

FAKULTET FOR BIOVITENSKAP, FISKERI OG ØKONOMI  
INSTITUTT FOR ARKTISK OG MARIN BIOLOGI  
FAKULTET FOR HUMANORIA, SAMFUNNSVITENSKAP OG LÆRERUTDANNING  
INSTITUTT FOR PEDAGOGIKK OG LÆRERUTDANNING

## **Undervisning i Bioteknologi**

### **Laboratoriearbeid**

**Silje Jørgensen**

BIO-3906 Mastergradsoppgave i biologi

Lektorutdanning i realfag

Mai 2010



# **Undervisning i Bioteknologi**

## **Laboratoriearbeid**

**Silje Jørgensen**

BIO-3906 Mastergradsoppgave i biologi

Lektorutdanning i realfag

Mai 2010



## **Forord**

Lektorutdanning i realfag er en femåring masterutdanning med integrert praktisk pedagogikk. Fordypningsfagene mine har vært biologi og matematikk. Masteroppgaven er på 30 studiepoeng, og har både et faglig og didaktisk fokus. Denne oppgaven er utarbeidet og skrevet over fem intense vårmåneder ved Institutt for Arktisk og Marin biologi, Universitetet Tromsø.

Arbeidet med min master har vært en krevende, men svært så læringsfull prosess. Den siste tiden har det virkelig gått opp for meg hvor mye jeg har lært ved gjennomføring og utforming av denne oppgaven. Uten råd og veiledning hadde jeg aldri kommet så langt. Jeg retter derfor en stor takk til mine to veiledere John Beck Jensen og Hans-Georg Köller. John for å gi meg god og trygg veiledning innen biologi og det daglige arbeidet. Hans-Georg for å stille med gode råd og innspill ved didaktiske problemstillinger.

Jeg vil rette en stor takk til alle på Naturfagsbygget for all hjelp, interesse og et fantastisk arbeidsmiljø. Jeg vil også takke mine medstudenter for god motivasjon gjennom studiene.

Takk til min mamma, pappa og søster for all støtte gjennom mine studier.

Til sist vil jeg takke min kjære Geir som har stilt med uvurderlig og god hjelp gjennom mine studier, og spesielt ved arbeid med min master. Tusen takk for både faglig veiledning, diskusjoner og ikke minst korrekturlesing av oppgaven. Du har vært en uunnværlig støtte både faglig og personlig, og ingen ord kan beskrive min takknemlighet for å ha deg ved min side.

Tromsø, juni 2010

Silje Jørgensen



## Sammendrag

Gjennom de siste ti årene har en rask utvikling av nye bioteknologiske metoder vært fremtredene som et resultat av teknologiens fremvekst. For den moderne lærer, i den videregående skole, medfører dette stadig nye utfordringer innenfor tilrettelegging av faglig oppdatert undervisning. Spesielt krevende er det å kunne tilby laboratorieundervisning som gir god læring, og hvor utstyr og materiell ikke blir for kostbart. Formålet med denne oppgaven er å utforske hvordan laboratoriearbeid innenfor biologifaget kan legges opp for å bidra til bedre læring. På grunnlag av at bioteknologi er et fag i kontinuerlig utvikling ble dette sett på som et svært relevant fordypningsområde.

For å opparbeide en bedre forståelse innen bioteknologiske arbeidsmetoder ble det gjennomført et prosjekt ved Institutt for Arktisk og Marin biologi, Universitetet i Tromsø. Dette arbeidet omhandlet inaktivering av det antatte regulatorgenet, *thuR*, i bakterien *Sinorhizobium meliloti* stamme Sm1021. Dette genet regulerer mulig trehalose opptaket hos *S. meliloti*. En ny stamme *S. meliloti* Sm7018 ble dannet, og dens genotype ble testet med DNA sekvensering som viste et mutert *thuR* gen. Fenotypen ble testet ved dyrking på glukose og trehalose for å undersøke stammens evne til å utnytte trehalose som karbon og energikilde. Sm7018 viste ingen avvik i vekst sammenlignet med vildtypen, Sm1021.

Gjennom samarbeid med en biologi 2 klasse, viste det seg at elevene ikke var særlig begeistret for laboratoriearbeid. De syntes denne arbeidsformen var både stressende og bidro til mye ekstra arbeid. Det kom i tillegg frem at denne undervisningsformen skaper mye arbeid også for læreren, i form av mye for- og etterarbeid. Selv om læreren var bevisst på disse faktorene, mente hun at laboratoriearbeidet likevel var et positivt avbrett i den ordinære undervisningen. Svake faglige kunnskaper og dårlige utstyrsressurser skaper begrensede muligheter for arbeid i skolelaboratoriet. Et universitetsbesøk ble gjennomført for å teste mulige måter å tilrettelegge laboratorieundervisning. Basert på de nye erfaringene opparbeidet gjennom dette prosjektet har det kommet frem mange viktige faktorer som kan øke elevenes faglige interesse og motivasjon for bioteknologifaget, dersom de inkluderes tilrettelegging av laboratorieundervisningen.





# Innhold

<b>FORORD</b> .....	<b>5</b>
<b>SAMMENDRAG</b> .....	<b>7</b>
<b>INNHold</b> .....	<b>9</b>
<b>1. TEORI</b> .....	<b>11</b>
1.1 NATURFAGSDIDAKTISKS BAKGRUNN .....	11
1.1.1 Internasjonale undersøkelser: TIMSS og PISA .....	11
1.1.2 Strategiplan for bedring av realfaglig interesse og kompetanse .....	13
1.1.3 Læreplan i naturfag og biologi.....	15
1.1.4 "Nature of Science" .....	17
1.1.5 Motivasjon .....	18
1.1.6 Praktisk elevarbeid i naturfag .....	18
1.1.7 Laboratoriearbeide i dagens naturfagundervisning .....	19
1.2 BIOLOGISK BAKGRUNN .....	22
1.2.1 <i>Sinorhizobium meliloti</i> .....	22
1.2.2 Trehalose .....	23
1.2.3 <i>thuEFGK</i> .....	24
1.2.4 <i>thuR</i> .....	24
1.3 PROBLEMSTILLING .....	26
<b>2. MATERIALE OG METODER</b> .....	<b>27</b>
2.1 DIDAKTISKE METODER .....	27
2.1.1 Samfunnsvitenskaplige metoder.....	27
2.1.2 Kvantitativ- og kvalitativmetode .....	27
2.1.2.1 Karakterer ved kvantitativ metode.....	28
2.1.2.2 Karakterer ved kvalitativ metode.....	28
2.1.3 Kvalitativt spørreskjema.....	28
2.1.4 Kvalitativ forskningsintervju .....	29
2.1.5 Gjennomføring av elevbesøk.....	34
2.2 BIOLOGISKE/LABORATORIETEKNISKE MATERIAL OG METODER.....	36
2.2.1 Material .....	36
2.2.2 Biologiske metoder .....	42
2.2.2.1 Plasmidrensing.....	42
2.2.2.2 Måling av DNA konsentrasjon .....	42
2.2.2.3 Kutting av DNA med restriksjonsenzym .....	43
2.2.2.4 Gel elektroforese.....	43
2.2.2.5 Polymerase Chain Reaction (PCR).....	45
2.2.2.6 Defosforylering av DNA med CIP .....	47
2.2.2.7 Ligering av plasmid og PCR kloningsreaksjon.....	47
2.2.2.8 Transformering .....	48
2.2.2.9 Transformering av kompetente celler .....	48
2.2.2.10 Transformasjon ved konjugering .....	49
2.2.2.11 Overkyssing og seleksjon .....	49
2.2.2.12 Replika plating.....	50
2.2.2.13 DNA sekvensering.....	51
<b>3. RESULTATER</b> .....	<b>53</b>
3.1 RESULTATER FRA DET DIDAKTISKE ARBEIDET.....	53
3.1.1 Lærerundersøkelse og samtale .....	53
3.1.2 Elevundersøkelse .....	55
3.1.3 Intervju av elever.....	59
3.2 RESULTATER FRA LABORATORIET .....	63
3.2.1 Kloning av <i>thuR</i> fragment.....	64
3.2.2 Konjugering av <i>S.meliloti Sm1021</i> .....	67
3.2.3 DNA Sekvensering .....	70
<b>3.2.3 VEKSTKURVE</b> .....	<b>71</b>
<b>4. DISKUSJON</b> .....	<b>73</b>

4.1 DISKUSJON AV DET DIDAKTISKE ARBEIDET .....	73
4.2 DISKUSJON AV LABORATORIERESULTATENE .....	79
4.3 BRUK AV <i>S. MELILOTI</i> SOM ILLUSTRASJON I VIDEREGÅENDE BIOLOGI UNDERVISNING .....	80
<b>5. AVSLUTNING .....</b>	<b>85</b>
5.1 SVAR PÅ PROBLEMSTILLING .....	89
<b>6. REFERANSER.....</b>	<b>91</b>
<b>APPENDIKS .....</b>	<b>97</b>
1. PROSEDYRER.....	97
1.1 Prosedyre for plasmidopprensning fra <i>E.coli</i> .....	97
1.2 Klargjøring av RNase A.....	97
1.3 Prosedyre DNA utfelling med etanol.....	98
1.4 Prosedyre for DNA ekstraksjons med fenol/kloroform.....	98
1.5 Prosedyre for restriksjonskutt: .....	98
1.6 Prosedyre for agarose gel elektroforese.....	99
1.7 Prosedyre for PCR.....	99
1.8 Prosedyre for defosforilyering med CIP.....	101
1.9 Prosedyre for ligering .....	101
1.10 Prosedyre for å danne elektrokompetente celler .....	101
1.11 Prosedyre for elektroporering .....	102
1.12 Prosedyre for dannelsen av kjemokompetente celler.....	102
1.13 Prosedyre for "heat shock" .....	103
1.14 Prosedyre for testing av innsatte fragment.....	103
1.15 Prosedyre for konjugasjon mellom <i>S. meliloti</i> og <i>E.coli</i> transformant.....	103
1.16 Prosedyre for replika plating med stoff.....	104
1.17 Prosedyre for replika plating med overføringsplate.....	105
1.18 Prosedyre DNA sekvensering .....	105
1.19 Prosedyre for å lage vekstkurve blant mutanter og vildtype <i>S.meliloti</i> . .....	106
<b>2 UNDERSØKELSE I BIOLOGIDIDAKTIKK.....</b>	<b>107</b>
2.1 ELEVSKJEMA .....	107
2.2 LÆRERSKJEMA .....	109
<b>3. KOMPENDIUM TIL UNIVERSITETS BESØK.....</b>	<b>111</b>

## 1. Teori

### 1.1 Naturfagsdidaktisks bakgrunn

#### 1.1.1 Internasjonale undersøkelser: TIMSS og PISA

Norge deltar i flere internasjonale komparative undersøkelser, deriblant TIMSS og PISA. TIMSS står for «Trends in International Mathematics and Science Study», og er en læreplanbasert undersøkelse i matematikk og naturfag (TIMSS, 2006a). TIMSS er utformet av International Association for the Evaluation of Educational Achievement (IEA), og gjennomføres i Norge av Universitetet i Oslo (UiO) (TIMSS, 2006a). Utgangspunktet for undersøkelsen er fellesfaktorer i læreplanen fra majoriteten av deltakerlandene, og måles hovedsakelig på 4. og 8. trinn (TIMSS, 2006a). PISA står for «Programme for International Student Assessment», og baseres på å måle elevenes evne til å aktivt bruke sine kunnskaper og erfaringer (TIMSS, 2006b), altså nyttingen i fagene. PISA er utformet av Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD), og utføres av UiO (Kjærnsli et al., 2007). I PISA undersøkes 15-årige elevers ferdigheter innen naturfag, matematikk og leseferdigheter, og ved hver undersøkelse er ett av fagene i hovedfokus. Ved forrige undersøkelse, PISA 2006, var naturfag i hovedfokus (PISA, 2010).

