

Uddybning af sikkerhedsforanstaltninger og procedurer for de enkelte organismer og forsøgstyper

A. Dyrkning og transformation af bakterier

For alle godkendte forsøg skal følgende retningslinier overholdes:

- Der anvendes udelukkende de godkendte stammer af E.coli, som fremgår af indberetningsskemaets bilag 1.
- Bakteriestammer indkøbes i forbindelse med forsøgsperioden fra godkendt laboratorium (se indberetningsskemaets bilag 1).
- Opformering sker gennem udstrygning på LB-medium (selektivt, hvis det er påkrævet) i petriskåle.
- E. colistammen uden plasmid kan også opformeres i 5-100 mL flydende LB-medium.
- Bakteriekulturen gøres kompetent, dvs. modtageligt for plasmidoptagelse ved brug af calciumchlorid og/eller fysisk påvirkning (f.eks. varmepåvirkning eller elektroporation).
- Plasmid, godkendt til transformation, tilsættes.
- De transformerede celler dyrkes på selektivt medium.
- Efter endt forsøg destrueres kulturen (se sikkerhedsbeskrivelsen om dette).

De fremstillede transformerede kloner kan eventuel analyseres som beskrevet i punkt C.

B. Dyrkning og transformation af gær

For alle godkendte forsøg skal følgende retningslinier overholdes:

- Der anvendes udelukkende de godkendte stammer af *Saccharomyces cerevisiae* som fremgår af indberetningsskemaets bilag 2.
- Gærstammer indkøbes i forbindelse med forsøgsperioden fra et godkendt laboratorium (se indberetningsskemaets bilag 2).
- Opformering sker gennem udstrygning på YPD-medium i petriskåle.
- Gærstammen uden plasmid opformeres i 5-100 mL flydende YPD-medium.
- Gærkulturen gøres kompetent, dvs. modtagelig for plasmidoptagelse ved brug af polyethylenglycol og/eller lithiumacetat og/eller fysisk påvirkning (f.eks. varmepåvirkning eller elektroporation).
- Plasmid, godkendt til transformation, tilsættes.
- De transformerede celler dyrkes på selektivt medium.
- Efter endt forsøg destrueres kulturen (se sikkerhedsbeskrivelsen om dette).

De fremstillede transformerede kloner kan eventuel analyseres som beskrevet i punkt C.

C. Analyse af produkter fra transformerede stammer

Analysen har til formål at påvise produkter (ofte enzymer) fra de transformerede organismer.

Følgende procedurer følges:

- De transformerede organismer overføres til selektivt medium (flydende eller fast)
- Genproduktet påvises enten direkte eller efter oprensning
- Efter endt forsøg destrueres kulturer og produkter (se sikkerhedsbeskrivelsen om dette).

D. Oprensning af plasmider

For alle godkendte forsøg skal følgende retningslinier overholdes:

- Der anvendes udelukkende de godkendte stammer af E. coli eller S. cerevisiae som fremgår af den godkendte vejledning.
- Nødvendige stammer indkøbes i forbindelse med forsøgsperioden fra et godkendt laboratorium (se indberetningsskemaets bilag 1 og 2).

- Stammen opformerer i eller på selektivt medium (flydende, max 100 mL, eller fast).
- Oprensning af råplasmidfraktionen fra øvrige cellekomponenter sker ved selektiv udfældning eller metoder med tilsvarende sikkerhedsmæssigt niveau.
- Efter endt forsøg destrueres kulturer og produkter (se sikkerhedsbeskrivelsen om dette).

