA-molekylet. Dette RNA-molekyle har en strukturel betydning, og det definerer de ribosomale proteiners placering. Desuden baseparrer 16S-rRNA med mRNA-molekyler ved deres interaktion med ribosomet, så det sikres at mRNA placeres korrekt i ribosomet forud for en translation.



Figur 3. Subunit af ribosom med 16S-rRNA og proteiner fra en bakterie.

Hos bakterier har genet, der koder for *16S-rRNA*, vist sig velegnet til slægtskabsstudier. Genet har en længde på ca. 1550 basepar, og det indeholder velbevarede sekvenser, som er ens for stort set alle prokaryoter. Disse sekvenser gør det muligt at fremstille velegnede primere, der kan anvendes til opformering af DNA ved teknikken PCR. Samtidig indeholder genet nogle regioner med ekstrem stor variation, som derfor giver helt artsspecifikke sekvenser.

16S-rRNA-gensekventering er udbredt som et hurtigt og billigt alternativ til traditionelle metoder til bakterieidentifikation.

Oprensning af DNA

For at kunne sekventere DNA skal det først ekstraheres fra bakteriecellerne og oprenses. I eksperimentet 'Biodiversitet i jordprøver' sker det i fire trin, hvor DNA'et oprenses ved hjælp af små søjler, der kan centrifugeres for at presse DNA-holdig væske igennem. De kaldes spinkolonner, se figur 4.

De fire trin er:

1. Lysering
2. Binding til søjle
3. Vask
4. Eluering fra søjle

Lysering: Først blandes jordprøven med enzymholdig lyseringsvæske, der opløser bakteriernes celledækkelse. Prøven rystes kraftigt (ved hjælp af en vortexer), og cellerne ødelægges derved både enzymatisk og mekanisk. Dernæst tilsættes en række reagenser, som får andre stoffer end DNA, fx protein og humusstoffer, til at fælde ud.

Binding til søjle: Opløsningen uden bundfald overføres til en søjle, der er fremstillet af et materiale, der binder DNA, mens andre cellebestanddele blot gennemløber søjlen.

Vask: Mens DNA stadig er bundet til søjlen, vaskes den med en vaskebuffer.

Eluering fra søjle: Til sidst tilsættes en buffer, der eluerer (det vil sige frigiver) DNA'et fra søjlen.

DNA-ekstraktet skal inden sekventering opformeres ved hjælp af metoden PCR, som ikke beskrives nærmere her.

Fluorometri

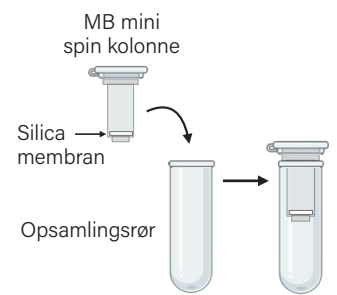
Både før og efter opformering ved PCR kvantificeres mængden af DNA, så det tjekkes, at der er tilstrækkeligt med DNA til den senere sekventering. Til det formål anvendes metoden *fluorometri*.

Fluorometri minder om spektrofotometri, idet koncentrationen af et stof også måles ved hjælp af lys. Fluorometri er dog mere specifik for stoffer som DNA, RNA og protein, der alle absorberer i uv-området og derfor ikke kan kvantificeres så præcist ved hjælp af spektrofotometri, når de optræder sammen i en blanding.

Til fluorimetrisk måling anvendes et Qubit™ fluorometer, se figur 5. Forud for en måling udføres et *assay*, det vil sige en analytisk procedure. En prøve tilsættes en opløsning, der indeholder et fluorescerende farvestof, der binder sig specifikt til DNA. At farvestoffet er *fluorescerende*, betyder at det udsender lys af en bestemt farve, når det selv absorberer lys. Det fluorescerende farvestof er valgt, så det har en ekstrem lav fluorescens, indtil det bindes til et DNA-molekyle.

Fluorometeret udsender lys, og når en klargjort prøve placeres i apparatet, måles intensiteten af fluorescens i prøven. Der er ligefrem proportionalitet mellem intensitet af fluorescens og koncentration af DNA i opløsningen. Fluorometeret måler prøvens fluorescens og omregner det til en DNA-koncentration ved hjælp af standardprøver med kendte koncentrationer af DNA.

Qubit™ fluorometeret kan også bruges til at måle koncentrationen af fx protein eller RNA i en prøve, hvortil der anvendes andre fluorescerende farvestoffer, der bindes specifikt til disse stoffer. Derfor kan koncentrationen af hhv. DNA, RNA og proteiner måles helt uafhængigt af hinanden i en blanding.



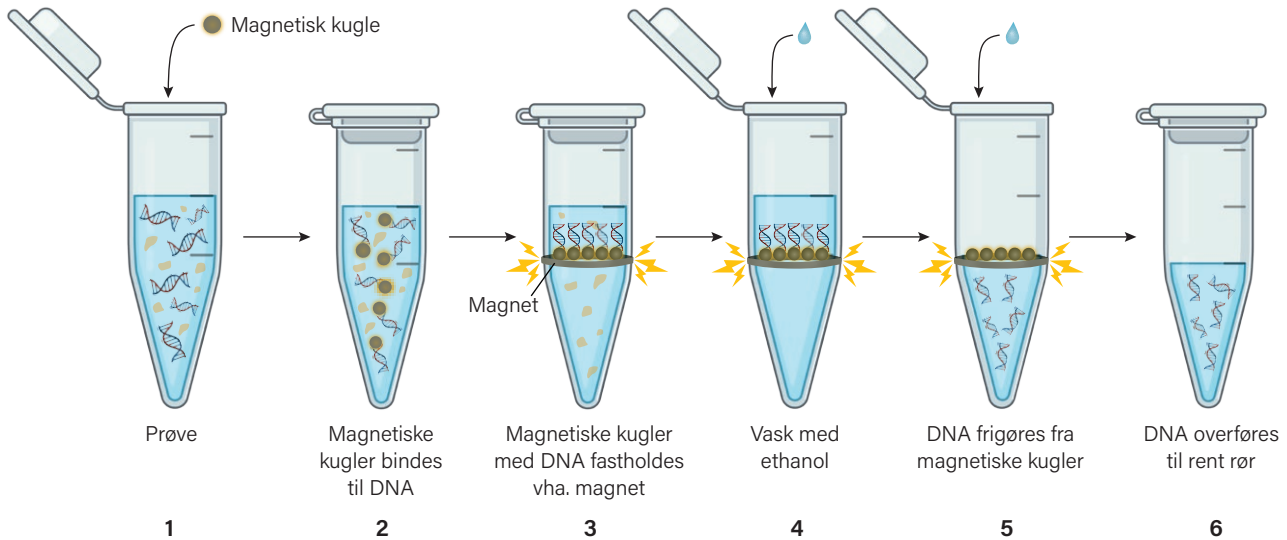
Figur 4. Små søjler (kolonner) til oprensning af DNA.



Figur 5. Qubit™ fluorometer.

Vask af PCR-produkt

Efter DNA er blevet opformeret ved hjælp af PCR, skal det vaskes fri af urenheder. Det sker ved hjælp af en teknik, hvor der anvendes små magnetiske kugler, som binder DNA, se figur 6.

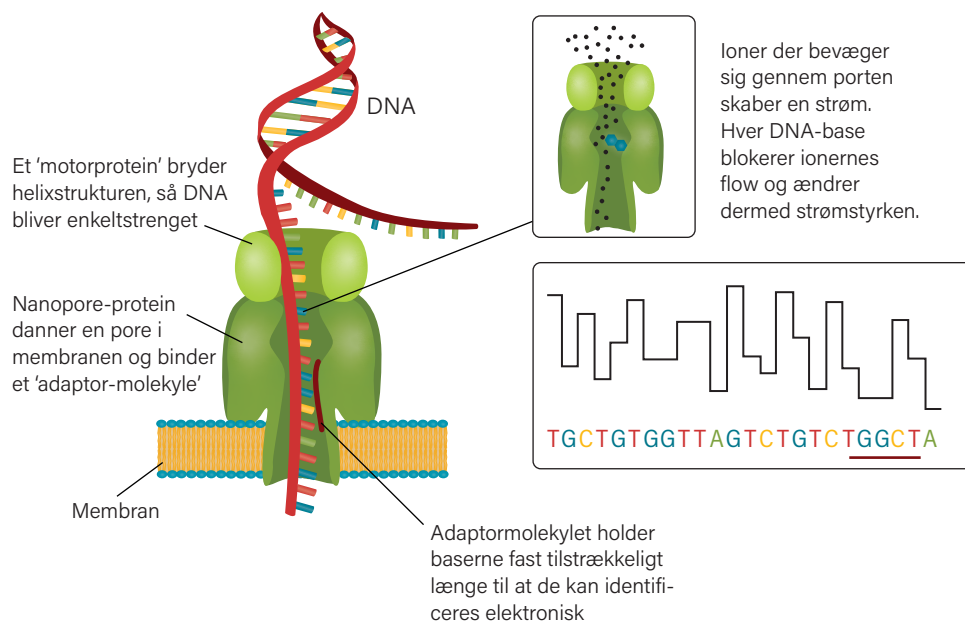


Figur 6. Vask af PCR-opformeret DNA ved hjælp af magnetiske kugler.

Det ses, at prøven tilsættes nogle små magnetiske kugler. De er fremstillet, så de specifikt binder til DNA (punkt 1 og 2). Prøven anbringes derefter på en magnetholder, som fastholder de magnetiske kugler, hvortil DNA er bundet (punkt 3). Væsken med urenheder fjernes, og der tilsættes i stedet ethanol (punkt 4). Der vaskes et par gange med ethanol, og væsken fjernes. Røret med de DNA-bundne magnetiske kugler fjernes nu fra det magnetiske separationsstativ og tilsættes en elueringsbuffer. Derved frigøres DNA'et fra de magnetiske kugler, og når opløsningen igen placeres på det magnetiske separationsstativ, befinder DNA sig frit i væsken, mens de magnetiske kugler fastholdes (punkt 5). Opløsningen med DNA kan nu overføres til et rent rør (punkt 6). Efter nyt tjek af DNA-indhold vha. fluorometri er prøven klar til sekventering.

Nanoporesekventering

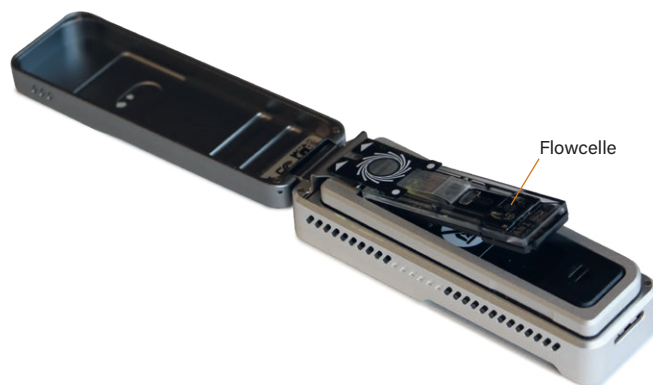
Til bestemmelse af baserækkefølgen af oprenset og PCR-opformeret DNA er der blevet udviklet en lang række forskellige sekventeringsteknologier. I eksperimentet 'Biodiversitet i jordprøver' benyttes Oxford Nanopore Technology Sekventering. I daglig tale kaldes det *ONT-sekventering* eller *nanoporesekventering*. Det er en teknologi, hvor enkeltstregede DNA-stykker sendes gennem nanoporer i en kunstig membran. Nanoporer er små huller i nanostørrelse, der er omkranset af protein. Ved at påføre en spænding hen over membranen registreres små ændringer i den elektriske strøm, idet nucleotider på DNA-strengen passerer gennem nanoporen. Hver af de fire DNA-baser (A, C, T eller G) skaber en forskellig ændring i den elektriske strøm. Signaler fra membranen kan derfor 'oversættes' til en basesekvens i en proces, der kaldes *base-calling*, se figur 7.