De overordnede mål ved TIMSS og PISA er likt, og er å skaffe godt dokumenterte utdanningsvitenskaplige forskningsresultater som kan bidra til forbedring av skolesystemene i deltakerlandene (TIMSS, 2006b). Undersøkelsene blir gjort i stor skala med tanke på antall elever og skoler i samtlige deltaker land. Undersøkelsene er grundige og gir omfattende resultater. Grunnet dette vil de relevante hovedfunnene, samt parallellene mellom undersøkelsene, innenfor naturfag trekkes fram her. Resultatene som belyses videre er hentet fra TIMSS 2007 «Tegn til bedring» (Grønmo & Onstad, 2009b) og PISA 2006 «Tid for tunge løft» (Kjærnsli et al., 2007).

De senere år viser TIMSS og PISA at Norge ligger generelt under det internasjonale gjennomsnittet i naturfag, men resultatene kan nå se ut til å gå i positiv retning. TIMSS 2007 viser at Norge har hatt en liten framgang fra 2003 til 2007. 8. trinn har hatt en liten, men signifikant tilbakegang i naturfag, mens 4. trinn har vist en bedring naturfaglige resultater. Mellomtrinnet har fått en ekstra timeressurs i naturfag av Kunnskapløftet som kan være en årsak framgangen (Kjærnsli et al., 2007). Selv om Norge fra 1995 til 2007 har tilbakegang

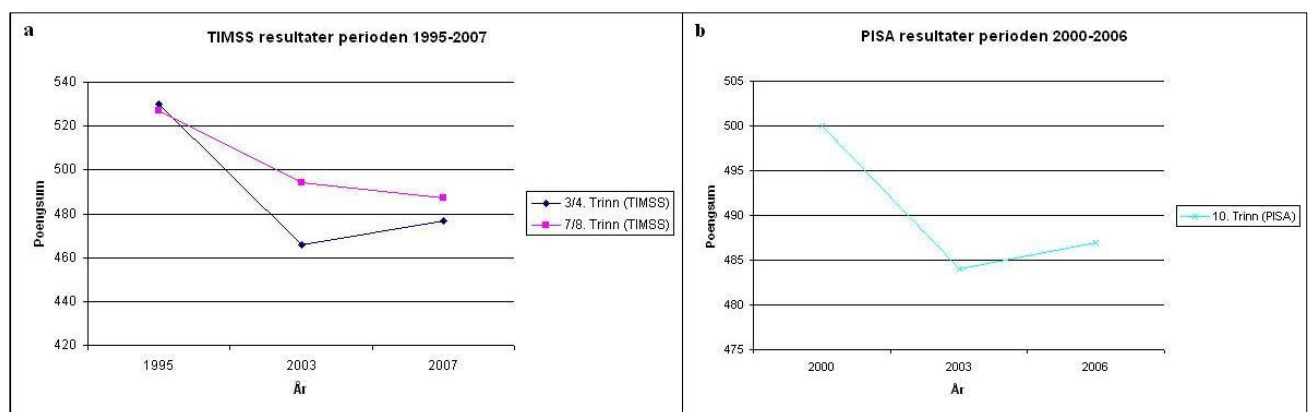
(figur 1a), viser framgangen fra de to siste TIMSS undersøkelsene at noe gjøres riktig (Grønmo & Onstad, 2009a). TIMSS 2007 forklarer dette med:

*”1. Større fokus på kunnskap – noe som blant annet gjenspeiles i Kunnskapsløftets kompetansemål og vektlegging av grunnleggende ferdigheter, og i utvidelsen av timetallet i matematikk og naturfag på barnetrinnet.*

*2. Mer systematikk i læringsarbeidet i norsk skole – tettere oppfølging av elevenes lekser og større vekt på vurdering som en følge av innføringen av et nasjonalt vurderingssystem (nasjonale prøver).*

*3. Flere lærere har deltatt på fagrelevante etterutdanningskurs.”* (Grønmo & Onstad, 2009a)

Samlet viser PISA en tilbakegang i naturfag hos norske elever på hele perioden 2000 til 2006 (figur 1 b), men med en liten framgang fra 2003 til 2006. Sammenligningen mellom 2003 og 2006 er noe tvilsom. Dette er grunnet endret vikling av det naturfaglige rammeverk, hvor blant annet kravene til leseferdigheter i naturfagsoppgavene er senket. Den totale konklusjonen er uansett at kunnskapsnivået til norske 15-åringer i naturfag er dalende over hele perioden (Kjærnsli et al., 2007).



**Figur 1. Gjennomsnittlig poengsum hos norske elever i naturfag i de internasjonale undersøkelsene a) TIMSS b) PISA. Begge undersøkelsene har et skalert gjennomsnitt på 500 poeng. Norge har de senere år havnet under gjennomsnittene (Kjærnsli et al., 2007, Grønmo & Onstad, 2009b).**

I tillegg til elevers kunnskaper, undersøker TIMSS og PISA valg av undervisningsformer og lærernes faglige bakgrunn. Norske skoler og læreplaner har fokus på elevaktiviteter og

samarbeid, men TIMSS 2007 viser at det i høy grad praktiseres mye individuelt arbeid i realfagene (Grønmo & Onstad, 2009b). Dette gjelder også sammenlignet med internasjonalt perspektiv. Mange lærere ser på realfag som et fag hvor det er vanskelig å benytte andre undervisningsmetoder enn de tradisjonelle (Grønmo & Onstad, 2009b). TIMSS 2007 resultatene tyder på at den tradisjonelle undervisningen bør byttes ut da Norge har relativt stor andel elever på lavt kompetansenivå. I tillegg er andelen norske elever som presterer på høyt og avansert kompetansenivå er i internasjonalt perspektiv lavt (Grønmo & Onstad, 2009b). Bakgrunnen til dette kan også ligge i, som TIMSS 2007 viste, at norske lærere har dårligere utdanning enn lærere internasjonalt og de tar mindre relevant etterutdanning (tiltross for bedringer på nasjonalt nivå). I tillegg bruker norske lærere mindre eksperimentelt arbeid, og det brukes lite tid på leksegjennomgang. Det legges også mindre vekt på å knytte opp faget til dagliglivet enn det er vanlig internasjonalt (Grønmo & Onstad, 2009b).

### **1.1.2 Strategiplan for bedring av realfaglig interesse og kompetanse**

Med bakgrunn i tidligere PISA og TIMSS resultater, samt dårlig rekruttering til realfagene, har det blitt utarbeidet en strategiplan "Realfag, naturligvis - strategi for styrking av realfagene 2002 -2007" (Kunnskapsdepartementet, 2005). Tiltross for framgang ved siste gjennomføring av TIMSS og PISA ligger Norge fortsatt under det internasjonale gjennomsnittet i naturfag (Kunnskapsdepartementet, 2010f). Norge trenger å jobbe for å komme opp på internasjonalt nivå (Grønmo & Onstad, 2009b). For å opprettholde og videreutvikle naturfagkunnskapene i Norge har kunnskapsdepartementet fulgt opp med en ny strategiplan "Realfag for fremtiden – strategi for styrking av realfag og teknologi 2010-2014" (Kunnskapsdepartementet, 2010f).

Den nye strategiplanens fokus er på både nye og gamle målsettinger. Hovedfokuset er å heve realfagenes status og øke rekrutteringen, samt bedre kvaliteten til realfagene på alle nivå i utdanningen. Opplæringen i realfagene skal være relevant og praktisk, og gjennomføres med bevisste valg av aktiviteter og utstyr som skal virke motiverende for begge kjønn. Bedre kontakt med næringslivet skal gi innsyn i anvendeligheten til fagene, samt gi bedre forståelse for fagets relevans for egne valg. Gjennom utarbeiding av rådgivende organ og samarbeidspartnere mellom skoler, bedrifter og kunnskapsdepartementet skal realfagene styrkes gjennom kvalitet og variasjon. Dette med sterkt fokus på praktisk visning av anvendeligheten til fagene (Kunnskapsdepartementet, 2010f).

Læring og motivasjon hos elevene kan økes ved mer praktisk kunnskap om hvordan realfagene kan anvendes, og her kan naturfagsentre og lokale bedrifter bidra. I tillegg vil disse sentrene intensivere innsatsen for å gjøre lærerutdanningen og læremiddelprodusentene kjent med hva som gir god læring. Kunnskapsdepartementet og miljøverndepartementet lanserte i 2008 "Den naturlige skolesekken" (DNS) som skal bidra til økt bevissthet, nysgjerrighet og miljøengasjement, som en del av blant annet naturfaget i skolen (Kunnskapsdepartementet, 2010f).

Undervisningsansattes kompetanse i realfag skal økes med tiltak både i grunn-, etter-, og videreutdanning. Fokuset ligger blant annet på å gi lærerne økt bevissthet om valg av innhold og arbeidsmåter i undervisningen, som ivaretar både gutter og jenter, og hjelpe til å omsette dette til praksis. Lærernes kompetanse til å utvikle og tilrettelegge lokale planer, som gir god opplæring, skal bedres. Fra 2009 er kommunene pålagt å øke antall lærere i blant annet matematikk for å hjelpe elever med svake ferdigheter, da disse ofte får problemer senere i utdanningsforløpet. Skolen og den enkelte læreren skal øke sin kunnskap om hvilken undervisning som gir opplæring med høy kvalitet (Kunnskapsdepartementet, 2010f). For å bedre opplæringen må også utstyrssituasjonen og utstyrsmidlene i naturfag og matematikk bedres (Kunnskapsdepartementet, 2010f).

Økt rekruttering og kvalitet, samt heving av status til realfagene ved lavere trinn er utbedringer som satses på, og har som mål å øke antall realfaglige og teknologiske studenter. Kvalitet og synlighet av samfunnsrelevans, samt fagdidaktikk innen realfag og teknologiske studier, skal bedres. Dette sammen med bedre informasjon og utstyr kan øke rekruttering til forskning innen realfagene (Kunnskapsdepartementet, 2010f).

For å nå målene må realfaglig kompetanse økes på alle nivå. Særdeles viktig er grunnopplæringen, da manglende kompetanse vil skape større faglige utfordringer senere i utdanningsforløpet. Lærerne trenger tilstrekkelig kompetanse for å kunne tilrettelegge god læring (Kunnskapsdepartementet, 2010f). Da forskning og samfunn er under stadig utvikling bidrar strategiplanen med å holde den norske læreplan og undervisning faglig oppdatert.

### 1.1.3 Læreplan i naturfag og biologi

Læreplanen er et bindende dokument i skolen, på samme tid som det er et viktig hjelpemiddel under planlegging og gjennomføring av undervisning. I dette avsnittet vil områder innenfor biologi, da spesielt molekylær biologi belyses, da dette ansees som relevant.

Biologi er en del av skolen fra første trinn på barneskolen gjennom faget naturfag, som omhandler læren om naturvitenskap som er delt opp i de ulike fagdisiplinene biologi: fysikk, kjemi og geofag (Kunnskapsdepartementet, 2010d). Arbeid med problemstillinger både praktisk og teoretisk, i laboratorier og naturen, er av stor betydning innen naturvitenskaplige fag. Dette for å gi elevene erfaring, samt utvikle kunnskap om naturvitenskaplige metoder og tenkemåter. Denne type undervisning kan fremme utvikling av kreativitet, evne til å tenke kritisk, åpenhet og aktiv deltakelse i naturfaglige settinger (Kunnskapsdepartementet, 2010d).