E. Overlevelsesforsøg af transformerede E. coli i forskellige miljøer

For alle godkendte forsøg skal følgende retningslinier overholdes:

- Der anvendes udelukkende de godkendte stammer af E. coli K12, som fremgår af indberetningsskemaets bilag 1.
- Bakteriestammer indkøbes i forbindelse med forsøgsperioden fra et godkendt laboratorium (se indberetningsskemaets bilag 1).
- Stammerne opformerer i eller på LB-medium, (flydende, max. 100 mL, eller fast)
- Stammen sættes til sterilt havvand eller steril jord med eller uden frøspirer under kontrollerede miljøbetingelser i et begrænset tidsrum i laboratoriet (1-8 dage).
- Bakterier fra hhv. jord eller havvand dyrkes på LB-medium.
- Overlevende E.coli-bakterier dyrkes på selektivt medium.
- Efter endt forsøg destrueres kulturen (se sikkerhedsbeskrivelsen om dette).

De overlevende bakterier kan eventuel analyseres som beskrevet i punkt C.

F. Dyrkning og anvendelse af transformerede celler som indikatororganismer

For alle godkendte forsøg skal følgende retningslinier overholdes:

- Der anvendes udelukkende de godkendte stammer som fremgår af indberetningsskemaets bilag 1 og 2.
- Transformerede stammer anskaffes i forbindelse med forsøgsperioden fra et godkendt laboratorium (se indberetningsskemaets bilag 1 og 2).
- Opformering sker i max 100 mL flydende assay-medium.
- Ved assay sker inkubering som beskrevet i vejledningen
- Efter endt forsøg destrueres kulturen (se sikkerhedsbeskrivelsen om dette).

G. Transformation af Arabidopsis thaliana

For alle godkendte forsøg skal følgende retningslinier overholdes:

- Der anvendes udelukkende planter af en godkendt leverandør, se indberetningsskemaets bilag 4.
- Læreren kvitterer hver gang for modtagelse af frø, planter, laboratoriekulturer og andre materialer til Københavns Universitet.
- Til transformation anvendes Agrobacterium tumefaciens linie pGV 3850 C58C1 fra en godkendt leverandør (se indberetningsskemaets bilag 4).
- Frø fra transformerede planter skal udsås på selektive agarplader indeholdende kanamycin.
- Læreren fører protokol over hele tidsrummet, hvor der arbejdes med transformation af planterne.
- Læreren indsender efter endt forsøg kopi af protokollen til Københavns Universitet, som opbevarer denne i 5 år.
- Efter endt forsøg, destrueres kulturen (se sikkerhedsbeskrivelsen om dette).
- Rengøring af arbejdsområdet foretages som beskrevet i "Tjek på Biotek".

H. Påvisning af genprodukter i transformerede Arabidopsis thaliana

For alle godkendte forsøg skal følgende retningslinier overholdes:

- Der anvendes udelukkende planter af en godkendt leverandør, se indberetningsskemaets bilag 4.
- Læreren kvitterer hver gang for modtagelse af frø, planter, laboratoriekulturer og andre materialer til Københavns Universitet.
- Der anvendes transformerede Arabidopsis kimplanter indeholdende generne nptII (kanamycinresistens) og uidA (beta-glukoronidase = GUS genet) selekteret på kanamycinholdige agarplader.
- Eventuelle anlæg til blomsterknopper skal straks fjernes.
- Efter endt forsøg, destrueres kulturen (se sikkerhedsbeskrivelsen om dette).

- Rengøring af arbejdsområdet foretages som beskrevet i ”Tjek på Biotek”.

I. Analyse af fluorescerende C. elegans

Forsøget har til formål at identificere transgene dyr ved hjælp af fluorescensmikroskopi.

- Der anvendes udelukkende dyr fra den godkendte stamme, som fremgår af indberetningsskemaets bilag 3.
- Dyr indkøbes i forbindelse med forsøgsperioden fra en godkendt leverandør (se indberetningsskemaets bilag 3).
- Transformerede dyr opbevares udenfor undervisningstimerne i aflåst rum
- Kulturen opformerer på petriskåle med NGM (Nematode Growth Medium) og en udstrøget kultur af E. coli.
- Analyse af kulturer samt oprensning og analyse af DNA sker efter de i vejledningen angivne procedurer
- Destruktion sker efter endt forsøg (se sikkerhedsbeskrivelsen om dette)