Figur 7. DNA-sekventering ved hjælp af nanoporeteknologi.

Som det også ses på figuren, anvendes et såkaldt motorprotein. Dette protein tilsættes i forbindelse med klargøring af DNA-prøverne, og det sikrer, at det dobbeltstrengede DNA sendes gennem poren som enkeltstrengt DNA, først den ene streng fra 5'-3'-enden, og derefter den modsatte streng også fra 5'-3'-enden uanset DNA-molekylets længde.

Udstyret til nanoporesekventering består af en såkaldt minION, som er en ca. 10 cm lang boks, se figur 8.



Figur 8. MinION til nanoporeskventering.

I denne findes en *flowcelle*, der indeholder nanoporemembranerne. Inden sekventering skal flowcellen klargøres (på engelsk 'priming') og skylles igennem med en buffer, der er tilsat kopier af en lille fasthæftningssekvens (på engelsk 'tethers'). Disse små sekvenser sidder jævnt fordelt på overfladen af membranen og holder kortvarigt DNA-stykkerne fast, så de guides mod nanoporen og undgår at blive skyllet væk. Teknologien er banebrydende i forhold til tidligere metoder til DNA-sekventering og har betydet, at mange flere kan få mulighed for at analysere genomisk DNA på grund af den forholdsvis lave pris og håndterbare størrelse på apparatet.

Bioinformatik

Efter sekventering kan DNA-sekvenserne analyseres med forskellige computerteknikker. Denne disciplin kaldes for *bioinformatik* og involverer ofte, at organismer identificeres ved sammenligning med kendte DNA-sekvenser i databaser.

Der bruges bestemte programmeringsværktøjer – såkaldte '*tools*' – til analysen. Tools kan hjælpe med at organisere DNA-sekvenser, fx ved at samle små til større sekvenser eller til komplette genomer. De kan også sammenligne sekvenser og genomer med gensekvens-databaser såsom fx GenBank. Med andre ord kan tools være med til at løse mysteriet om, hvilke mikroorganismer der findes DNA fra i en tilfældig jordprøve.

EPI2ME er et online tool, der hurtigt analyserer sekventeringsdata for at identificere bakteriearter og bakterieslægter. Når *EPI2ME* identificerer bakterier, sammenligner den de 16S-DNA-sekvenser, som blev fundet under sekventeringen af prøven (base-called-sekvenser), med sekvenser i en bakterie-16S-gen-database fra det Nationale Center for Bioteknologi Information (NCBI).

Hvis en sekvens fra en prøve er identisk med – eller ligner tilpas meget en sekvens fra databasen – er der et '*match*', og *EPI2ME* oplyser navnet på bakterien. De sekvenser fra prøven, som ikke kan findes i databasen, rapporteres som '*unclassified*'. Det kunne fx være arter af bakterier, der endnu er ukendte, eller blot at sekvenserne ikke har været tilstrækkeligt komplette til at opnå et match i databasen.

Efter *EPI2ME* har fundet alle matches, samles alle identificerede bakterier i en oversigt og genererer et fylogenetisk træ, hvor det kan ses, hvor beslægtet bakterierne i prøven er.

Der er også mulighed for at følge med i forekomsten af bakterierne i prøven (kaldet '*abundance*') – dvs. hvor mange gange, der er fundet et match til den samme bakterie i databasen. En høj *abundance* er udtryk for, at der er DNA fra mange organismer af samme art i prøven.

Arbejdsspørgsmål

1. Definér begrebet biodiversitet.
2. Forklar betydningen af henholdsvis en lav eller en høj biodiversitet for et økosystem.
3. Hvorfor bruges DNA-sekvenser til at identificere bakterier frem for andre metoder?
4. Hvorfor er 16S-rRNA-genet hos bakterier særligt velegnet til at identificere dem?
5. Hvilke processer skal der til for at få oprenset DNA fra en bakterie?
6. Hvilke fordele er der ved at anvende et Qubit-fluorometer til bestemmelse af DNA-koncentrationer sammenlignet med andre spektrofotometriske metoder?
7. Forklar hvordan en nanopore kan bestemme sekvensen af et DNA-molekyle.
8. En nanoporesekventeringsmaskine er ret billig og koster mindre end en smartphone. Inden for hvilke analyseområder kan man forestille sig, at nanoporesekventering anvendes eller vil blive anvendt i fremtiden?
9. Forklar hvordan man ved hjælp af bioinformatik kan identificere en bakterie ud fra en DNA-sekvens.

EKSPERIMENT 5

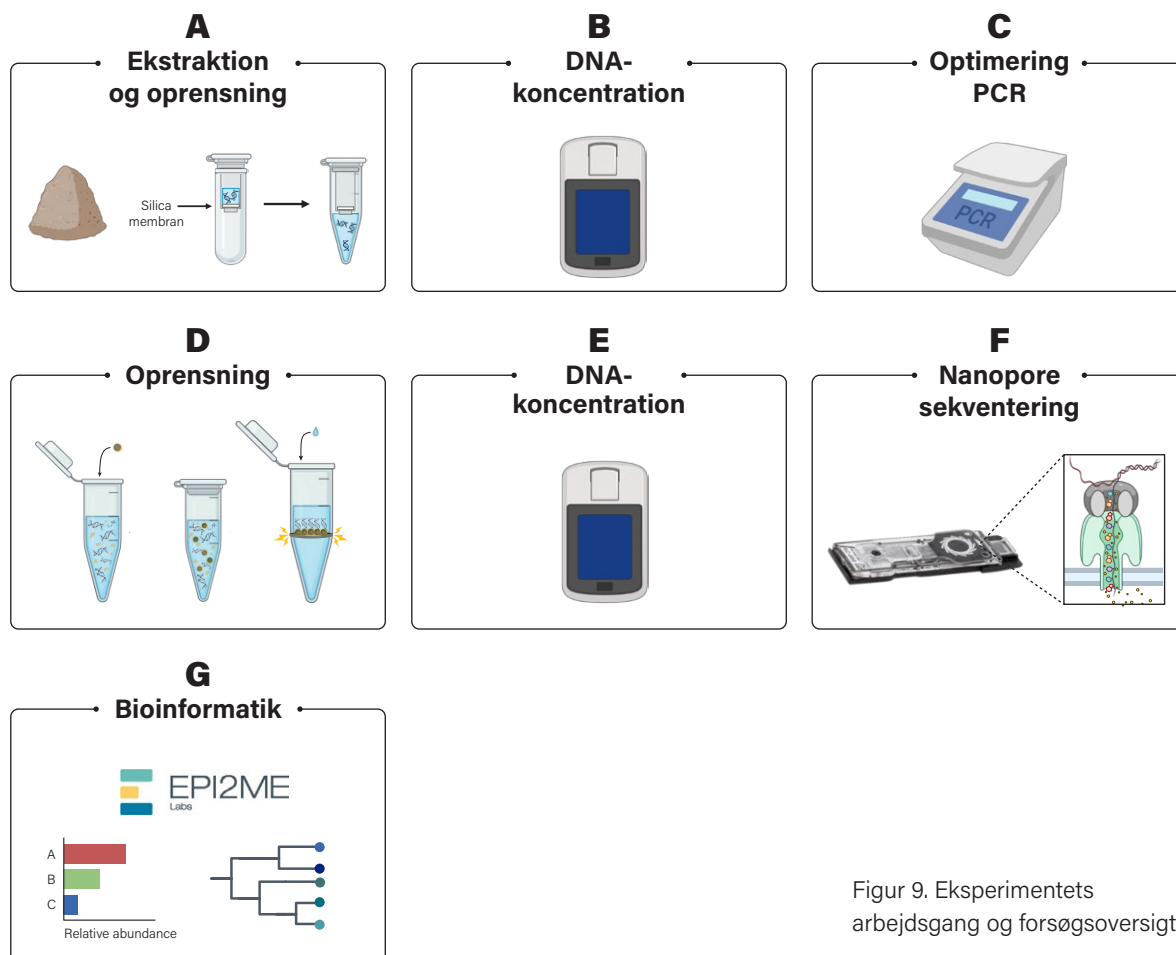
Biodiversitet i jordprøver

I dette eksperiment er formålet at oprense og sekventere bakterielt DNA fra forskellige jordprøver for at sammenligne jordtypernes artsdiversitet. Artsdiversiteten af bakterier er en del af jordens generelle biodiversitet.

Flow

Eksperimentet har følgende flow og tidsforbrug, se også figur 9:

- DEL A – Ekstraktion og oprensning af DNA fra jordprøve – 90 min.
- DEL B – Måling af DNA-koncentration – 20 min.
- DEL C – Opformering af bakterielt 16S-DNA – 60 min. + 100 min. til PCR
- DEL D – Oprensning af opformeret 16S-DNA – 45 min.
- DEL E – Måling af DNA-koncentration efter PCR-oprensning – 20 min.
- DEL F – Sekventering af bakterielt 16S-DNA – 45 min. + (24-72 timers sekventering)
- DEL G – Bioinformatik – 90 min.



Figur 9. Eksperimentets arbejdsgang og forsøgsoversigt.

DEL A - Ekstraktion og oprensning af DNA fra jordprøve

Formålet med DEL A er at ekstrahere DNA fra biologisk materiale i jordprøver og efterfølgende separere DNA'et fra jordprøvens øvrige bestanddele.