”Forskerspiren” er ett gjennomgående kompetansemål som følger elevene fra første klasse på grunnskolen til og med første klasse på videregående skole. Dette kompetansemålet skal bidra til gi elevene innsikt i naturvitenskapens tenkning og metoder, og hovedområdet rundt forskerspiren beskrives slik:

*”Naturvitenskapen framstår på to måter i naturfagundervisningen: Som et produkt som viser den kunnskapen vi har i dag og som en prosess som dreier seg om naturvitenskapelige metoder for å bygge kunnskap. Prosessene omfatter hypotesedanning, eksperimentering, systematiske observasjoner, åpenhet, diskusjoner, kritisk vurdering, argumentasjon, begrunnelser for konklusjoner og formidling. Forskerspiren skal ivareta disse dimensjonene i opplæringen.”*

(Kunnskapsdepartementet, 2010e)

I grunnskolen er ”Teknologi og design” ett gjennomgående kompetansemål, hvor naturfag, matematikk og kunst og håndverk samarbeider. Dette fagområdet dekker blant annet bioteknologi, og området dekker planlegging, utvikling og framstilling av nyttige hverdagsprodukter (Kunnskapsdepartementet, 2010e). Sentralt i dette hovedområdet er samspillet mellom teknologi og naturvitenskap, og bioteknologiens prinsipp og funksjon (Kunnskapsdepartementet, 2010e). Ved første året på videregående heter dette

kompetansemålet ”Bioteknologi”. Dette målet er viktig for å vekke interesse mot framstilling av nye teknologiske innretninger (Kunnskapsdepartementet, 2010e).

Biologi 1 og biologi 2 er studiespesialiserende fag og kan velges, andre og tredje året, på studieforberedende ved den videregående skole. Disse fagene inneholder blant annet hovedområdet ”Den unge biologien”. Dette hovedområdet fokuserer på det som er aktuelt for praktisk undervisning, også i bioteknologi. Hovedområdet er formulert slik:

*”Hovedområdet handler om å bruke biologifaglege arbeidsmåtar i økologisk feltarbeid og i undersøkingar og forsøk i laboratoriet. Vidare dreiar hovudområdet seg om arbeid med ulike miljøutfordringar, og om vurdering av informasjon i media. Etske sider ved problemstillingane inngår òg.”*  
(Kunnskapsdepartementet, 2010a)

Her ser vi at praktisk kunnskap som arbeid og forsøk i laboratoriet, samt etiske problemstillinger rundt metoder er i fokus.

I programfagene biologi 1 og 2 er det spesielt fire hovedområder, i læreplanen, som omhandler molekylærbiologi. Disse fire områdene er ”Cellebiologi”, ”Energiomsetning”, ”Genetikk” og ”Bioteknologi”.

Hovedområde ”Cellebiologi” legger vekt på oppbyggingen av eukaryote celler, funksjon og transport av stoffer inn og ut av cellene. I tillegg omhandler dette området oppbygging og formering av bakterier og virus (Kunnskapsdepartementet, 2010a).

Hovedområdet ”Energiomsetning” dekker det grunnleggende aspektet til både oppbygging og nedbrytningsprosessene i fotosyntese og respirasjon. I tillegg skal området være med på å gi en forståelse for enzymer og kofaktorer (Kunnskapsdepartementet, 2010a).

Hovedområdet ”Genetikk” omhandler oppbyggingen av deoksyribonukleinsyre (heretter kalt DNA). I tillegg handler dette hovedområdet om hvordan gener og proteiner kodes av DNA, hvordan det ferdige produktet framstilles, og videre hvordan dette påvirker cellene. Her er også genetisk arv og mutasjoner sentral (Kunnskapsdepartementet, 2010a).



Hovedområdet "Bioteknologi" dreier seg om utviklingen av bio- og genteknologi, og hvordan dette kan fungere som hjelpemiddel innenfor medisin, matproduksjon og forskning. Etske og miljøutfordringer er svært sentral under dette hovedområdet (Kunnskapsdepartementet, 2010a).

Alle disse hovedområdene er sentrale i molekylærbiologi, da det omhandler cellen som helhet og de molekylære prosesser som foregår. Disse hovedområdene er med på å øke elevenes forståelse av levende celler, og nødvendigheten med molekylære prosesser. Sistnevnte hovedområde "Bioteknologi" er ett område under stadig utvikling i samspill med teknologi. Dette området gir ett innblikk i muligheter for fremtiden, samt at det belyser etiske og miljøutfordringer. Området er svært sentralt innen forskning og krever forståelse av naturvitenskaplig kunnskap.

#### **1.1.4 "Nature of Science"**

Det er mye uenigheter angående forståelsen av "nature of science" (Lederman, 2007). Det finnes gode begrunnelser for at naturfagslærere skal verdsette den læringen "nature of science" gir. Forståelsen av "nature of science" er viktig i:

- Utilitarismen for å oppnå innsikt om vitenskap og mestre teknologiske objekter og prosesser i dagliglivet
  - Demokrati for å kunne utføre av informerte beslutninger i sosiovitenskaplige saker
  - Kultur for å verdsette verdien av vitenskapen som en del av den moderne kultur
  - Moral for å oppnå innsikt i normene for det vitenskapelige samfunn som omfatter moralske forpliktelser som er av generell verdi for samfunnet
  - Vitenskaplig læring da innsikt letter læringen av vitenskaplige saksmetoder
- (Lederman, 2007)

Tiltross for mye uenighet om definisjonen til "nature of science" finnes det noen generelt aksepterte egenskaper som inngår begrepet. Blant disse generelle egenskapene kommer det fram at vitenskaplig kunnskap er tentativ (kan endres), empirisk basert (fra observasjoner) og subjektiv (Lederman, 2007). Menneskelige slutninger, fantasi og kreativitet er sosialt og kulturelt innebygd, og inkluderes derfor også i disse egenskapene. I tillegg inkluderes to viktige aspekter: og det er skillet mellom observasjoner og slutninger, og funksjoner og relasjoner mellom vitenskaplige teorier og lover (Lederman, 2007).

### 1.1.5 Motivasjon

Økt forståelse rundt tema kan gi en indre glede og mestringsfølelse. Dette er en form for indre motivasjon, hvor personlighetsegenskaper ligger til grunn (Imsen, 2005). Dette kan være at elever ønsker å lære noe grunnet personlig interesse. Ytre motivasjon er, derimot, fremmet av noe utenfra (Imsen, 2005). Dette kan være belønninger i form av karakterer eller ting. Alle vil styres av både indre og ytre motivasjoner. Innen undervisningen er motivasjon er viktig for å skape interesse rundt fagene, men motivasjon er sammensatt.

*”Motivasjon handler om hvordan følelser, tanker og fornuft tvinner seg sammen og gir farge og glød til de handlingene vi utfører [...] Motivasjon defineres gjerne som det som forårsaker aktivitet hos individet, det som holder denne aktiviteten ved like, og det som gir den mål og mening” (Imsen, 2005)*

Elevens opplevelse av læringsmiljøet, lærestoff, læremidler, arbeidsoppgaver og arbeidsmetoder påvirker trivsel og mestringsfølelse i et fag, og er faktorer som påvirker motivasjon (Imsen, 2005). Variasjon og motivasjon er sterke støttespillere for økt mental aktivitet, i form av læringsutbytte, i et fag (Imsen, 2005). Variasjoner som kan styrke læringen er eksempelvis prosjektarbeid, samarbeid med næringsliv og praktisk arbeid i form av laboratoriearbeid.

### 1.1.6 Praktisk elevarbeid i naturfag

Naturfag er et obligatorisk fag i alle land, og i den norske læreplanens formål for naturfag står det:

*”... Å arbeide både praktisk og teoretisk i laboratorier og naturen med ulike problemstillinger er nødvendig for å få erfaring med og utvikle kunnskap om naturvitenskapens metoder og tenkemåter...” (Kunnskapsdepartementet, 2010d)*

Både L97 og Kunnskapsløftet slår fast at en viktig naturfaglig kompetanse er å kunne vurdere og bearbeide resultater, samt trekke konklusjoner fra empiriske data. Eksperimentelt og praktisk arbeid er ifølge læreplanen en viktig kompetanse i seg selv (Kjærnsli et al., 2007). PISA 2006's rapport ”Tid for tunge løft” anser praktisk arbeid i form av strukturerte elevøvelser, eller mer fri utforskning, som en viktig aktivitet i naturfagsundervisningen. Tiltross for vanskeligheter ved å bevise læringseffekt (Kjærnsli et al., 2007). Ved laboratoriearbeid nevnes blant annet to fallgruver: tidsbruk ved ustrukturert utprøving og

kokebokoppskrifter som medfølger svært dårlig mental utfordring for elevene. Resultatene fra PISA 2006 viser en negativ korrelasjon mellom mengde praktisk arbeid og naturfagsskår blant de nordiske landene, og i Norge er den negative korrelasjonen svak men signifikant (Kjærnsli et al., 2007). Det bør også nevnes at samtlige elever skårer lavt uavhengig av mengden praktisk arbeid, og dette indikerer lite læringsutbytte ved laboratoriearbeide (Kjærnsli et al., 2007). PISA 2006 viser at det er en negativ korrelasjon mellom høy egenutforskning og naturfagsnivå, noe som kan komme av at elevene lett går seg vill. Derfor advarer PISA 2006 mot høy elev frihet i det eksperimentelle arbeidet (Kjærnsli et al., 2007). Naturfagsundervisning med fokus på anvendelser av faget i dagliglivet viser derimot å ha en lav positiv korrelasjon med naturfagsskårene i de nordiske landene (Kjærnsli et al., 2007). Sammenligning mellom undervisningsformer viser at fokus på anvendelse av faget gir mest læringsutbytte, men praktisk arbeid har en liten men negativ korrelasjon med naturfagsskåren. Nederst på listen kommer utforskning av egne ideer (Kjærnsli et al., 2007).

Læringsutbytte påvirkes også av tilgjengelige læringsressurser, som bøker og veiledere. Den russiske psykologen Lev Vygotskij (1896-1934) var en sosial konstruktivist (Imsen, 2005). Vygotskij tok utgangspunkt i at kultur, språk og fellesskapet, som individet hører til, påvirker læringen og kunnskapen til individet. Vygotskij formulerte det som kalles "den nærmeste utviklingssonen". Dette er en beskrivelse på hva en mener et barn (elev) kan gjøre med hjelp og støtte, og hva en mener barnet kan klare på egen hånd (Imsen, 2005). Her kommer også viktigheten inn ved å legge opp undervisning med en vanskelighetsgrad som gjør at elevene må strekkes etter høyere kunnskap, og dette gjelder også ved laboratoriearbeide.

### **1.1.7 Laboratoriearbeide i dagens naturfagundervisning**

Hofstein og Lunetta definerer laboratorieaktiviteter som læringsopplevelser hvor studentene interagerer med materiale og/eller modeller, for å observere og forstå den naturlige verden (Hofstein & Lunetta, 2004). Laboratoriearbeide som ett praktisk og lærerikt avbrekk har blitt sett på som et positivt innskudd i den ellers så teoretiske skolen. I 1990 foreslo Tobin at meningsfull læring er mulig i laboratoriet dersom elevene får muligheten til å manipulere utstyr og materiale i et miljø tilpasset dem (Hofstein & Lunetta, 2004). Dette for å styrke deres kjennskap til fenomener og relaterte vitenskaplige konsepter. Noen år senere uttalte

Roth at vi vet at laboratoriet har et potensial, men vi må bruke mer tid på å finne dette (Hofstein & Lunetta, 2004).

I dag er vi i en ny tidsalder og under nye reformer og med dette, samt inntoget av teknologiske verktøy, er det viktig å revurdere laboratoriets muligheter i undervisningen. I laboratorieundervisning benyttes ofte etterforskning som metode. Dette går ut på å observere, stille spørsmål, utforske kilder, planlegging, undersøkelser, tolkning og konkludering. Det er svært viktig at laboratoriet ikke begrenses til å lære bestemte metoder, men at metodene og prosedyrene skal være hjelpemidler til å undersøke fenomener og løse problemer (Hofstein & Lunetta, 2004). Laboratoriearbeide skal hjelpe til å gi forståelse av vitenskaplige konsepter, interesse, motivasjon, praktiske vitenskaplige kunnskaper og problemløsende egenskaper. I tillegg skal laboratoriearbeidet bidra til forståelse av vitenskaplig forskning, tenking og resonering, samt lære metodebruk (Hofstein & Lunetta, 2004).

Følgende er en del begrensende faktorer som minsker læringsutbyttet ved laboratoriearbeid:

- Tid til både planlegging, gjennomføring og refleksjon ved laboratorieaktiviteter er ofte en hemmende faktor.
- Mange studier viser at både lærere og elever fokuserer mest på tekniske og manipulerende detaljer.
- Ofte er laboratoriematerialer skrevet slikt at aktiviteten blir gjennomført som ”kokebokoppskrift”, noe som kan medføre at elevene antar formålet er å følge instruksjonene eller få det rette svaret.
- Det er mange lærere ikke gjør det de mener å gjøre ved gjennomføring av laboratoriearbeid. Dette ender ofte med mindre resonerende arbeid, og innvirker på elevenes oppfatning og oppførsel ved laboratoriearbeid.
- Kunnskap fra laboratorieaktiviteter sees ofte på som mindre viktig blant elevene, på samme tid neglisjeres vurderingen av laboratoriearbeide fra skolens side.
- Etterforskningsaktiviteter i skolen er hemmet av ressursene. Andre hemmende faktorer inkluderer store klasser, ufleksible timeplaner på laboratoriene, og fokus på eksamineringer

(Hofstein & Lunetta, 2004)

Punktene over viser at det er mange begrensende faktorer innen laboratorieundervisningen, som påvirker læringsutbytte. Flere forbedringer kan gjøres for å øke læringsutbytte ved laboratoriearbeid. Disse utbedringene inkluderer blant annet at læreren bør prøve holde seg informert om utviklingen i faget for å bedre sin undervisningskompetanse. Læreren bør hjelpe elevene til naturlig refleksjon rundt det som skjer i undervisningen, samt må læreren reflektere over formål og utføring av undervisningen. Elevenes holdning til laboratoriekunnskap bør bedres. Andre punkter som tidsrammer og ressurser i laboratoriearbeid bør også utbedres.

Slagordet "Less is more" fra Benchmarks for Science Literacy beskriver hvordan læringsutbyttet mulig kan økes i undervisningen (Hofstein & Lunetta, 2004). Slagordet er en beskrivelse for at elevene lærer mer ved å fordype seg i noen få emner, framfor å lære litt om mange emner i et fag. Dette bør tas hensyn til i laboratorieundervisning.

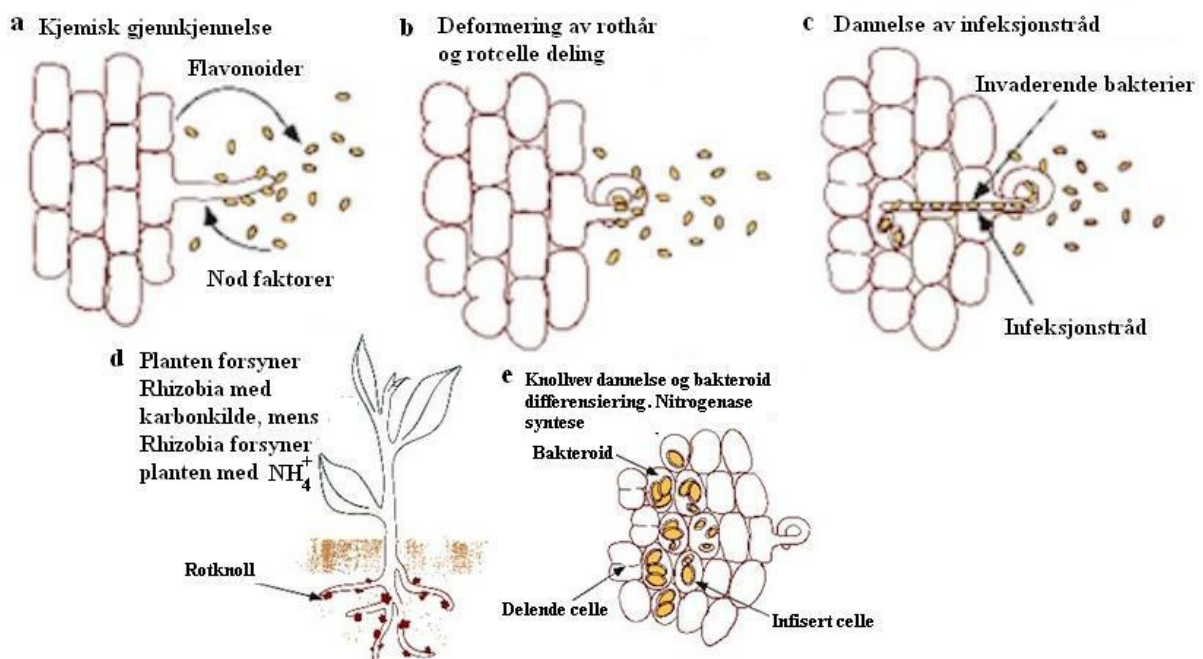
I dag finnes det teknologiske hjelpemidler som kan være med på å styrke undervisningen gjennom innsamling og analyse av data. Disse verktøyene kan gjøre at elevene og lærerne har mer tid til observasjon, refleksjon og til å oppnå forståelse som ligger i laboratorieøvelsene. Teknologiske verktøy gir muligheten med datasimulering, og dette kan være tidsbesparende samt inneholde mer personsikkerhet enn eksperimentelle forsøk (Hofstein & Lunetta, 2004). Med fokus på mye av begrensingene som finnes i laboratorieundervisningen bør det nevnes at laboratoriet har en vesentlig plass i naturfagsundervisningen. Mye av grunnen til dette er at laboratorieaktiviteter har spesielle potensialer som kan fremme viktig naturfaglig læring, ved at elevene får interagere med naturlig fenomener (Hofstein & Lunetta, 2004). Med utbedringer av begrensingene som forekommer på laboratoriet vil dette være en læringsarena hvor elevene lærer å utarbeide og bearbeide resultater, på samme tid som de vil få en sterkere faglig forståelse.

## 1.2 Biologisk bakgrunn

Laboratoriedelen av oppgaven omhandler inaktivering og karakterisering av det antatte regulatorgenet, *thuR*, i bakterien *Sinorhizobium meliloti*.

### 1.2.1 *Sinorhizobium meliloti*

*Sinorhizobium meliloti* (*S. meliloti*) er en gram-negativ jord bakterie og hører til familien Rhizobiaceae. *S. meliloti* forekommer som frittlevende saprofytt eller i symbiose med planter (Jensen et al., 2005). I symbiose danner *S. meliloti* nitrogenfikserende knoller på planterøtter. Atmosfærisk nitrogen som fikseres i knollene nyttegjøres av vertsplanten, og *S. meliloti* mottar karbonkilder som betaling (Gage, 2004, Gibson et al., 2008). Dannelsen av knoller skjer gjennom en rekke kompliserte steg og starter med utsonding av flavonoider fra planten, disse kan sanses av rhizobia i rhizofæren (Gage, 2004). Ved gjenkjenning av flavonoidene uttrykkes flere gener hos rhizobia, deriblant *nod*-gener. Uttrykk av *nod*-genene er påkrevd for knolldannelse, og gir blant annet opphav til signalmolekyler, kalt Nod-faktorer (figur 2) (Gibson et al., 2008, Gage, 2004).



Figur 2. Stegene i knolldannelsesprosessen mellom planter og *S. meliloti*. a) Planten og bakterien gjenkjenner hverandre kjemisk ved at planten skiller ut flavonoider og bakterien skiller ut Nod-faktorer. b) Når planten føler Nod-faktorene fører dette til deformering og krokdannelse av rothårene. Dette er startpunkt for infeksjonstråden. c) Ved starten av infeksjonstråden entrer bakteriene, og vokser innover i planten. d) Planten og bakterien lever i symbiose. Planten forsyner bakterien med karbonkilder og får anvendbare nitrogenkilder i retur. e) I primodium dannes knollvev, nitrogenase og bakteroidene differensieres (Tilpasset fra Duke University School of Medicine (Biochem, 2010)).

Både flavonoider og Nod-faktorer er svært spesifikke, og gjenkjennes normalt bare av potensielle symbionter (Franche et al., 2008). Nod-faktorene eksporteres ut av rhizobia, og kan gjenkjennes av planten. Denne gjenkjenningen fører til deformering og krokdannelse av plantens rothår, samt primordiumdannelse som senere gir oppgav til modent knollvev i planterøtter. Rhizobia entrer planten gjennom infeksjonstråder som oppstår mellom to rothår celler. Inne i infeksjonstråden vokser og deler bakteriene seg, mens infeksjonstråden vokser videre inn over i rotcellene. Når infeksjonstråden når knollprimordium vil bakteriene forlate infeksjonstråden ved endocytose (Patriarca et al., 2002). Derneft deler bakteriene seg noen ganger før de differensieres til bakteroider, og enzymet nitrogenase dannes. Differensieringen av bakteroider og nitrogenase dannelse er noen av forandringene som skjer ved knollmodningsprosessen. Nitrogenase er et oksygensensitivt enzym som fikserer atmosfærisk nitrogen (Franche et al., 2008). For å beskytte nitrogenasen mot oksygen består knoller av et ytre beskyttende lag, kalt peripheral vev (Patriarca et al., 2002). Det indre vevet, sentralvevet, i varetar nitrogenasens funksjon ved å opprettholde et lavt oksygennivå (Patriarca et al., 2002)

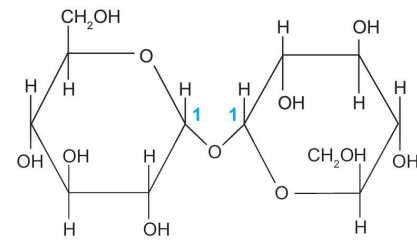
Det finnes minst to typer knoller, determinante og indeterminante knoller (Gibson et al., 2008). Determinante knoller har et meristem med begrenset celledeling, og dette medfører en kuleformet fasong. Determinante knoller forekommer hos tropiske eller subtropiske belgplanter. Indeterminante knoller har et aktivt meristem og dette medfører en mer avlang fasong (Gibson et al., 2008).

Som frittlevende saprofytt blir *S. meliloti* utsatt for mange biotiske og abiotiske faktorer som konkurranse om ressursene, temperatur svingninger, variasjon i pH og osmotisk stress (Jensen et al., 2002, Jensen et al., 2005). *S. meliloti* har i den forbindelse utviklet flere overlevelsesstrategier, som blant annet ved osmotisk stress dannes og akkumuleres trehalose (Jensen et al., 2002).