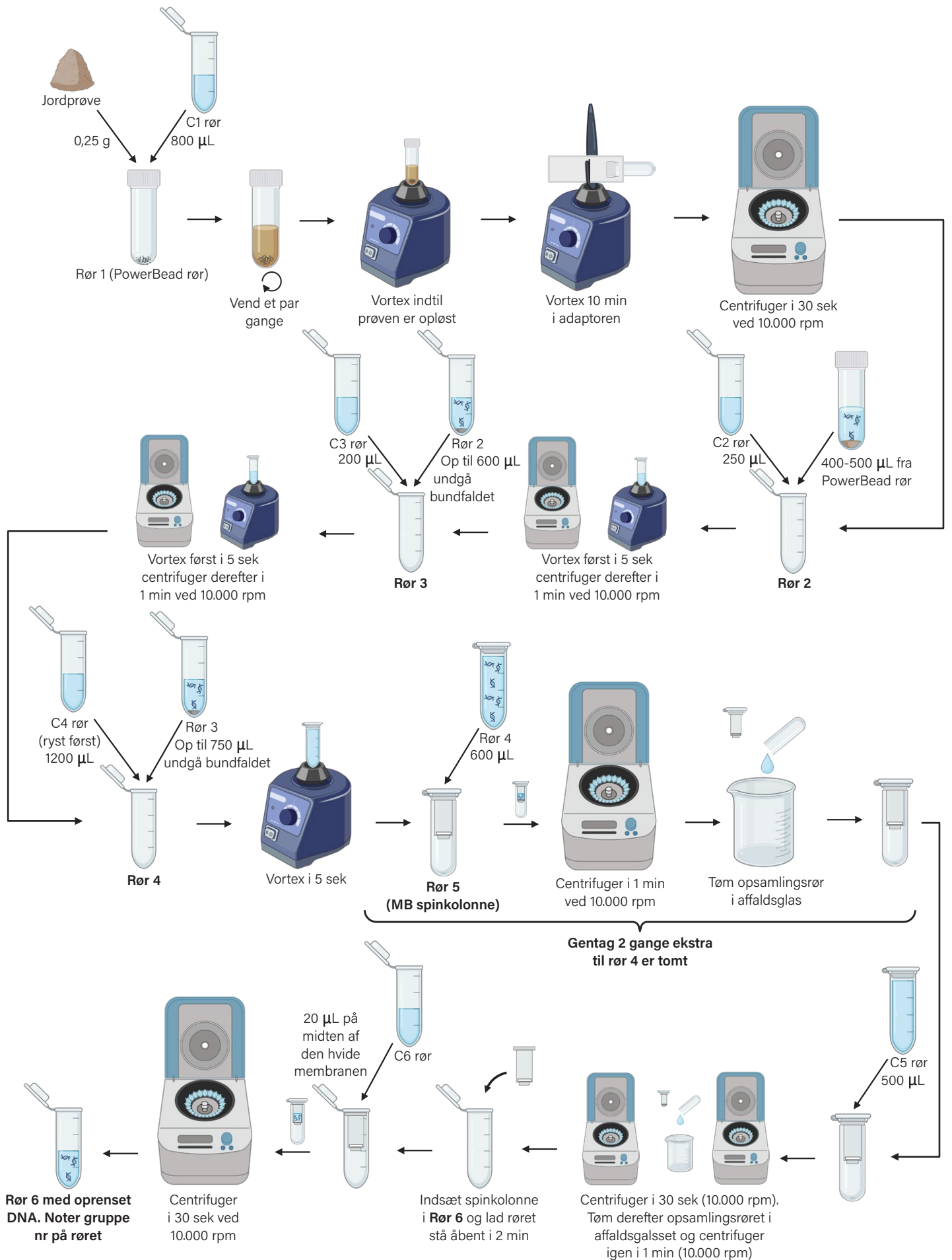
Materiale pr. gruppe

- 0,25 g frisk jordprøve (havejord eller landbrugsjord) uden hverken for meget sand eller for meget vand
- DNeasy PowerSoil Kit (antal per prøve, der skal analyseres):
 - 1 stk. PowerBead rør (indeholder perler som findeler cellevægge mekanisk)
 - 4 stk. 2 mL Eppendorfrør
 - 1 stk. MB Spin-kolonne med opsamlingsrør (indeholder silica-filter, som kan binde DNA)
- Reagenserne C1-C6 (volumen per prøve der skal analyseres):

Reagens	Volumen (µL)	Funktion
C1	800	Opløser cellemembran.
C2	250	Udfælder protein som kan fjernes med pellet. SKAL opbevares på køl.
C3	200	Udfælder andre forurenende stoffer herunder humussyrer. C3-reagens kan udfælde. I så fald opvarmes den til 60 °C til den opløses.
C4	1200	Vaskebuffer der indeholder ethanol og binder DNA til kolonnens silica-filter og fjerner proteiner.
C5	500	Ethanol og guanidin-HCl til binding af DNA til silica-filter og udvask af resterende proteiner.
C6	50	Buffer til opløsning og opbevaring af DNA.

- Vortexer (max speed)
- Adapter til Vortex: Pen med lommeclips og rundt hoved med skumplastplade med huller
- Centrifuge til 2 mL samlerør (10.000 rpm) (deles imellem grupper)
- Mikropipetter + pipettespidser (20-200 µL, 100-1000 µL)
- Glas til opsamling af affald og et til kemikalierester
- Handsker

Flowdiagram, se figur 10, (sæt eventuelt krydser efterhånden som trinene fuldføres):



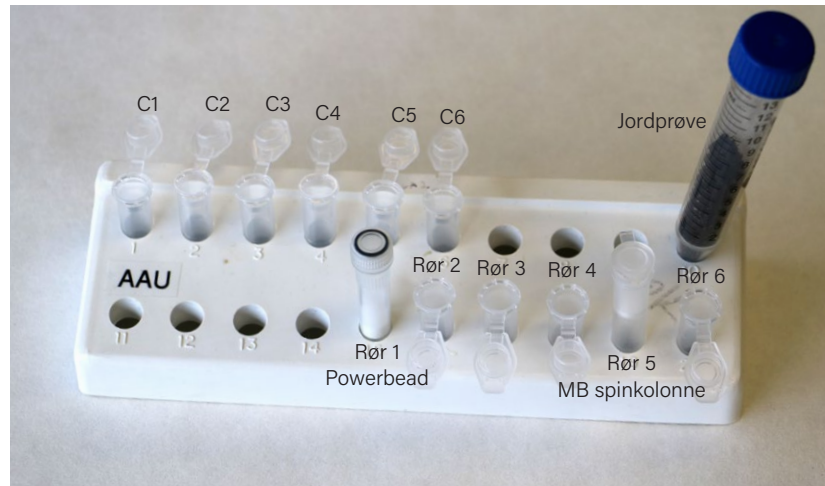
Figur 10. Oversigt over arbejdsgang DEL A.

Fremgangsmåde

Generelt: Brug handsker og skift pipettespids mellem hver pipettering, så prøven og reagenser ikke forurenes med DNA eller nucleaser. Hold orden og opsaml pipettespidser o.l. i affaldsglasset.

Der er mange punkter. Kryds af undervejs. Vær omhyggelig og hold styr på rør og reagenser.

1. For hver prøve mærkes følgende rør med nummer og gruppenummer, se figur 11:



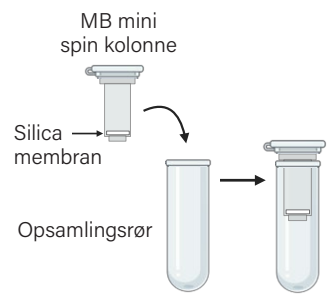
Figur 11. Forberedelse af rør og reagenser.

- Rør 1: 1 stk. PowerBead rør
 - Rør 2: 2 mL Eppendorfrør
 - Rør 3: 2 mL Eppendorfrør
 - Rør 4: 2 mL Eppendorfrør
 - Rør 5: 1 stk. MB Spin-kolonne med opsamlingsrør
 - Rør 6: 2 mL Eppendorfrør
2. Tilsæt 800 μ L **C1** til **rør 1** (PowerBead-røret).
 3. Tilsæt 0,25 g prøve til PowerBead-røret.
 4. Vend røret nogle gange og Vortex røret i oprejst position, indtil prøven er opløst.
 5. Monter PowerBead-røret (evt flere grupper sammen) i Vortex-adaptoren i vandret position, se figur 12.
 6. Sæt adaptoren i Vortexeren og vortex prøverne ved max hastighed i 10 minutter.
 7. Centrifuger rørene ved 10.000 rpm i 30 sek.
 8. Overfør forsigtigt 400-500 μ L supernatant (dvs. væsken over bundfaldet) til **rør 2** (2 mL Eppendorfrør). Der kan være lidt urenheder i supernatanten.
 9. Tilsæt 250 μ L **C2**. Vortex i 5 sek.
 10. Centrifuger ved 10.000 rpm i 1 min.
 11. Overfør op til 600 μ L supernatant til **rør 3** (nyt 2 mL Eppendorfrør). Undgå at få pellet (bundfaldet) med!
 12. Tilsæt 200 μ L **C3** og vortex i 5 sek.
 13. Centrifuger ved 10.000 rpm i 1 min.



Figur 12. PowerBead-rør monteret på Vortex-adaptor.

14. Overfør op til 750 μL af supernatanten til **rør 4** (nyt 2 mL Eppendorfrør). Undgå at få pellet med!
15. Ryst **C4** og overfør 1200 μL til supernatanten i rør 4. Luk låget forsigtigt og vortex i 5 sek., røret er helt fyldt.
16. Load 600 μL til **rør 5** (MB spinkolonne med opsamlingsrør).
17. Centrifuger ved 10.000 rpm i 1 min. **Rør 5** har under kolonnen med filteret et opsamlingsrør. Tag forsigtigt opsamlingsrøret af, og tøm væsken fra opsamlingsrøret ud i affaldsglasset. Montér det igen, se figur 13.
18. Gentag trin 16 og 17 to gange mere, så hele indholdet i **rør 4** passerer igennem kolonnen. Afslut med at montere opsamlingsrøret på spinkolonnen.
19. Tilsæt 500 μL **C5** til kolonnen.
20. Centrifuger 30 sek. ved 10.000 rpm.
21. Hæld væsken i opsamlingsrøret i affaldsglasset.
22. Centrifuger igen 1 min. ved 10.000 rpm.
23. Tag forsigtigt MB Spinkolonnen ud af opsamlingsrøret, og placér det i **rør 6** (et rent 2 mL Eppendorfrør). Tør kolonnen i 2 minutter ved at lade låget stå åbent, så alt **C5** (isopropylalkohol) er fordampet. Det er vigtigt for at DNA efterfølgende kan opløses fra membranen.
24. Pipetter 20 μL fra **C6** i midten af den hvide filtermembran.
25. Centrifuger 30 sek. ved 10.000 rpm.
26. Kassér kolonnen (**rør 5**), **gem rør 6, som nu indeholder jeres DNA-ekstrakt.**
Skriv jeres gruppenummer på røret med en vandfast tusch.



Figur 13. Samling af MB spinkolonne med opsamlingsrør.

Note: Opløsning **C6** er en buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.5). Den kan ved oprensningen erstattes af DNase-frit vand, men det er en fordel at beholde den hvis DNA-ekstraktet skal gemmes. Røret kan anbringes i fryser, hvor DNA er stabilt i flere år.

DNA-ekstraktet skal anvendes til PCR, men først skal koncentrationen af DNA måles, så den rette mængde DNA kan pipetteres af til PCR. Hvis I planlægger DEL B på et senere tidspunkt, kan **rør 6** med DNA'et opbevares i en fryser.