### 1.2.2 Trehalose

Trehalose består av to glukose enheter bundet sammen i en  $\alpha,\alpha$ -1,1 konfigurasjon. Dette gir en stabil ikke-reducerbar disakkarid (figur 3)(Paul et al., 2008). Trehalose kan syntetiseres hos de fleste organismer med unntak av vertebrater. Hos planter har trehalose vist seg å være et uunnværlig signalmolekyl som samkjører metabolisme og utvikling i respons til

karbontilgjengelighet og stress (Paul et al., 2008). I bakterier og sopp er trehalose en viktig osmoprotektant, og kan erstatte vannmolekyler ved å danne hydrogenbindinger til polare områder. Dette beskytter proteiner og membraner fra denaturering ved tørke- og kuldestress (Paul et al., 2008). Under tørke danner trehalose en formløs (amorf) glasstruktur som begrenser molekylære bevegelser. Dette hindrer protein aggregering og diffusjon av frie radikaler (Paul et al., 2008). Ved normale omstendigheter kan bakterier benytte trehalose som hovedkarbon- og energikilde (Jensen et al., 2002).

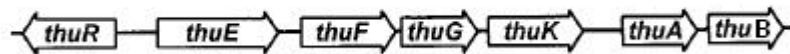


**Figur 3. Trehalose dannes av to glukose enheter som er bundet sammen i en  $\alpha,\alpha$ -1,1 konfigurasjon og gir en stabil ikke reduserbar disakkarid. Figur hentet fra (Paul et al., 2008)**

I tillegg til å syntetisere trehalose har også *S. meliloti* trehalosetransport- og nedbrytingssystemer (Jensen et al., 2002). Et av trehalosetransport-systemene, som står for opptak av trehalose, kodes av *thuEFGK*-genene (Jensen et al., 2002). Nedstrøms for disse genene ligger trehalosekatabolisme genene og kodes av *thuA* og *thuB* (Jensen et al., 2005).

### 1.2.3 *thuEFGK*

Genene *thuE*, -F, -G og -K koder for komponenter av en ATP-binding cassette transporter (heretter kalt



**Figur 4. *thu*-genene plassert i forhold til hverandre. (Jensen et al., 2002, Grønmo & Onstad, 2009b)**

ABC-transporter) hvor funksjonen er opptak av trehalose (Becker et al., 2006).

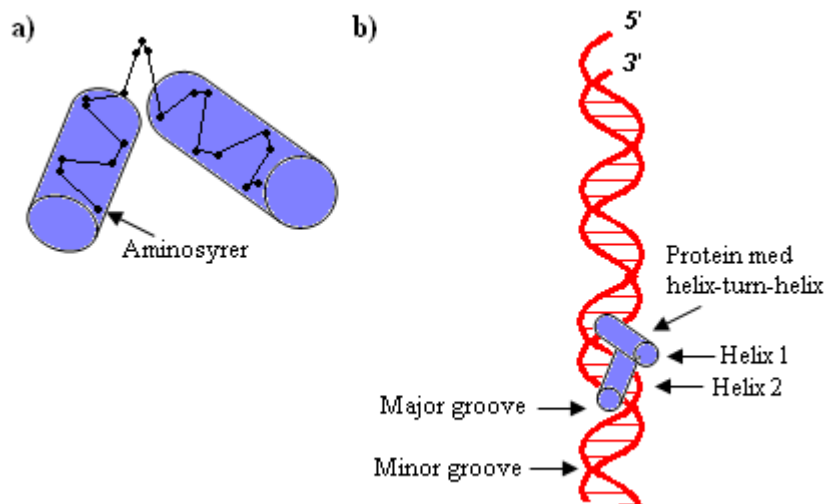
Trehalosetransport- og katabolismegenenes plassering i forhold til hverandre vises på figur 4. Komponentene i ABC-transporteren formodes å være et trehalose/maltose bindende protein (ThuE), to integrale proteiner (ThuF og ThuG) og et ATP-bindende protein (ThuK) (Jensen et al., 2002). Nedstrøms av trehalosetransportgenene ligger *thuA* og *thuB*, som er antatt å være proteiner involvert i trehalose katabolisme (Jensen et al., 2005). Både trehalosetransport- og katabolismegenene antas å være regulert av en regulator, *thuR*, som ligger oppstrøms av *thuEFGK*, *thuA* og *thuB* (Jensen et al., 2002, Jensen et al., 2005).

### 1.2.4 *thuR*

Det antatte translasjonsproduktet av *thuR* inneholder et helix-turn-helix motiv som er karakteristisk for mange DNA-bindende proteiner (Jensen et al., 2002). Dette motivet danner to  $\alpha$ -helixer som er bundet sammen av en kort aminosyre sekvens (figur 5a). Helix 2 gjenkjenner



DNA og binder i major groove, i dobbeltrådig DNA, ved blant annet en rekke hydrogenbindinger (figur 5b). Helix 1 stabiliserer intraksjonen mellom proteinet og DNA. Bindingen av helix-turn-helix til DNA gir konformasjonsendringer som aktiverer eller hindrer DNA transkripsjon (Snyder & Champness, 2007).



**Figur 5. a) Struktur til et Helix-turn-helix domene. b) Intraksjoner av helix 1 og helix 2 med dobbeltrådig-DNA.**

### 1.3 Problemstilling

Masteroppgaven på studiet ”lektorutdanning i realfag” er både faglig og didaktisk rettet. I denne oppgaven ble det gjennomført et prosjekt innenfor molekylærbiologi ved Institutt for Arktisk og Marin biologi, Universitetet i Tromsø. Prosjektet gikk ut på å inaktivere det antatte regulatorgenet, *thuR*, hos *S. meliloti*. For å gjennomføre dette prosjektet ble flere bioteknologiske forskningsmetoder benyttet. Kunnskapen som ble opparbeidet ved laboratoriearbeidet ble så benyttet innen den didaktiske delen av oppgaven.

I dette studiet var det ønskelig å undersøke lærer og elevenes syn på laboratoriearbeid som en del av undervisningen, og muligheter til hvordan laboratoriearbeid kan legges opp for å bedre læringsutbyttet. Progresjon i arbeidet ble lagt opp ved først å øke personlig kompetanse i bioteknologiske metoder, før noen av disse metodene ble benyttet for å gjennomføre et undervisningsopplegg for en biologi 2 klasse.

Problemstilling ble dermed som følgende: Hvilket syn har lærer og elevene ved en biologi 2 klasse på laboratoriearbeid, og hvordan kan laboratoriearbeide legges opp for å bidra til bedre læring? Hvordan kan universitetet bidra?

## **2. Materiale og Metoder**

### **2.1 Didaktiske metoder**

#### **2.1.1 Samfunnsvitenskaplige metoder**

Dette studiet benyttet skriftlige spørreundersøkelser og intervju for dataproduksjon. De skriftlige undersøkelsene ble benyttet for produksjon av helhetlig bakgrunnsdata blant lærer og elever, og bestod både av avkryssings- og åpne spørsmål. Sistnevnte spørsmålstype krevde svar med refleksjon. Ettersom det var to informantgrupper, elever og lærer, var det tilsvarende to undersøkelser. Det var 17 elever som deltok på denne undersøkelsen, hvorav 3 gutter og 14 jenter, og alle kom fra samme biologi 2 klasse. For videre utdypning av spørreundersøkelsen ble fire elever intervjuet. Disse elevene meldte seg frivillig, og representerte begge kjønn, samt faglig sterke og svakere elever. I gjennom samarbeidet med klassen ble det utført uformelle samtaler med lærer i planleggings-, gjennomførings- og avslutningsfasen. I dette kapitlet blir metodene benyttet i planleggingen og gjennomføringen av undersøkelsene beskrevet.

#### **2.1.2 Kvantitativ- og kvalitativmetode**

Kvantitativ- og kvalitativmetode kan i første rekke skilles ved egenskapene til dataene som produseres og analyseres. Overfladisk kan en si at kvantitative metoder produserer data som kan uttrykkes i form av rene tall eller andre mengdetermer, data som ikke kan uttrykkes i slike mengdetermer er kvalitativ. Intervju og observasjon kan gi kvantitative og kvalitative data (Grønmo, 1996).

Tross i forskjellige egenskaper til de produserte data ved kvantitative og kvalitative metoder, brukes gjerne metodene komplementært. Metodene utfyller hverandre ved at en metodes svakhet veies opp ved den andre metodens styrke. Ved bruk av metodene komplementært gir dette sammenligningsgrunnlag av produsert data, kvalitet på undersøkelsene kan valideres og analyseresultatenes tillit blir styrket. I tillegg vil avvik i resultatene raskt avdekkes, og en vil få mer nyanser og helhet i dataene (Grønmo, 1996). Under de følgende avsnittene er det nevnt en del karakteristikk som preger metodene.

### **2.1.2.1 Karakterer ved kvantitativ metode**

Kvantitative metoders problemstilling består av statistisk generalisering, designet er strukturert, kilden er på avstand med selektivitet og tolkningsmuligheten preges av orden (Grønmo, 1996). Analysen består av representative oversikter over generelle forhold som preges av bredde. Ofte brukes kvantitative metoder for testing av hypoteser og teorier. Under testing av hypotesen er fokus rettet på enkelte utvalgte variabler for å beskrive statistiske generaliseringer. Variablene tilhører forhåndbestemte kategorier, og er vitale i analysen. Egenskaper i en populasjon og oppfatninger i en klasse er eksempel på disse variablene. Analysen og datainnsamling er separat. Analysen illustreres gjerne med tabeller, hvor hovedmålet er å måle og kvantifisere. Ofte brukte metoder innen kvantitativ forskning er strukturert intervjuing og spørreundersøkelser (Grønmo, 1996).

### **2.1.2.2 Karakterer ved kvalitativ metode**

Problemstillingen ved kvalitative metoder preges av analytisk beskrivelse, designet er fleksibelt, kilden er karakterisert av nærhet og sensitivitet, samt domineres tolkningsmuligheten av relevans (Grønmo, 1996). Analysen kjennetegnes av helhetlig forståelse om spesifikke forhold, og preges av dybde. Ofte brukes kvalitative metoder for utvikling av hypoteser og teorier. Begreper og kategorier inngår som viktige elementer i metodene, og forståelse av ulike kategoriers innhold er vektlagt. Ofte gir avklaring og utvikling av begreper grunnlaget for kategorier som de produserte data senere systematiseres i. Resultater fra kvalitative metoder er ikke et fasitsvar på hvordan virkeligheten er, men mer en mulig tolkning og beskrivelse av virkeligheten. Analysen utføres ofte parallelt med datainnsamling og illustreres med sitater (Grønmo, 1996). Observasjon eller intervjuing er mye brukte metoder for datainnsamling ved kvalitative forskning.

### **2.1.3 Kvalitativt spørreskjema**

Kvale beskriver surveyintervju som er et muntlig spørreskjema bestående av kvalitative spørsmål (Kvale et al., 2009). Surveyintervju følger standardregler med minimalt personlig skjønn. Spørsmålene er konstruert både i form og rekkefølge på forhånd, med en bestemt ordlyd. Det er det ingen rom for oppfølgingsspørsmål, og gir minimalt personlig preg fra intervjuerens side (Kvale et al., 2009). Kvale omtaler ikke skriftlige kvalitative spørreskjema, da han mener dette er det motsatte av kvalitativ intervjuforskning (Kvale et al., 2009). Surveyintervju har samme regler som en skriftlig undersøkelse med kvalitative spørsmål, og vil dermed kunne gi samme type data. Postholm til Phillips som kaller informasjon en får

gjennom et spørreskjema for "low-level-knowledge" (Postholm, 2010). Dette uttrykket er spesielt rettet mot spørsmål der svarene er forventet. Postholm nevner også at en kan stille spørsmål der deltakerne må reflektere og dermed får fram en subjektiv holdning. Disse spørsmålene sees på som kvalitative, men med manglende mulighet til stilling av oppfølging spørsmål (Postholm, 2010).

#### **2.1.4 Kvalitativ forskningsintervju**

Kvalitativ forskning handler ifølge Postholm (Postholm, 2010) om å forstå deltakerens perspektiv. Kvalitative forskningsintervju brukes for å forstå verden fra informantens side, og forskningens mål er å produsere kunnskap basert på dagligdagse samtaler (Kvale et al., 2009). Ett intervju er ifølge Kvale en samtale med grad av struktur og hensikt, og går dypere enn en normal dagligdags samtale (Kvale et al., 2009). Gjennom et sosialt samspill mellom intervjuer og informant dannes en aktiv kunnskapsprosess. I et forskningsintervju er det viktig og både spørre og lytte, og det er forskeren som definerer tema. Forskeren følger kritisk opp intervjuobjektets svar ved oppfølgingsspørsmål for å få dybde i dataene som produseres. Analysen og refleksjonen starter altså under gjennomføring av intervjuet, ved oppfølgingsspørsmål. Tilstrekkelig bakgrunnsinformasjon i intervjuets tema er dermed påkrevd for å kunne gjennomføre analyse og intervju parallelt (Kvale et al., 2009). Det finnes ingen kokebokoppskrift for å bli en god intervjuer og intervjuferdighetene må opparbeides. Kvalitative forskningsintervju karakteriseres derfor av Kvale som et håndverk (Kvale et al., 2009). Kvaliteten til intervjuet måles ut fra styrken til kunnskapen som produseres.

Det finnes mange forskjellige kvalitative forskningsintervju. Postholm kategoriserer intervjuformene etter hvilken grad intervjuene på forhånd er planlagt (tabell 1)(Postholm, 2010).

Tabell 1. Postholds kategorisering av intervjuformer

Intervju	Karakterer ved intervjutypen
<b>Strukturert intervju</b>	Intervjueren stiller alle informantene den samme serie av spørsmål.
<b>Semistrukturert intervju</b>	Tema og noen spørsmål klart på forhånd, men er åpen for at informanten også har ulike forhold som den vil ta opp. Oppfølgingsspørsmål er svært sentrale i denne intervjuformen.
<b>Gruppeintervju</b>	Utspørring av flere individer enten hver for seg eller samtidig. Forskeren leder interaksjonen, og dersom individene intervjues samtidig kan informantene i fellesskap komme med en dypere beskrivelse av det som fokuseres på.
<b>Ustrukturert intervju</b>	Svært åpne intervju og kommer ofte fra uforutsette samtaler på forskningsfeltet. Her er det ofte ingen for forhåndskategorisering

Kvale kategoriserer forskjellige intervju etter hva som skal undersøkes (tabell 2 Tabell 2) (Kvale et al., 2009).

Tabell 2. Kvaless kategorisering av intervjuformer

Intervju	Karakterer ved intervju
<b>Datastøttende intervju</b>	Internett benyttes som hjelpemiddel i utføringen av intervjuet, hvor spørsmålene stilles spørsmålene via e-post eller chatteprogram. Spørsmålene som stilles kan ha ulike grad av strukturering.
<b>Fokusgruppeintervju</b>	Intervju av seks til ti personer og ledes av en moderator. Intervjustilen er ikke-styrende, og målet er å få fram forskjellige synspunkter
<b>Faktuelle intervju</b>	Fokuset er på den faktiske informasjonen som blir gitt, og mindre på det personlige preget en historie får av sin informant.
<b>Begrepsintervju</b>	Fornålet er begrepsavklaring eller avdekking av fenomener.
<b>Konfronterende intervju</b>	Målet er å skape innsikt gjennom en dialektisk utvikling av motsetninger som går ut på å teste teser, som fører til utviklingen av antiteser, og motsetningen mellom disse skaper en syntese.

Hele feltet må studeres og en enkelt intervjuform kan bare være med å hjelpe forskeren til å utvikle forståelse (Postholm, 2010).

Ifølge Kvale kan intervjuforskning deles inn i syv stadier som følger intervjuforløpet fra start til slutt (tabell 3)(Kvale et al., 2009). Hvert av de syv stadiene må planlegges og gjennomføres med hensyn på de resterende stadiene, dette for samkjøre intervjuforløpet til en helhetlig prosess.

**Tabell 3. Kvales inndeling av intervjuforskning.**

<b>Stadium</b>	<b>Forløp</b>
<b>1. Tematisering</b>	Formålet med undersøkelsen formuleres, og egen oppfatning av emnet beskrives. Hvorfor og hva spørsmål klarlegges før hvordan (metoden).
<b>2. Planlegging</b>	Studien planlegges med hensyn på undersøkelsens syv stadier. Dette gjøres med henblikk på innhenting av ønsket kunnskap.
<b>3. Intervju</b>	Intervjuet gjennomføres etter en intervjuguide, med en reflektert tilnærming til kunnskap som søkes og intervjusituasjonens mellommenneskelige relasjoner.
<b>4. Transkribering</b>	Intervjumaterialet klargjøres for analyse, dette innebærer som regel transkribering til en skriftlig tekst. Egne opplevelser og miljøbeskrivelser kan inkluderes.
<b>5. Analyse</b>	Undersøkelsens formål og emneområde benyttes for valg av analysemetode
<b>6. Verifisering</b>	Undersøk resultatenes generaliserbarhet, reliabilitet og validitet.
<b>7. Rapportering</b>	Resultatet av undersøkelsen og de anvendte metodene rapporteres i en form som overholder de vitenskapelige kriteriene.

Tematiseringen for intervjuene defineres av problemstillingen til oppgaven. I denne oppgaven var det blant annet ønskelig å undersøke lærer og elevenes syn på laboratoriearbeid. I denne sammenheng ble spørreundersøkelsene utformet for å skaffe et helhetlig bilde av klassen, bestående av relativt usynlige spørsmål om laboratoriearbeid. De produserte data fra undersøkelsen ble så benyttet som grunnlag for utdypende spørsmål ved elevintervju. Lærerundersøkelse og ustrukturert intervju i form av samtaler fokuserte faglig bakgrunn,

oppfatning av egen kompetanse og undervisning. Forventninger og forslag til bidrag fra universitet i undervisningen var også i fokus ved både elev- og lærerundersøkelser.

Elevintervjuene ble gjennomført på elevenes skole en ukes tid etter universitetsbesøket, og kunne kategoriseres som et semistrukturert intervju ifølge Postholm (Postholm, 2010), eller som et faktisk intervju ifølge Kvale (Kvale et al., 2009).

Transkriberingen ble utført i stikkordsform under intervjuet etterfulgt av en grundig loggføring. De produserte data ble så organisert og klargjort for analysen, og relevante data for undersøkelsen ble fremmet. Dataene ble forsøkt verifisert gjennom testing av forskningens reliabilitet, validitet og generaliserbarhet (Kvale et al., 2009). Reliabilitet omhandler undersøkelsenes pålitelighet, og kan påvirkes av faktorer fra alle de syv stadiene i intervjuets forløp (Kvale et al., 2009). Disse faktorene kan inkludere spørsmålsformuleringer, transkripsjonens pålitelighet og subjektivitet ved analyse. I denne undersøkelsen ble reliabiliteten forsøkt opprettholdt ved en objektiv analyse, sammenligning av data og ved å unngå ledende spørsmål. Da intervjuet ble transkribert i stikkordsform og med loggføring kunne ikke reliabiliteten til transkripsjonen testes. Validitet omhandler undersøkelsens gyldighet, og baseres på om en metode er egnet til å undersøke det som er ment. For å kontrollere gyldigheten betraktes gjerne feilkilder ved undersøkelsen (Kvale et al., 2009). I denne undersøkelsen ble lærerens og elevenes bakgrunn undersøkt for å danne et helhetlig bilde av klassen. Et slik helhetlig bilde vil også kunne avdekke faktorer som vil spille inn på undersøkelsens resultater. Rapportering er i denne undersøkelsen utført i tekst form med siteringer fra undersøkelsene og intervjuene, og dette finnes i resultatdelen. Figur 6 viser intervjuguiden benyttet ved gjennomføring av intervju.



**Intervjuguide**

## Vanskelige tema

- Hva er det som gjør et tema innenfor biologi vanskelig?
- Er lærerne i biologi flink og legge opp undervisningen slik at vanskeligere tema blir lettere? Eventuelt hvordan?
- Er det noe annet som kan lette undervisningen i vanskelige temaer?

## Studievaner

- Hvilke studievaner har du? Begrunnelse for hvorfor du benytter disse.

## Læringsutbytte

- Hva lærer du mest av?
  - Hvorfor tror du, du lærer mest av dette?
  - Hvorfor er forelesning en bra metode?
- Hvilket læringsutbytte har du av labarbeide? Begrunn hvorfor.
- Hvordan påvirker læreren ditt læringsutbytte?
  - Hva tror du ligger bak lærerens formidlingsevne? Eventuelt hva betyr ordnet?
- Hvordan er læringsmiljøet i klassen?
- Hvilken variasjon liker du at benyttes i forhold til undervisningsmetoder?

## Universitetsbesøk

- Hvilke forventninger hadde du?
  - Tilsvarte det forventningene?
- Hvordan var vanskelighetsgraden på universitetsbesøket?
- Fikk du økt forståelsen for tema på noen måte?
- Kan du nevne positive og negative ting om universitetsbesøket?
- Hva tror du universitet kan bidra med i undervisningen?
- Er universitetsbesøk en motivasjon i seg selv?

**Figur 6. Intervjuguide ved elevintervju**

### 2.1.5 Gjennomføring av elevbesøk

Ved elevbesøket, utført ved Universitetet i Tromsø, deltok en biologi 2 klasse og deres lærer. Øvelsen som ble gjennomført hadde tema genetisk fingeravtrykk, og benyttet de bioteknologiske metodene PCR og agarose gel elektroforese. Øvelsens formål var å skille individer i en kriminalsak ved bruk av DNA fra åstedet. Grunnleggende forkunnskaper til denne øvelsen er egenskaper til DNA, prinsippet bak PCR og agarose gel elektroforese.

Genetisk fingeravtrykk inngår i læreplanens hovedmål bioteknologi i programfaget biologi 2. Læreren ønsket å gjennomgå relevante emner i forkant av elevbesøket, slik at elevene kunne nyttegjøre seg av besøket best mulig. En uke før elevbesøket ble et laboratoriekompedium med tilhørende teoridel sendt til klassen, og kompendiet i sin helhet finnes i appendiks. Teoridelen var grundig beskrevet da læreren tidligere hadde klaget på uklarheter i læreboka. Kompedit inneholdt også internett linker til animasjoner og nyttige nettsteder som elevene kunne benytte for å øke sin forståelse. Målet med kompendiet var at elevene skulle få en presentasjon av tema for dagen, samt få et innblikk i metodenes som skulle benyttes. En kriminalhistorie var utgangspunktet for øvelsen, og elevene skulle løse denne ved bruk av bioteknologiske forskningsmetoder.