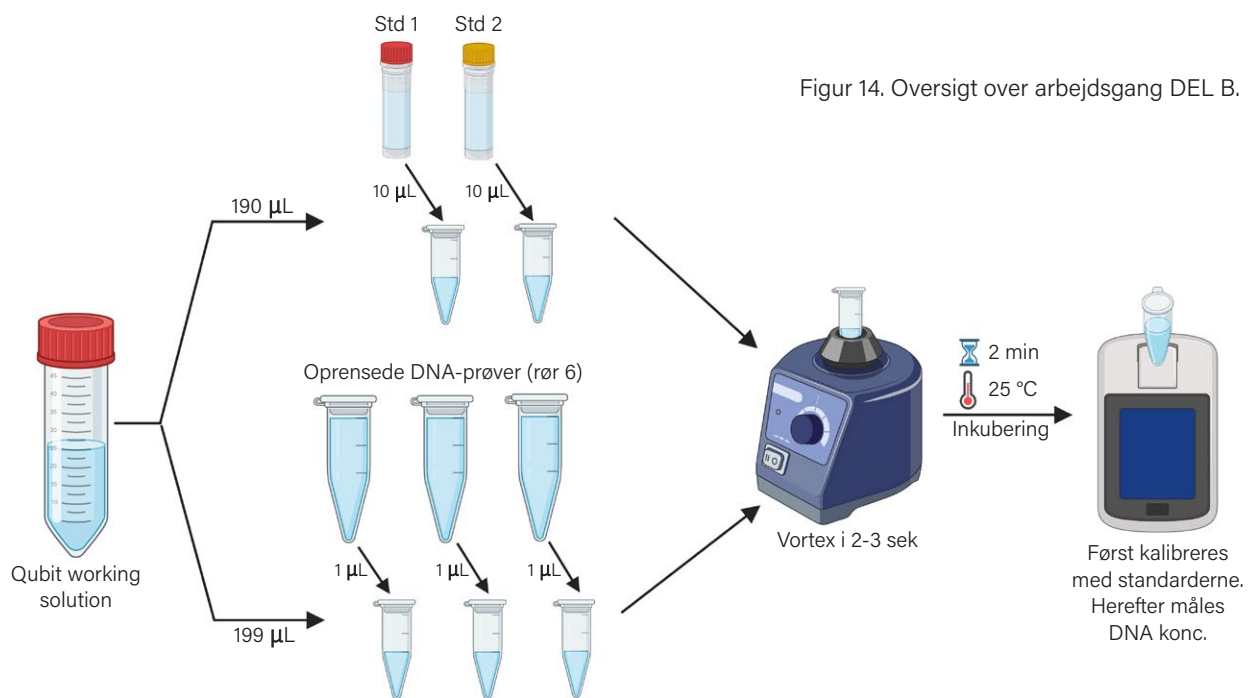
DEL B - Måling af DNA-koncentration

Formålet med DEL B er at undersøge om det oprensede DNA findes i en tilstrækkelig koncentration ved hjælp af fluorescensmåling.

Materialer

- Qubit dsDNA Assay kit der indeholder følgende:
 - DNA-standard 1 (0 ng DNA/ μL i TE-buffer)
 - DNA-standard 2 (10 ng DNA/ μL i TE-buffer)
 - Working solution
- 0,5 mL Qubit Assayrør (2 til standarder + 1 pr. Qubit prøve)
- Qubit™ fluorometer
- Pipetter + spidser (1-10 μL , 20-200 μL)
- Vortexer
- Handsker
- Vandfast tusch

Flowdiagram, se figur 14 side 18:



Figur 14. Oversigt over arbejdsgang DEL B.

Fremgangsmåde

1. Hver gruppe klargør et assayrør til Qubit-prøven, som markeres med gruppenummer på toppen. En enkelt gruppe klargør to assayrør til standarder, som markeres med **S1** og **S2** på toppen.
2. Overfør 190 μL working solution til **S1** og **S2**, og desuden 10 μL af standard 1 til **S1** og 10 μL standard 2 til **S2**.
3. Overfør 199 μL working solution og 1 μL DNA-ekstrakt (fra **rør 6**) til assayrøret med gruppenummer (Qubit-prøven).
4. Vortex alle rør i 2-3 sek.
5. Lad standarderne og Qubit-prøven hvile i 2 min. ved stuetemperatur.
6. Tænd fluorometeret og vælg '**dsDNA**' i menuen.
7. Klik på '**dsDNA High Sensitivity**'.
8. Tryk '**Read standards**' og indsæt Standard 1 (**S1-røret**) i fluorometeret – tryk 'read standard'. Efterfølgende måles standard 2 (**S2-røret**) på samme måde. OBS! Husk at lukke låget på fluorometeret under målingerne.
 - rfu for Standard 1 skal være omkring 40-75.
 - rfu for Standard 2 skal være omkring 16000-19000.

Note: rfu står for 'relative fluorescence units', og er således en relativ måleenhed for koncentrationen af DNA. Hvis målingerne er for lave, fremstilles nye standarder (dvs. rør **S1** og **S2**).
9. Vortex Qubit-prøven. Indsæt i fluorometeret og luk låget.
10. Vælg 'Run samples'.
11. Indstil prøvolumen til 1 μL ved at skrue op eller ned for 'original sample volumen' (touch funktion).
12. Vælg output-enhed '**ng/ μL** '.
13. Tryk 'Read tube' og aflæs koncentrationen.
14. Fortynd Qubit-prøven hvis skærmen viser 'Sample concentration too high'. Lav f.eks. en 1:10 fortynding (1 μL prøve og 9 μL nuclease-frit vand), og gentag trin 3-13 (med undtagelse af trin 8, da standardmålingerne er gemt på fluorometeret) med den nye fortyndede Qubit-prøve.

15. Husk at koncentrationen af DNA i det oprindelige ekstrakt (**rør 6**) svarer til den målte koncentration ganget med fortyndingen (dvs. koncentrationen skal ganges med 10, hvis der laves en 1:10 fortynding).
16. Notér koncentrationen i det oprindelige DNA-ekstrakt i **'Arbejdsark'** (side 33) under **'DNA-koncentration efter ekstraktion og oprensning'** sammen med gruppenummer og information om hvor prøven kommer fra.

Note: Opbevar DNA ekstrakterne (rør 6) i en fryser indtil DEL C udføres.

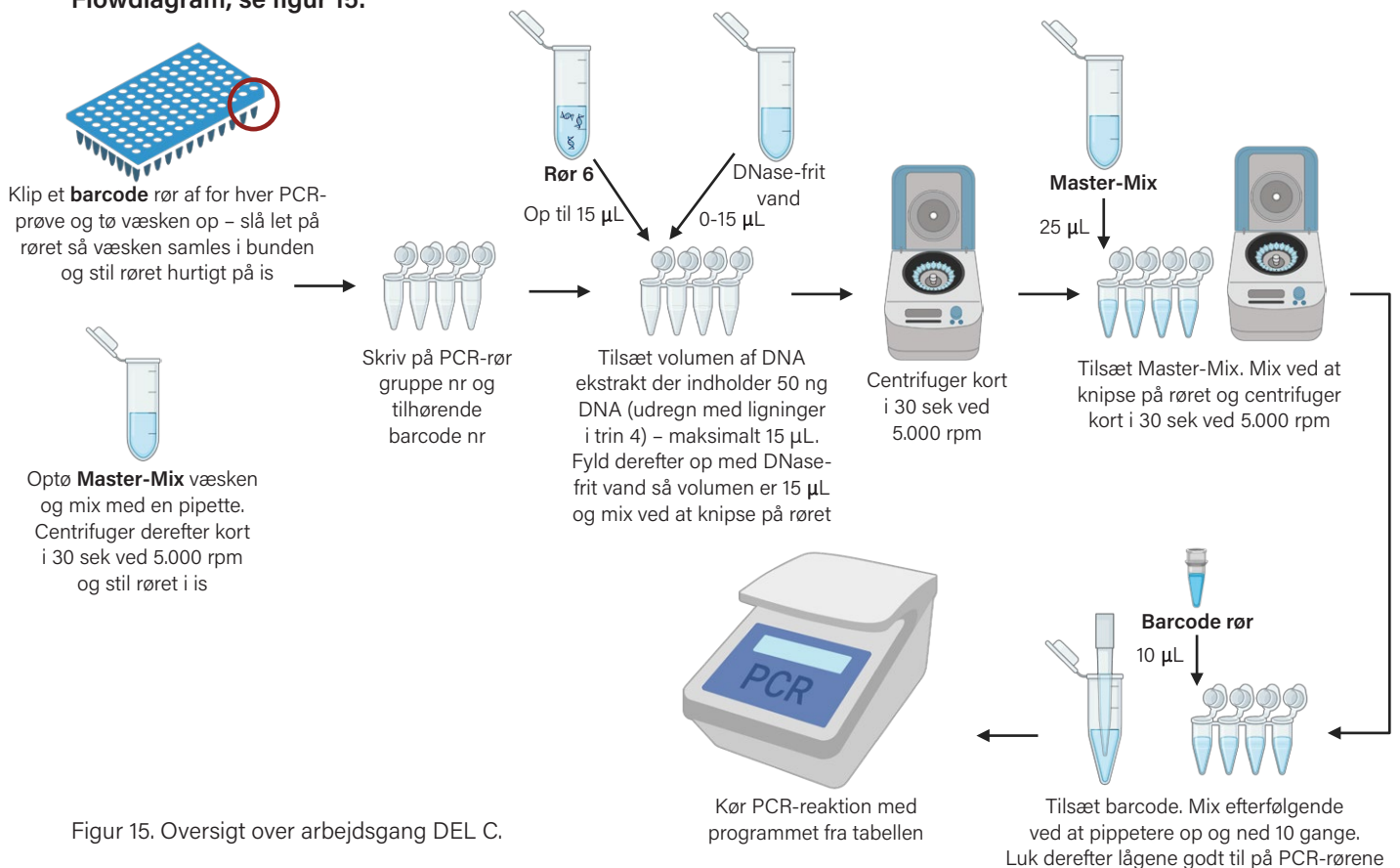
DEL C - Opformering af bakterielt 16S-DNA

Formålet med DEL C er at opformere bakterielt 16S-DNA ved hjælp af PCR og klargøre det til sekventering.

Materialer

- DNA-ekstrakt (**rør 6**)
- 16S Barcode-rør (1-24) (opbevares i fryser indtil brug – indeholder barcodede primere)
- DNase-frit vand
- Taq 2X Master Mix (indeholder taq-DNA-polymerase og nucleotider)
- Isbad
- Mikrocentrifuge
- Mikropipetter med spidser (0,5-10 µL, 20-200 µL og 100-1000 µL)
- 1 stk. 0,2 ml PCR-rør per prøve
- Termocycler (PCR-maskine)
- Handsker

Flowdiagram, se figur 15:



Figur 15. Oversigt over arbejdsgang DEL C.

Fremgangsmåde

Generelt: Brug handsker og skift pipettespidser mellem hver pipettering, så PCR-prøven eller rørene ikke forurenes. Hold orden på arbejdspladsen og opsaml pipettespidser o.l. i affaldsglasset.

Til hver PCR-prøve vælges en unik 16S-barcode (gør det muligt at adskille holdenes prøver fra hinanden). Det gøres ved at brække og klippe et rør af pladen med de 96 rør til hver prøve. Det er vigtigt at notere nummeret (1-24) på den barcode, den enkelte prøve tildeles. Nummeret kan ses på figur 16 (også vedlagt i kassen):

Figur 16. Tjek af nummer på barcode-rør (24 barcodes i alt).