**Tabell 4. Dags plan for elevbesøk**

Klokkeslett	Aktivitet
09.00	Oppmøte
09.15-09.30	Gjennomføring av undersøkelse
09.30-11.00	Pipettering, tillaging av PCR, Lage agarose gel, samt starte kjøringen
11.00-11.30	Lunsj
11.30-12.30	Gjennomgang av PCR, gel elektroforese og genetisk fingeravtrykk. Forberede rapport skrivning, og mulighet for spørsmålsstilling
12.30-13.00	Ta bilde av gelen, analysere resultatene. Tilbakemeldinger fra elevene

Dagen startet med besvaring av den skriftlige spørreundersøkelsen. Etter dette fikk elevene en introduksjon i pipettebruk, som skulle gjøre elevene klare for å blande PCR reagensene. Ved

klargjøring av PCR pipetteres svært små volumer og det ble sett som nødvendig at elevene til en viss grad kunne vurdere egen nøyaktighet. Etersom PCR programmet tok over fem timer, fikk elevene utdelt et ferdig kjørt PCR produkt som tilsvarte prøven hver elevgruppe arbeidet med. Denne prøven fikk hver gruppe sette på gelen til elektroforesen. Under kjøring agarose gel elektroforesen spiste elevene lunsj, og det ble holdt en gjennomgang for fagligutdypning av tema. Etter gel elektroforese kjøring ble gelen fotografert. Klassen analyserte resultatene og ble i fellesskap enig om skyldige i krimhistorien. Avslutningsvis fikk elevene komme med spørsmål og kommentarer rundt elevbesøket. Under gjennomføring av øvelsen var min rolle å hjelpe til etter behov, og mindre grupper ble introdusert til utstyr og prinsipp bak PCR og agarose gel elektroforese.

## 2.2 Biologiske/laboratorietekniske material og metoder

### 2.2.1 Material

Tabell 5. Vekstmedier brukt for bakteriedyrking. <sup>1)</sup>

Medium (1 liter)	Ingredienser	Merknad
LB medie	10 g Trypton 5 g gjærekstrakt 10 g NaCl Ca. 1000 ml dH <sub>2</sub> O (15-18 g Bactoagar)	Bactoagar benyttes kun dersom det ønskes fast vekstmedium.  Brukes under dyrkning av <i>E.coli</i>
TY medie	5 g Trypton 3 g gjærekstrakt 0,87 g CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O Ca. 1000 ml dH <sub>2</sub> O (15 g Bactoagar)	Bactoagar benyttes kun dersom det ønskes fast vekstmedium.  Brukes under dyrkning av <i>S.meliloti</i>
S.O.C. medie	20 g Trypton 5 g gjærekstrakt 0,5 g NaCl 10 ml 250mM KCl 950 ml dH <sub>2</sub> O 20 ml 1M (18 %) glukose 5 ml 2M MgCl <sub>2</sub>	Glukose og MgCl <sub>2</sub> autoklaveres hver for seg, separert fra resten av blandingen og tilsettes etter autoklaving.  Dette mediet benyttes under transformasjon av elektrokompetente celler.
10XM9 salter	128 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 30 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 5 g NaCl 10 g NH <sub>4</sub> Cl dH <sub>2</sub> O opp til 1000 ml	Autoklaveres. Benyttes for å lage M9 minimalmedium.
M9 minimalmedium	100 ml 10 X M9 salter 2 ml 1M MgSO <sub>4</sub> (sterile) 1 ml 0,1 M CaCl <sub>2</sub> (steril) Tilpass karbonkilde til 0,4 % av sluttkonsentrasjon	CaCl <sub>2</sub> tilsettes når løsningen er kjølt ned for å unngå utfelling.  Mediet benyttes for seleksjon av transkonjuganter etter karbonkilde.

	<p>Tilsett vitaminer, konsentrasjon finnes i Tabell 7</p> <p>Tilsett aktuelle antibiotika med tilpasset sluttkonsentrasjon, se tabell 6</p> <p>Tilpass dH<sub>2</sub>O (steril) til en slutt konsentrasjon på 1000 ml</p> <p>Tilsett 15 g agar dersom det skal benyttes til plater</p>	
--	--	--

1) Alle mediene ble autoklavert før bruk. Ved tillaging av selektive plater ble seleksjonsmidlet tilsatt mens mediet enda var handvarmt (ca 37°C)

**Tabell 6. Antibiotika stockløsning <sup>2)</sup>**

Antibiotika	Stockløsning	Løsemiddel for stockløsning	Arbeidskonsentrasjon (relaxed plasmid)
Kanamycin	100 mg/ml	dH <sub>2</sub> O	50 µg/ml
Streptomysin	250 mg/ml	dH <sub>2</sub> O	50 µg/ml
Tetracycline	5 mg/ml	Etanol	5 µg/ml
Ampicillin	199 mg/ml	dH <sub>2</sub> O	50 µg/ml

2) Antibiotika som ikke løses i etanol må filtersteriliseres før bruk (Sambrook & Russell, 2001). Antibiotika er generelt varmesensitivt, og tilsettes normalt ikke før løsningene er kjølt ned til ca. 50°C for at de ikke skal miste sin funksjon. (merk! Ved flytende kulturer kan konsentrasjonen være mindre enn arbeidskonsentrasjonen oppgitt her)

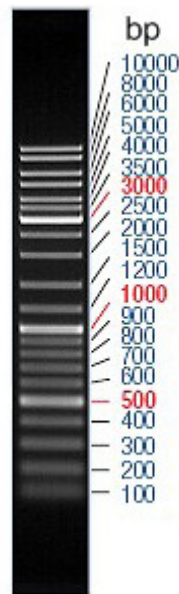
Tabell 7. Stockløsninger

Reagens	Ingredienser
10 % glukose (w/v)	10 gram glukose 100 ml dH <sub>2</sub> O
10 % trehalose (w/v)	10 gram trehalose 100 ml dH <sub>2</sub> O
Biotin (0,25 mg/ml)	0,25 mg Biotin 1 ml etanol
Tiamin HCl (0,5 mg/ml)	0,5 mg Tiamin HCl 1 ml dH <sub>2</sub> O

Tabell 8. Ingredienser benyttet for agarose gel elektroforese

Reagens	Produsent/innhold
1x TBE buffer <sup>3</sup>	10,8 g Tris 5,5 g Borat 0,93 g EDTA dH <sub>2</sub> O opp til 1000 ml
1x TAE buffer <sup>3</sup>	24,2 g Tris 5,7 ml eddiksyre 10,0 ml 0,5 EDTA dH <sub>2</sub> O opp til 1000 ml
Agarose LE, Analytical Grade	Promega
6x Gel Loading buffer	MBI-Fermentas
Ethidium Bromid (0,5 µg/ml)	EuroClone
GeneRuler DNA Ladder Mix (0,5 µg/µl)	MBI-Fermentas

3) Kun av buffere benyttes ved tillaging av gel.



Figur 7. Markør, GeneRuler DNA ladder mix. En oversigt over størrelse på båndene.

Tabell 9. Reagenser benyttet for PCR og sekvensering

Reagens	Produsent
Dynazym polymerase	Finnzymes
10X Dynazym buffer	Finnzymes
dNTP miks	Finnzymes
MgCl <sub>2</sub>	Finnzymes
BigDye Terminator v3.1 Sequencing kit	Applied Biosystems

Tabell 10. Primere benyttet til PCR

Primer	Sekvens	Produsent
ThuR forward (EcoR1)	5' -CCGAATTCATGAGCGGCATGG -3'	Sigma
ThuR reverse (KpnI)	5' - TCGGTACCACAAGGCCGACCG -3'	Sigma
MedR	5' -GGCGATTAAGTTGGGTAAGG-3'	Eurogentec
F882	5' - TCAAGGAATTCGCCAAACAG -3'	Sigma
F855	5' - TCTCTCCAACGACGGTAAGC -3'	Sigma
F700	5' - GTTATGGGTCGCAACGAATT -3'	Sigma

Tabell 11. Eksperimentelt utstyr

Navn	Produsent	Beskrivelse
TProfessional thermocycler	Biometra	Thermal Cyckler (PCR maskin)
Pulse Controller Gene Pulser	Bio-Rad	Elektroporator
SpectraMAX 250	Molecular Devices	Spektrofotometer for cellekonsentrasjon
Nano Drop 1000	Thermo Fisher Scientific	Spektrofotometer for DNA konsentrasjon
Gel Doc 2000	Bio-Rad	Fotosystem for gelbilder
Avanti Centrifuge J-20 XP	Beckman Coulter	Gulvsentrifuge
Centrifuge 5417	Eppendorf	Benksentrifuge
3130x1 Genetic Analyser	Applied Biosystems	DNA sekvensering
Geneious Pro trial 4.8.5	Biomatters Ltd.	Sekvensanalyse Software
Sequence Scanner 1.0	Applied Biosystems	Sekvensanalyse Software
BLAST	<a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/</a>	Alignment tool
Primer-BLAST	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/</a>	Primer designing verktøy



Tabell 12. Bakterielle stammer og plasmider benyttet i arbeidet

Navn	Beskrivelse	Referanser
<i>Sinorhizobium meliloti</i> stamme Sm1021	Villtype. Stp <sup>R</sup>	(Meade et al., 1982)
<i>Sinorhizobium meliloti</i> stamme Sm 7018	Sm1021 med thuR::pThuR566, (thuR- lacZ) transcriptional fusion, Str <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>	Dette arbeid
<i>Escherichia coli</i> stamme S17/1λpir	Elektrokompetente celler benyttet ved transformasjon og konjugasjon	(Simon et al., 1983)
pVIK112	Benyttet for innligering av <i>thuR</i> fragment og dannelse av pThuR566	(Kalogeraki & Winans, 1997)
pApa7023	Inneholder <i>thu</i> -genene, benyttet ved PCR for dannelse av <i>thuR</i> fragment.	(Jensen et al., 2002)
pThuR566	pVIK112 med innsatt <i>thuR</i> fragment. Km <sup>R</sup>	Dette arbeid

## 2.2.2 Biologiske metoder

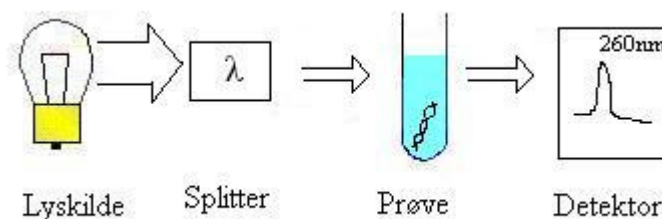
I dette kapitlet presenteres det teoretiske bak de laboratorietekniske metodene som ble benyttet ved gjennomføring av prosjektet. Metodene forklares detaljert da en av hensiktene med denne oppgaven var å opparbeide en dypere fagbakgrunn. Prosedyrene presenteres punktvis og skjematisk i appendiks.

### 2.2.2.1 Plasmidrensing

Plasmidrensing er en teknikk som benyttes for å rense opp plasmider fra en bakteriekultur. For opprensing av plasmid er det her brukt "Alkaline Lysis Mini-Prep Protocol" (Preusslab, aksessert 2009). Metoden starter ved at cellene lyses ved bruk av SDS og NaOH. NaOH er en base som øker pH-verdien i løsningen til 12-12,5. Ved en høy pH vil det kromosomale DNA denatureres, mens plasmider forblir upåvirket (Birnboim & Doly, 1979). SDS danner komplekser med proteiner og store RNA molekyler, og som kan sentrifugeres ned grunnet størrelse. RNaseA tilsettes for kløyving og degradering av RNA. I neste trinn tilsettes en buffer, bestående av natrium-acetat og konsentrert eddiksyre, som får det kromosomale DNA til å renaturere. Grunnet hurtig endring i pH vil det kromosomale DNA danne et uløselig nettverk (Birnboim & Doly, 1979). Plasmidene er upåvirket og er løst i supernatanten. Ved å overføre supernatanten til et nytt rør kan plasmidet vaskes ytterligere, og benyttes i videre undersøkelser (Birnboim & Doly, 1979).