	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	A01 1	A02 9	A03 17	A04 1	A05 9	A06 17	A07 1	A08 9	A09 17	A10 1	A11 9	A12 17
B	B01 2	B02 10	B03 18	B04 2	B05 10	B06 18	B07 2	B08 10	B09 18	B10 2	B11 10	B12 18
C	C01 3	C02 11	C03 19	C04 3	C05 11	C06 19	C07 3	C08 11	C09 19	C10 3	C11 11	C12 19
D	D01 4	D02 12	D03 20	D04 4	D05 12	D06 20	D07 4	D08 12	D09 20	D10 4	D11 12	D12 20
E	E01 5	E02 13	E03 21	E04 5	E05 13	E06 21	E07 5	E08 13	E09 21	E10 5	E11 13	E12 21
F	F01 6	F02 14	F03 22	F04 6	F05 14	F06 22	F07 6	F08 14	F09 22	F10 6	F11 14	F12 22
G	G01 7	G02 15	G03 23	G04 7	G05 15	G06 23	G07 7	G08 15	G09 23	G10 7	G11 15	G12 23
H	H01 8	H02 16	H03 24	H04 8	H05 16	H06 24	H07 8	H08 16	H09 24	H10 8	H11 16	H12 24

1. Tø barcode-røret op, tjek at væsken er i bunden af røret, ellers 'dap' det derved. Anbring det straks på is.
2. Tø Mastermixen op, centrifugér røret ved 5000 rpm i 30 sek., så væsken samles i bunden. Mix med en pipette ved at suge stille op og ned, og anbring den på is.
3. Mærk for hver PCR-prøve et PCR-rør med nummeret på prøvens barcode og gruppenummer, (fx A01-1 for barcode A01 gruppe 1). Noter også barcode-nummer ud for gruppenummeret i **'Arbejdsarket'** side 33.
4. Der skal som udgangspunkt overføres 50 ng DNA til PCR-røret. Der kan maks. overføres 15 µL prøve. Beregn ud fra DNA-koncentrationsmålingen, hvor mange µL DNA-ekstrakt fra **rør 6** der skal bruges. Det kan være nødvendigt at fortynde DNA-ekstraktet. (Brug skemaet nedenfor for at se om der skal fortyndes og hvor meget. Brug også skemaet til at udregne voluminet af DNA-ekstrakt eller fortyndet DNA-ekstrakt, der skal tilsættes PCR-røret).

Koncentration af DNA i ekstrakt	Fortynding	Udregn volumen (μL) af DNA-ekstrakt fra rør 6 eller fortyndet DNA-ekstrakt der skal tilsættes PCR-røret.
Under eller præcis 3,33 ng/ μL	Ingen	Overfør 15 μL til PCR-røret
Mellem 3,33 ng/ μL og 50 ng/ μL	Ingen	$V = \frac{50 \text{ ng}}{c_{\text{DNA i prøve}} \left(\frac{\text{ng}}{\mu\text{L}}\right)}$
Mellem 50 ng/ μL og 90 ng/ μL	1:2 (1 del DNA-ekstrakt og 1 del nucleasefrit vand)	$V = \frac{50 \text{ ng}}{c_{\text{DNA i prøve}} \left(\frac{\text{ng}}{\mu\text{L}}\right) \cdot 0,5}$
Over 90 ng/ μL	1:3 (1 del DNA-ekstrakt og 2 dele nucleasefrit vand)	$V = \frac{50 \text{ ng}}{c_{\text{DNA i prøve}} \left(\frac{\text{ng}}{\mu\text{L}}\right) \cdot 0,333}$

- Der udtages fra DNA-ekstraktet et volumen, der så vidt muligt indeholder 50 ng DNA. Dette overføres til et PCR-rør mærket så det kan genkendes.
- Tilsæt nuclease-frit vand, så volumen af DNA-ekstrakt og vand bliver 15 μL . Mix ved at knipse på røret. Spin det kortvarigt ned i centrifugen ved 5.000 rpm i 30 sek.
- Tilsæt 25 μL optøet Mastermix. Mix ved at knipse på røret. Spin ned i centrifugen ved 5.000 rpm i 30 sek.
- Tilsæt 10 μL barcode til PCR-røret. Tjek først, at barcode-opløsningen er i bunden af røret. Overfør ved at prikke pipettespidsen gennem folien der dækker barcoden.
- Overfør barcoden, og mix ved at pipettere op og ned 10 gange.
- Luk låget godt til, så det klikker på plads.
- Anbring rørene på is, indtil alle grupper er klar til PCR.
- Anbring klassens PCR-prøver i PCR-maskinen og tag et billede af prøvernes placering, så numrene kan ses (tuschen kan udvaskes under reaktionen).
- Start maskinen på følgende program:

Trin	Temperatur ($^{\circ}\text{C}$)	Tid	Antal cykler
Indledende denaturering	95	1 min	1
Denaturering (adskillelse af DNA-strengene)	95	20 sek	
Annealing (binding af primere til DNA'et)	55	30 sek	
Extension (dannelse af den modstående streng)	65	2 min	
Afsluttende extension	65	5 min	1
Standby	4	∞	

Efter PCR indeholder PCR-prøverne opformeret 16S DNA, som kan opbevares i fryseren indtil DEL D udføres.

DEL D - Oprensning af opformeret 16S-DNA

Formålet med DEL D er at vaske PCR-produktet.

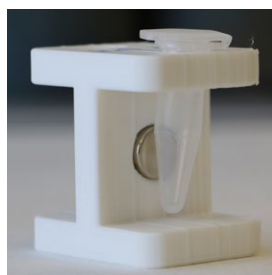
Materialer

- Eppendorfrør, 1,5 mL (2 per prøve med opformeret DNA)
- Mikrocentrifuge (op til 16.000 x g)
- Mikropipetter + spidser (0,5-10 μ L, 20-200 μ L og 100-1000 μ L)
- Prøver med opformeret 16S-DNA fra DEL C (PCR-rørene)
- Vortex AMPure XP beads (magnetiske kugler som binder DNA)
- Magnetholder til Eppendorfrør
- Ethanol (80 %)
- DNase-frit vand
- Handsker

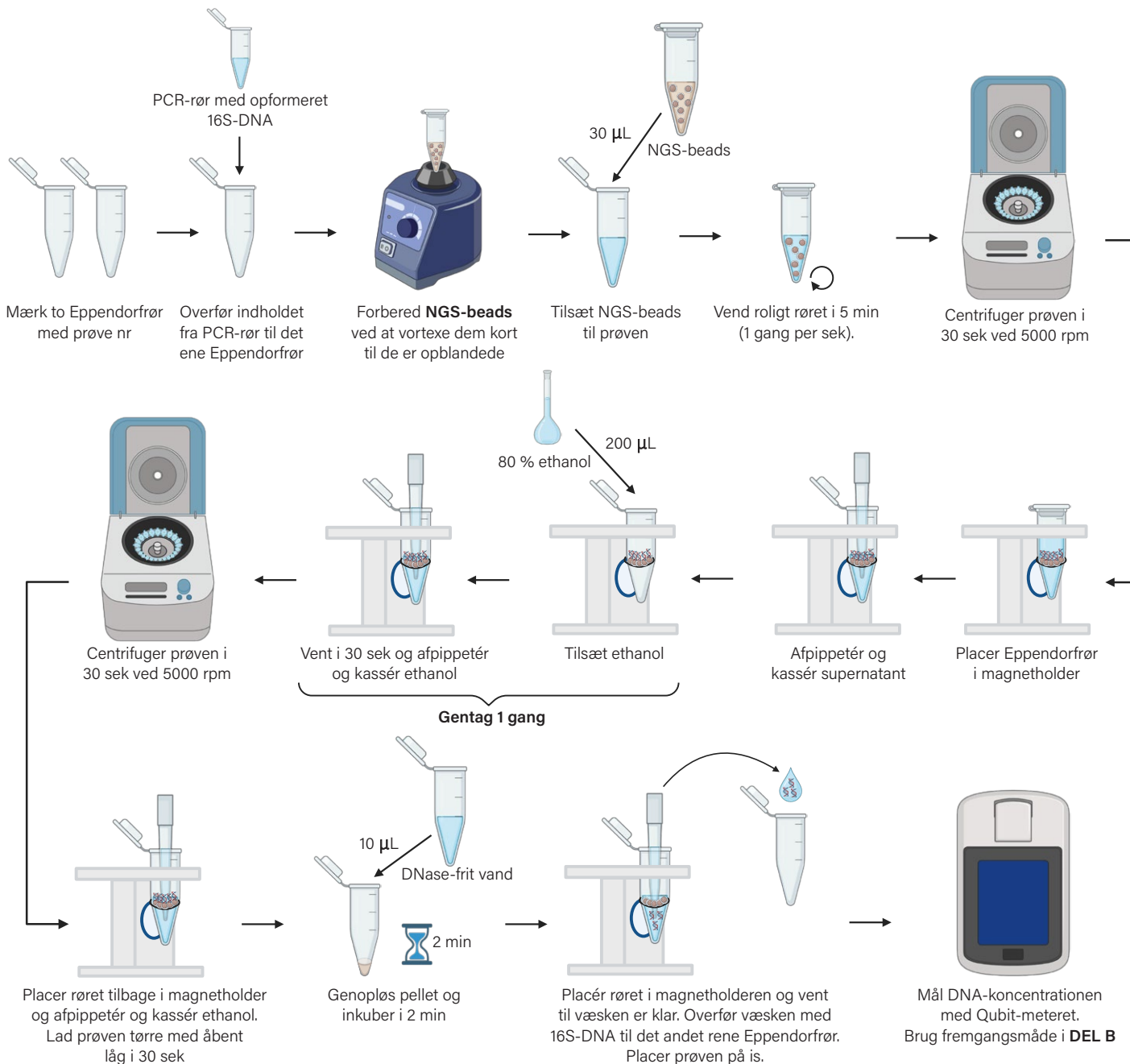
Flowdiagram, se figur 17:

Fremgangsmåde

1. Mærk to 1,5 mL Eppendorfrør med gruppenummer.
2. Overfør det opformede DNA til det ene Eppendorfrør.
3. Resuspendér CleanNGS-beads ved at vortexe dem kortvarigt. Tjek at de er godt opblandede.
4. Tilsæt 30 μ L beads til røret med opformeret DNA.
5. Vend Eppendorfrøret i roligt tempo i 5 min. ved håndkraft (vend side hvert sekund), så DNA'et binder sig til NGS-beads.
6. Spin røret ned i centrifugen ved 5000 rpm i 30 sek.
7. Anbring røret i en magnetholder. Magneten vil få perlerne med DNA til at samles som på siden af røret, se figur 18.
8. Pipetter supernatanten (væskefasen) forsigtigt fra bunden af røret, mens den sidder i magnetholderen. Supernatanten kasseres. Røret med prøven bibeholdes i magnetholderen.
9. Tilsæt 200 μ L 80 % ethanol til bunden af røret for at skylle pellet. Pellet skal blive siddende på rørets side, men skal dækkes af ethanol.
10. Vent 30 sekunder.
11. Fjern ethanolen fra bunden af røret med pipetten.
12. Gentag trin 9-11.
13. Spin røret ned ved 5000 rpm i 30 sek. og anbring det tilbage i magnetholderen.
14. Pipetter forsigtigt overskydende ethanol og lad indholdet tørre i 30 sek. med åbent låg.
15. Fjern røret fra magnetholderen.
16. Resuspendér pellet i 10 μ L DNase-frit vand.
17. Inkubér 2 min. ved stuetemperatur.
18. Anbring røret på magnetholderen. Vent til supernatanten er klar og farveløs.
19. Overfør supernatanten, der indeholder det oprensede 16S-DNA, til det andet mærkede (rene) Eppendorfrør.
20. Hold røret med oprenset DNA på is.



Figur 18. Magnetholder med Eppendorfrør.



Figur 17. Oversigt over arbejdsgang DEL D.

DNA-koncentrationen i hver rør skal nu måles ved at følge fremgangsmåden i DEL E (som er identisk med DEL B). Koncentrationen skal anvendes til at bestemme, hvor meget oprenset DNA der skal tilsættes ved sekventeringen.

DEL E - Måling af DNA-koncentration efter PCR-oprensning

Formålet med DEL E er at undersøge om det oprensede 16S-DNA findes i en tilstrækkelig koncentration ved hjælp af fluorescensmåling.

Materialer og fremgangsmåde

DEL B følges

Notér koncentrationen af opformeret og oprenset DNA i 'Arbejdsarket' under 'DNA-koncentration efter PCR-opformering og oprensning'.

Note: Opbevar rørene i en fryser indtil næste delforsøg udføres.

Rørene indeholder nu de opformede og barcodede kopier af 16S-rRNA gensekvenser fra bakterierne. Hver gruppes oprensede DNA har med barcoden fået en unik DNA-sekvens i enden, og de kan derfor blandes i samme prøve ved sekventeringen. Den unikke sekvens kan bagefter bruges til at adskille data fra hver enkelt jordprøve igen ved databehandlingen. Det er vigtigt at have noteret hvilken barcode, der hører til hvilken gruppe og prøve.

DEL F - Sekventering og base-calling af 16S-DNA

Formålet med DEL F er at sekventere det opformede og oprensede bakterielle 16S-DNA fra jordprøverne.

Tidsforbrug

1. Klargøring af sekventeringsprøve: 10 min.
2. Klargøring og priming af Flongle-flowcelle: 30 min.
3. Sekventering: 24-72 timer (fx natten over), afhængig af DNA-koncentration og -renhed.
4. Base-calling og deling af resultater: 30 min.

Materialer

- Opformeret og oprenset 16S-DNA fra jordprøve
- Nanopore MinION
- Nanopore Flongle-adaptor
- Nanopore Flongle-flowcelle
- Computer med programmerne MinION og EPI2ME
- 1,5 mL Eppendorfrør
- Mikropipetter + spidser (0,5-10 μ L, 20-200 μ L)
- DNase-frit vand
- 16S barcoding kit (SQK 16S024), se figur 19.

Indeholder følgende reagenser:

- RAP (Rapid Adaptor – helicase-enzym, som deler dobbeltstrenget DNA (ds-DNA) og trækker enkeltstrenget DNA (ssDNA) gennem nanoporerne, RAP kaldes også motorproteinet)
- LB (Loading Beads)
- SQB (Sequencing Buffer)



Figur 19. Barcoding kit.

- Flow Cell Priming Kit (EXP-FLP002), se figur 20. Indeholder følgende reagenser:
 - FB (Flush Buffer – indeholder ioner som trækkes gennem nanoporerne)
 - FLT (Flush Tether – tøjrer DNA til membranen)

Figur 21 viser en oversigt over Nanopore sekventeringsudstyr.



Figur 20. Priming kit.

Figur 21. Nanopore sekventeringsudstyr.

Fremgangsmåde

Klargøring af fælles prøve til sekventering

Før sekventeringen er det nødvendigt at kende koncentrationen af det oprensede DNA. Den måles ved hjælp af Qubit-fluorimeteret, som beskrevet tidligere i DEL B.

Det oprensede 16S-DNA fra jordprøverne skal derefter blandes i en fælles prøve til sekventering, så koncentrationen af DNA er omtrent ens fra alle grupper. Der skal i alt være 50-100 fmol (femtamol = 10^{-15} mol) DNA. Mol angiver her antallet af molekyler af DNA-streng. Når der er tale om sekvenser på ca. 1500 bp, svarer det til ca. 50-100 ng DNA, som skal opløses i et volumen på 10 μL .

1. Udregn det volumen fra hver rør med oprenset DNA som skal tilsættes den fælles prøve til sekventering. Start med at udregne den mængde (m) DNA, som skal tilsættes fra hver gruppe:

$$m = \frac{100 \text{ ng DNA}}{\text{antal grupper}} = \text{ng DNA der skal tilsættes fra hver gruppe}$$

Udregn det volumen (V) som skal tilsættes fra hver gruppes prøve med oprenset 16S-DNA. Brug DNA koncentrationen noteret i 'Arbejdsarket' under 'DNA-koncentration efter PCR-opformering og oprensning'.

$$V = \frac{\text{ng DNA der skal tilsættes}}{\text{koncentration af DNA i prøve}} = \frac{m \text{ (ng DNA)}}{C_{\text{DNA i prøve}} \left(\frac{\text{ng DNA}}{\mu\text{L}} \right)}$$

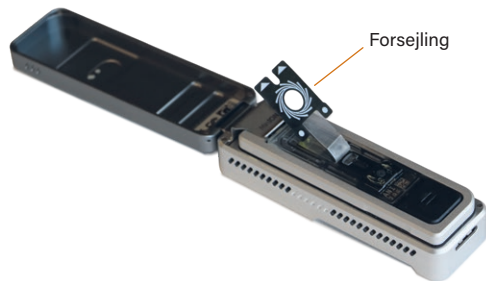
Hvis volumen der udregnes er mindre end 1 μL , fortyndes prøven med oprenset 16S-DNA i DNase-frit vand. Forsøg på at ramme en koncentration, så der skal overføres 1 μL til den fælles prøve. Brug formlen:

$$\text{fortynding af prøve} = \frac{C_{\text{DNA i prøve}} \left(\frac{\text{ng}}{\mu\text{L}} \right)}{\frac{m \text{ (ng)}}{1 \text{ (}\mu\text{L)}}}$$

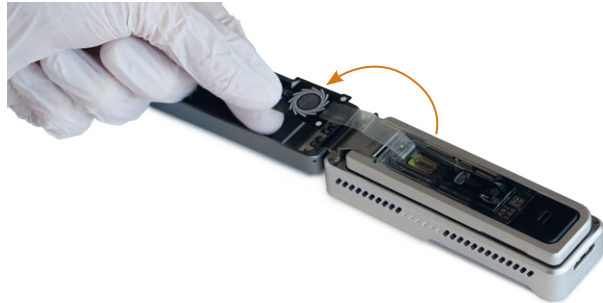
En fortyndingsfaktor på 2,5 betyder fx at den oprensede DNA-prøve skal fortyndes 2,5 gange – dvs. 1 μL prøve til 1,5 μL DNase-frit vand.

Øveopgave: Load prøver i brugte Flongle-flowceller

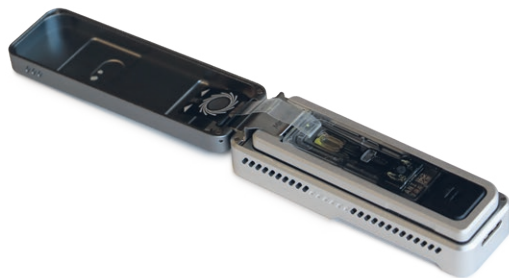
1. Løft forsejlingen af flowcellen, træk den tilbage og fastgør den til låget af MinION-apparatet med tape-felterne. Figur 22-24 viser processen. Derefter er prøveporten synlig.



Figur 22. Forsejling løftes op fra flowcellen, der er placeret i et MinION-apparat.

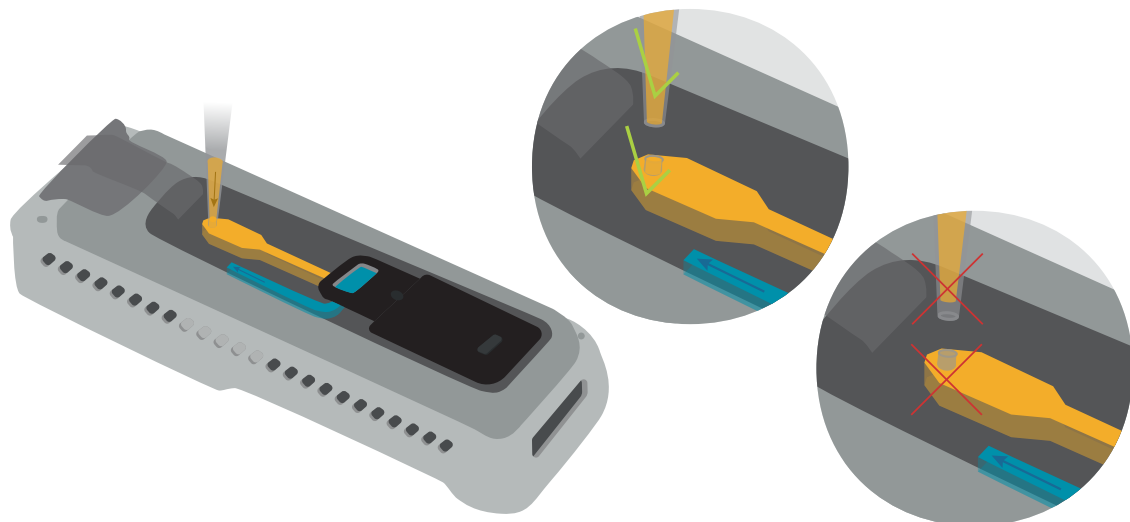


Figur 23. Forsejling trækkes tilbage.



Figur 24. Forsejling sættes fast på MinION låg.

2. Der pipetteres langsomt 120 μL demineraliseret vand direkte ned i prøveporten. Det er meget vigtigt, at der ikke kommer luftbobler med, se figur 25. Det undgås ved at bufferen suges op i pipetten, volumenknappen skrues mod mindre volumen, så der ikke er luft i pipettespidsen, og der pipetteres kun til første trin på pipetten. Det er vigtigt, at pipettespidsen placeres præcist lodret ned i prøveporten. Se evt. instruktionsvideo i online-protokollen på Nanopore Community.



Figur 25. Pipettering af demineraliseret vand til prøveporten på flowcelle.

Hvis volumen der udregnes er større end 1 μL , fortyndes prøven med oprenset 16S-DNA ikke. Man skal forsøge at tilsætte et volumen så tæt på det udregnede så muligt, men det samlede volumen fra alle grupper må ikke overstige 10 μL . Sørg for at alle grupper får tilsat ca. lige meget DNA til den fælles prøve.

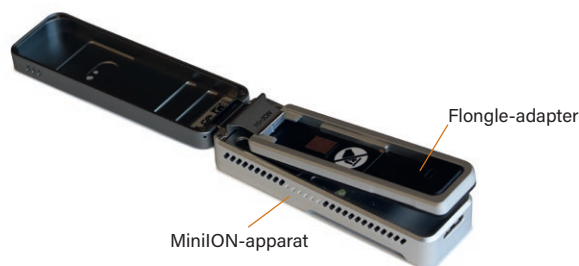
2. Pipetter det volumen af prøve med oprenset 16S-DNA der blev udregnet i trin 1 til et fælles Eppendorfrør, så der overføres 50-100 ng i alt.
3. Tilsæt den resterende volumen DNase-frit vand til et volumen på 10 μL .
4. Tilsæt 1 μL RAP til sekventeringsprøven, så det totale volumen er 11 μL (dette er DNA-biblioteket).
5. Mix ved at knipse let på røret, og spin sekventeringsprøven ned i centrifugen ved 5000 rpm i 10 sek.
6. Inkubér prøven i 5 min. ved stuetemperatur.

Halvdelen af sekventeringsprøven (5,5 μL) anvendes til sekventering. Resten gemmes som backup. Prøven kan gemmes i køleskab 1-2 dage.

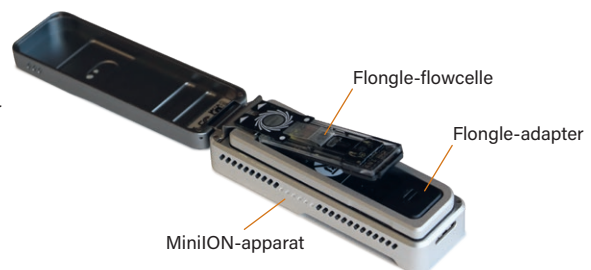
Montering af ny Flongle-flowcelle - fælles for hele klassen

Særligt ved klargøring af ny flowcelle kan der med fordel følges den engelske online protokol på Nanopore Community. Her er der flere instruktionsvideoer, som uddyber pipettering og lignende.

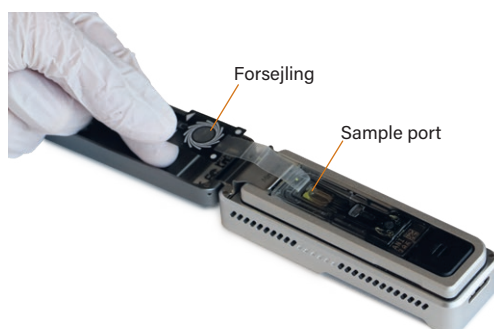
1. Monter Flongle-adapteren i MinION-apparatet, se figur 26. Undgå at røre ved kontaktpunkterne.
2. Monter Flongle-flowcellen i adapteren. Den skal klippes på plads under klipsen, se figur 27.
3. Orienter dig på Flongle-flowcellen: Når forsejlingen løftes, kan man se 'sample port' (prøveporten), som buffer og prøve skal pipetteres forsigtigt ned i, se figur 28.



Figur 26. MinION-apparatet med Flongle-adapteren.



Figur 27. MinION-apparatet med Flongle-adapteren og Flongle-flowcelle.



Figur 28. Overblik over færdigsamlet flowcelle og MinION.

Loadning af Flongle-flowcellen med primerbuffer

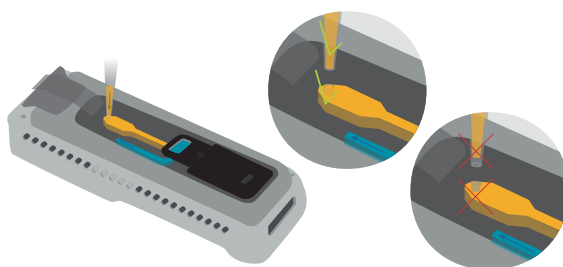
4. Optø sekventeringsbufferen (SQB), Flush buffer (FB), Flush Tether (FLT) og loading beads (LB) ved stuetemperatur. Placer dem på is, når de er optøede. Bufferne er på fast form til lige under stuetemperatur.
5. Vortex SQB, FB og FLT og spin dem ned i en centrifuge ved 5000 rpm i 10 sek.
6. Bland 117 μL FB med 3 μL FLT i et rent 1,5 mL Eppendorfrør. Mix med pipetten. Den færdige opløsning kaldes primerbufferen.
7. Løft forseglingen af flowcellen, træk den tilbage og fastgør den til låget af MinION-apparatet med tape-felterne, som da du øvede loadingen (se evt figur 22-24 side 26). Nu er prøve-porten synlig.
8. 120 μL primerbuffer pipetteres langsomt direkte ned i prøveporten.
HUSK: Det er meget vigtigt, at der ikke kommer luftbobler med. Det undgår ved at bufferen suges op i pipetten, volumenknappen skrues mod mindre volumen, så der ikke er luft i pipettespidsen og der pipetteres kun til første trin på pipetten, se figur 29.

Loadning af den fælles sekventeringsprøve i Flongle-flowcelle

1. Mix loading beads (LB) ved at pipettere op og ned et par gange, og forbered straks sekventeringsprøven som vist i skemaet. Perlerne i LB falder hurtigt til bunds i røret.

Reagens	Volumen
Sekventeringsbuffer (SQB)	13,5 μL
Loading beads (LB) – netop mixede	11 μL
DNA-bibliotek	5,5 μL
I alt	30 μL

2. Pipetter de 30 μL prøve i prøveporten. Undgå luft ved at følge samme procedure som beskrevet for primerbufferen. Skru en eventuel luftboble ud af pipetten og pipetter direkte i prøveporten, som vist i figur 29.



Figur 29. Loadning af primerbuffer og/eller sekventeringsprøve til prøveporten på flowcelle.

3. Montér igen forseglingen over prøveporten.
4. Notér Flongle-flowcellens ID-nummer. Det er angivet på cellen, se figur 30.

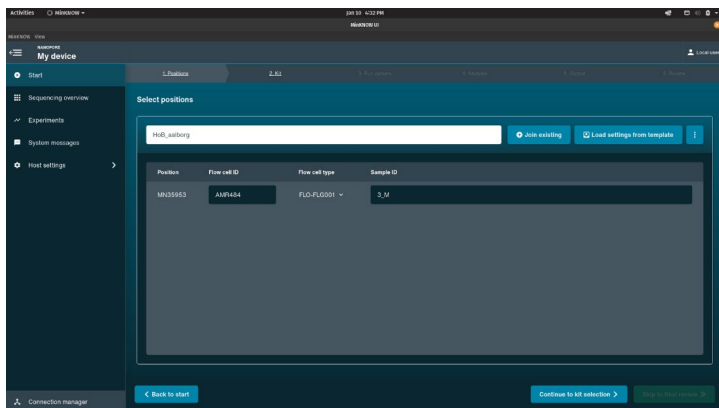


Figur 30. ID-nummer på flowcelle (her ANI057).

5. Luk låget på MinION-enheden. Nu er den klar til sekventering.

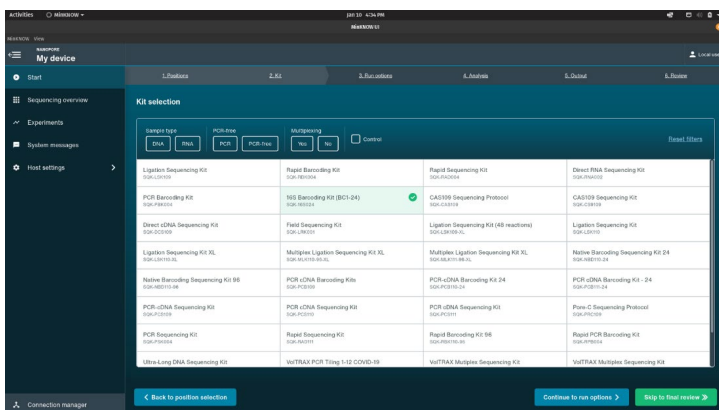
Sekventering af prøve i Flongle-flowcelle

1. Tryk på 'Start' til venstre i menuen, og derefter 'Start sequencing'.
2. Sørg for at felterne 'Experiment name', Flow cell ID' og 'Sample ID' er udfyldt, se figur 31.
'Experiment name' kan kaldes 'HoB_gymnasienavn_dato'.
'Sample ID' kan kaldes jeres klassenavn, fx '3_M' (der kan ikke bruges punktum eller mellemrum).



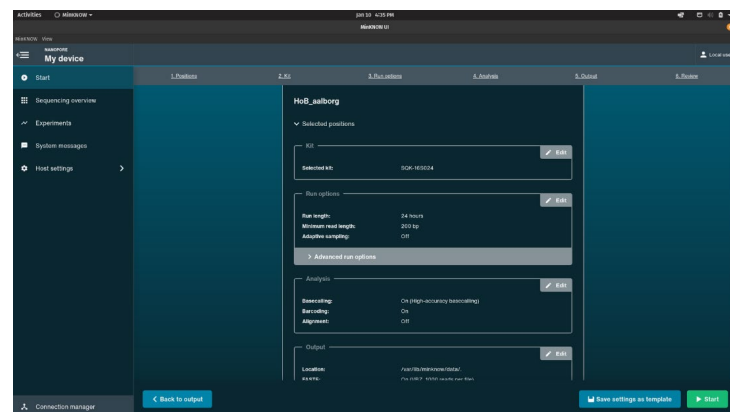
Figur 31. Angiv eksperiment navn (her HoB_aalborg), Flow cell ID (her AMR484) og Sample ID (her 3_M).

3. Tryk på 'Continue to kit selection'.
4. Vælg '16S Barcoding Kit (BC1-24)' og tryk dernæst på 'Skip to final review', se figur 32.



Figur 32. Vælg 16S Barcoding Kit (BC1-24) og tryk 'Skip to final review' i højre hjørne.

5. Under 'Output' trykkes 'Edit', og der vælges destinationsmappen 'HoB_sekventering_output', som ligger på skrivebordet til resultatfilerne, se figur 33.



Figur 33. Vælg destinationsmappe for sekventeringsdata.

- Tryk på 'Start' for at starte sekventeringen. Note: Indstillingerne der er valgt, er default indstillinger og kan inspiceres inden start.
- Efter 24-72 timer kan sekventeringen stoppes ved at trykke på 'STOP'. Sekventerings-output filerne kan findes i mappen **HoB_sekventering_output**.

Efter sekventeringen kan resultaterne findes som 'FASTQ-filer' i destinationsmappen på computeren.

FASTQ-formatet er en standard filformat til sekventeringsdata, der indeholder DNA-sekvenser og deres tilhørende kvalitetsscores. FASTQ-formatet består af fire linjer pr. sekvens:

- En linje, der starter med '@' og angiver, at linjen indeholder et sekvensens-ID.
- En linje, der indeholder DNA-sekvensen, repræsenteret som en streng af nukleotider (A, C, G, T).
- En linje, der starter med '+' og fungerer som en separator mellem sekvensen og dens tilhørende kvalitetsscores.
- En linje, der indeholder kvalitetsscores for hver base i sekvensen, repræsenteret som ASCII-tegn. Hver karakter angiver en numerisk værdi, der angiver kvaliteten af den tilsvarende base. Hvis en base har en høj kvalitetscore, betyder det, at den med stor sikkerhed er base-called korrekt.

En sekvens i FASTQ-format kunne eksempelvis være:

```
@read1
ACGTGCTAGCATCGA
+
>AAABBB<8<<<8<
```

Resultaterne (FASTQ-filerne) kan nu hentes ind i programmet EPI2ME og bakterierne kan identificeres.

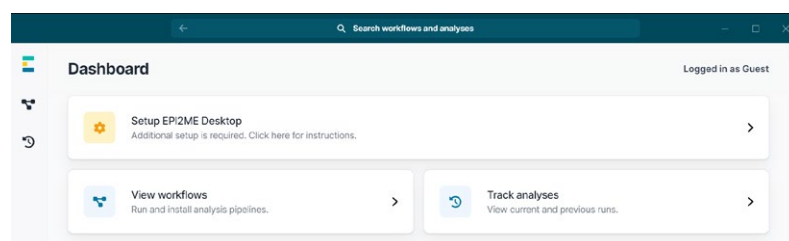
DEL G - Databehandling fra sekventering

Formålet med DEL G er analysere data opnået fra Nanopore-sekventering ved brug af programmet EPI2ME.

Analysen kan bare startes og køre indtil den skal bruges i næste undervisningstime.

Fremgangsmåde

- Først downloades Epi2me fra EPI2ME LABS.
Download link: <https://labs.epi2me.io/>
- Vælg 'download now'
- Download til enten PC eller Mac
- Åbn Epi2me og vælg 'continue as guest'
- Tryk på 'Setup Epi2Me Desktop'



Herefter varierer fremgangsmåden afhængigt af om man har MacBook eller PC.

PC

1. Download Windows10 platformen herunder WSL (Windows subsystem to Linux) ved at trykke på 'setup'
2. Et vindue vil åbne for installation af WSL.
3. PC'en vil nu bede om at genstarte.
4. Efter genstart åbnes Epi2Me programmet igen og der trykkes først på den røde knap (1), og herefter på 'setup' (2).
5. Programmet er nu klar til brug.

Hvis dette ikke virker, henvises der til trouble-shooting og manuel installation:

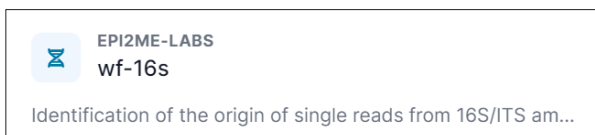
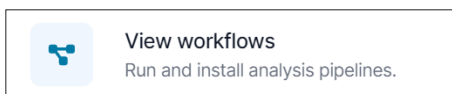
- <https://learn.microsoft.com/en-us/windows/wsl/troubleshooting>
- <https://learn.microsoft.com/en-us/windows/wsl/install-manual>

Mac

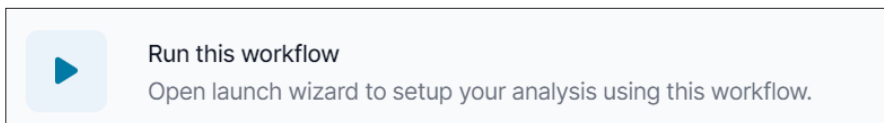
1. Vælg Setup Epi2me Desktop.
2. Download af Epi2me er i gang promptes for download af Java og Docker Desktop.
3. Programmet er nu klar til brug.

Efter installation

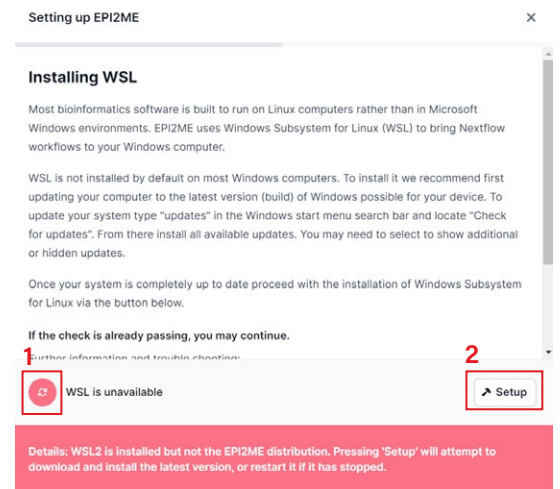
1. Når Epi2me er installeret og åbnet på enten PC eller Mac, vælges workflows og wf-16s downloades.



2. Åben wf-16s og klik på 'run this workflow'

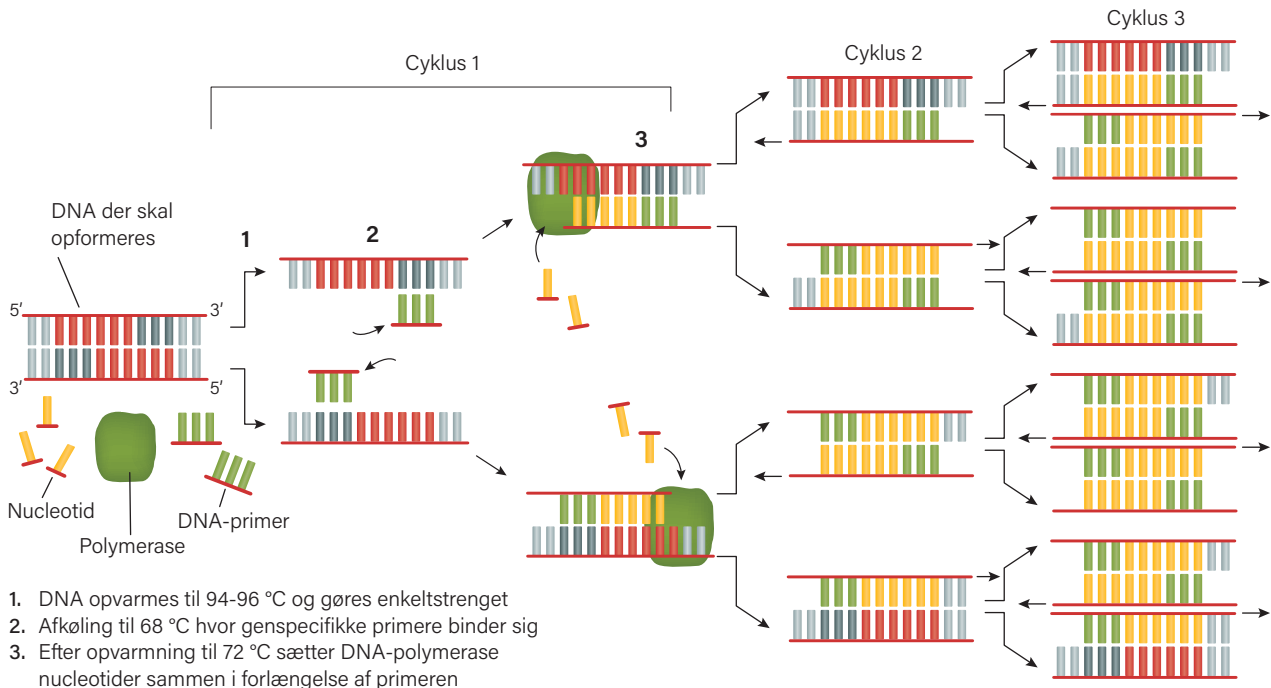


3. Vælg sti til Fastq-fil på USB-stik
4. Klik på 'Launch workflow'
5. Bekræft 'launch'
6. Den igangværende analyse indikeres af programmet som 'running' og udviklingen kan følges i vinduet 'Progress'
7. Analyserapport findes som angivet: Report : wf-16s-report.html



Efterbehandling

1. Forklar formålet med de enkelte trin i ekstraktion og oprensning af DNA fra en jordprøve (DEL A). Inddrag en forklaring af, hvad der sker med DNA og/eller andre stoffer ved tilsætningen af en given opløsning eller ved en given behandling.
2. Forklar princippet i PCR (DEL C). Inddrag nedenstående figur 34 i forklaringen.



Figur 34. PCR-metoden.

3. Forklar hvordan og hvorfor DNA'et vaskes efter opformering ved hjælp af PCR (DEL D).
4. Forklar hvorfor det er vigtigt at måle DNA-koncentrationen (DEL B og DEL E) både før og inden opformering af DNA ved metoden PCR.
5. Undersøg de muligheder EPI2ME har for at visualisere jeres resultater efter analyse ved hjælp af bioinformatik (DEL G). Lav fx et stamtræ eller et tallerken-diagram og præsenter disse.
6. Sammenlign resultaterne fra de forskellige jordprøver. Hvilke konklusioner kan der drages med hensyn til biodiversiteten i forskellige jordtyper?
7. Diskutér årsager til forskelle i artssammensætning og artsrigdom (biodiversitet) mellem de forskellige jordprøver.

Arbejdsark

Gruppe nr.	Barcode nr.	Prøve	DNA-koncentration efter ekstraktion og oprensning (DEL B)	DNA-koncentration efter PCR-opformering og oprensning (DEL E)
Eksempel:				
<i>Gruppe 1</i>	<i>B03</i>	<i>Jord fra Alberte's have</i>	<i>45,5 ng/μL</i>	<i>15,1 ng/μL</i>
Udfyld nedenfor:				

EKSPERIMENT 5

Biodiversitet i jordprøver

Læreplanen

Eksperimentet belyser følgende kernestof i læreplanen for bioteknologi A (og tilsvarende for biologi A):

- Nucleinsyrers opbygning, forekomst og egenskaber
- Replikation
- DNA-teknikker, herunder PCR og sekventering
- Anvendt bioinformatik

Øvelsen kan indgå i temaer der perspektiverer kernestoffet indenfor miljøteknologi og miljøbeskyttelse samt ny forskning og nye bioteknologiske metoder.

Teori

For at få det bedste faglige udbytte af øvelsen er det en fordel at kende til:

- DNA's struktur og funktion
- DNA-opformering (PCR)
- DNA-sekventering og bioinformatik

Det kan der læses om i de biologi- og/eller bioteknologilærebøger, der i forvejen anvendes i undervisningen.

Desuden er det en fordel at kende til:

- 16S-rRNA-genet hos prokaryoter
- Teknikker der anvendes i forbindelse med DNA-ekstraktion, -oprensning og -vask
- Fluorometri der anvendes i forbindelse med koncentrationsbestemmelse af DNA
- Nanoporeteknologi der anvendes i forbindelse med sekventering
- Programmeringsværktøjer til bioinformatik

Disse emner beskrives i de teori afsnit der knytter sig til eksperimentet.

Flow

Øvelsen har følgende flow og tidsforbrug:

- DEL A – Ekstraktion og oprensning af DNA fra jordprøve – 90 min.
- DEL B – Måling af DNA-koncentration – 20 min.
- DEL C – Opformering af bakterielt 16S-DNA – 60 min. + 100 min. til PCR
- DEL D – Oprensning af opformeret 16S-DNA – 45 min.
- DEL E – Måling af DNA-koncentration efter PCR-oprensning – 20 min.
- DEL F – Sekventering af bakterielt 16S-DNA – 45 min. + (24-72 timers sekventering)
- DEL G – Bioinformatik – 90 min.

Kommentarer til eksperimentet

DEL A – Ekstraktion og oprensning af DNA fra jordprøve.

- Elever skal selv medbringe jordprøve.

HANDS ON BIOTECH

EKSPERIMENT 5

Biodiversitet i jordprøver

Dette hæfte (Biodiversitet i jordprøver) indgår i en serie på seks hæfter skrevet som del af udviklingsprojektet 'Hands on Biotech'. Det er skrevet til undervisningen i bioteknologi A/biologi A i gymnasiet.

Hæftet er delt op i tre kapitler:

- Teori
- Elevvejledning
- Lærervejledning