### 2.2.2.2 Måling av DNA konsentrasjon

Konsentrasjonen av DNA ble målt ved hjelp av NanoDrop ND-1000 Spektrofotometer (Saveen Werner).



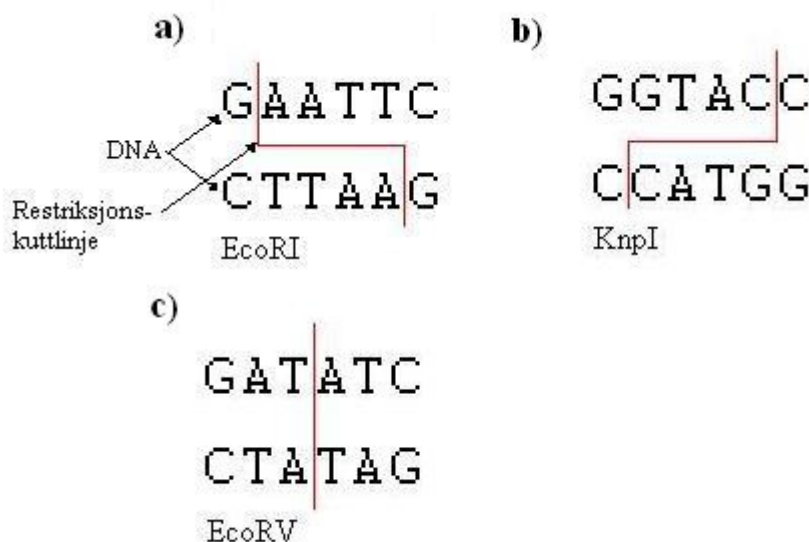
**Figur 8.** Oppsettet til et spektrofotometer. Lyset fra lyskilden går gjennom en splitter som separerer lyset i forskjellige bølgelengder. Deretter går lyset gjennom prøven, og videre til detektoren. Detektoren måler intensiteten på lyset som har sluppet gjennom prøven, og omgjør dette til absorbans (A) også kalt optisk tetthet (OD)

Spektrofotometeret måler intensitet som funksjon av bølgelengden på lyset, og består av komponentene lyskilde, splitter og detektor (Gerhardt et al., 1994). Lyset fra lyskilden blir

splittet i forskjellige bølgelengder når lyset sendes gjennom splitteren (figur 8). Videre sendes kun ønsket bølgelengde inn i prøven, og videre til detektoren. Her måles intensiteten til lyset som har sluppet gjennom prøven. Intensiteten på lyset måles i absorbans eller optisk tetthet, og er et tall på mengden lys har sluppet gjennom prøven. DNA absorberer lys med bølgelengde 260 nm (Gerhardt et al., 1994).

### 2.2.2.3 Kutting av DNA med restriksjonsenzymmer

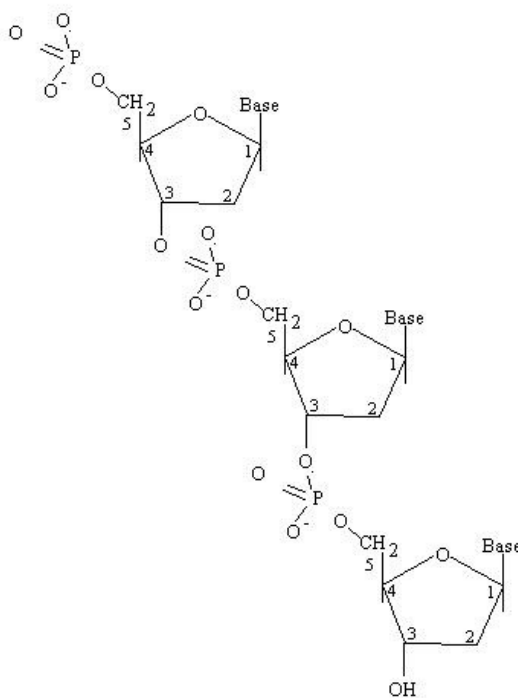
Restriksjonsenzymmer er endonukleaser og kutter dobbeltrådig DNA ved helt bestemte sekvenser, kalt restriksjonsseter, inne i en større DNA sekvens (Snyder & Champness, 2007, Børresen-Dale). Noen restriksjonsenzymmer kutter med ett forskjøvet kutt, og her kuttes de to komplementære trådene ved ulike basepar og den ene DNA tråden blir lengre enn den andre (figur 9). Andre restriksjonsenzymmer kutter dobbeltrådig DNA i ett rett kutt ved samme basepar, og de to DNA trådene har dermed lik lengde (figur 9) (Gerhardt et al., 1994, Sambrook & Russell, 2001). Restriksjonsenzymmer finnes naturlig i celler og er en forsvarsmekanisme for nedbryting av fremmed DNA, som virus DNA. Cellene beskytter sitt eget DNA, mot denne forsvarmekanismen, ved modifisering, som eksempelvis ved metylering av enkelte baser DNA (Børresen-Dale).



**Figur 9.** Illustrasjon av to typer restriksjonskutt. a) og b) viser restriksjonssetene til restriksjonsenzymene *EcoRI* og *KpnI* som begge kutter med et forskjøvet kutt. c) Viser restriksjonssete til restriksjonsenzymet *EcoRV* som kutter i et rett kutt.

### 2.2.2.4 Gel elektroforese

Separering av makromolekyler ved elektroforese er et sentralt verktøy i biologiske og medisinske undersøkelser (Gerhardt et al., 1994, Darnell et al., 1999). Makromolekylene kan

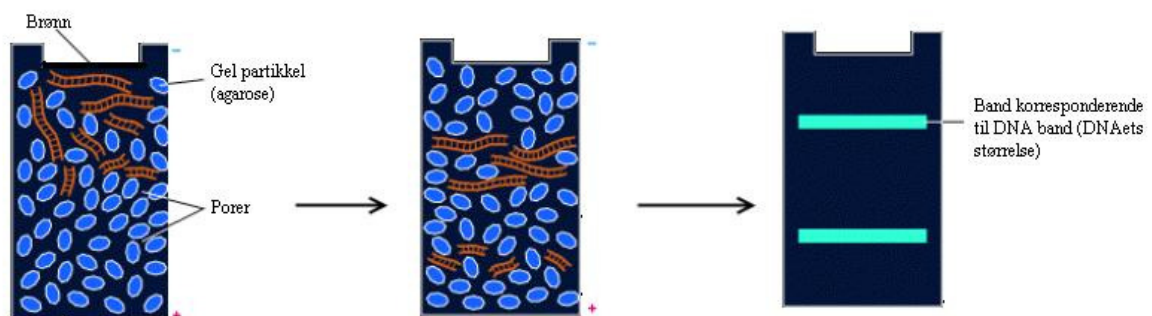


**Figur 10. Utdrag av enkelttrådig DNA. DNA er bygd opp av en fosfatgruppe som binder sukrene sammen. Sukrene har en base bundet til seg.**

dermed skilt etter størrelse (figur 11) (Darnell et al., 1999).

være både protein, DNA- og RNA- molekyler. I dette studiet ble gel elektroforese benyttet for å skille DNA molekyler. For å skille DNA molekyler nyttegjøres det faktum at DNA er negativt ladet ved nøytral pH (Darnell et al., 1999). DNA er bygd opp av deoksyribose (sukker), baser og fosfatgrupper (figur 10). Den negative ladningen kommer fra fosfatgruppene, og gjør at DNAet vil gå fra negativ mot positiv pol dersom den blir utsatt for ett elektrisk felt. DNA blir normalt separert i en gel laget av polyakrylamid eller agarose. Disse danner en matrix som skaper hindringer, og små molekyler passerer hindringene lettere enn større molekyler. Det elektriske feltet trekker DNA molekylene gjennom gel matrix, og DNA molekylene blir

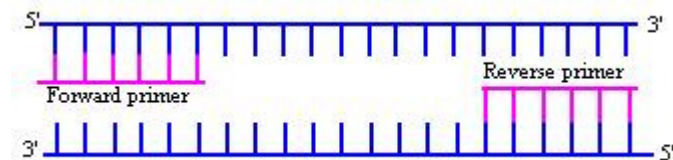
For å synliggjøre DNA molekylene tilsettes etidiumbromid. Etidiumbromid binder mellom baseparene i DNA molekylene og fluoriserer dersom det blir utsatt for ultrafiolett lys. Etersom etidiumbromid kun binder DNA vil dette synliggjøre DNA molekylene i gelen (Sambrook & Russell, 2001).



**Figur 11. DNA fragmenter vandrer med forskjellig hastighet ved gel elektroforese. Lange DNA fragmenter blir hindret i større grad enn mindre DNA fragmenter av matrix. Dette medfører at korte fragmenter vandrer raskere enn lengre fragmenter (Darnell et al., 1999). (Figur tilpasset fra Darnell mfl. 1999(Darnell et al., 1999))**

### 2.2.2.5 Polymerase Chain Reaction (PCR)

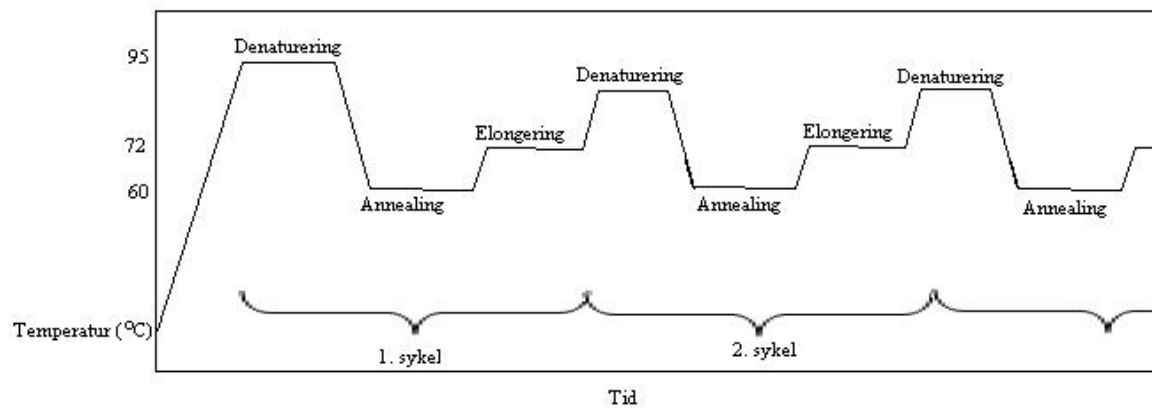
PCR er en metode som brukes for å amplifisere spesifikke regioner av DNA. Metoden krever at en har et templat som inneholder DNA regionen som skal amplifiseres (Gerhardt et al., 1994). I tillegg er det nødvendig med DNA polymerase, primer, deoksynukleotid trifosfat, buffer, og divalente kationer for å gjennomføre PCR (Gerhardt et al., 1994).



**Figur 12. DNA templat med tilbundet "forward" og "reverse" primer. DNA er blått og primerne er rosa i bildet over.**

DNA polymerase er ett enzym som katalyserer polymerisering av deoksynukleotid trifosfat (heretter kalt dNTP). Polymerasen benytter enkelttrådig DNA som templat, og fester dNTP til frie 3'OH ender

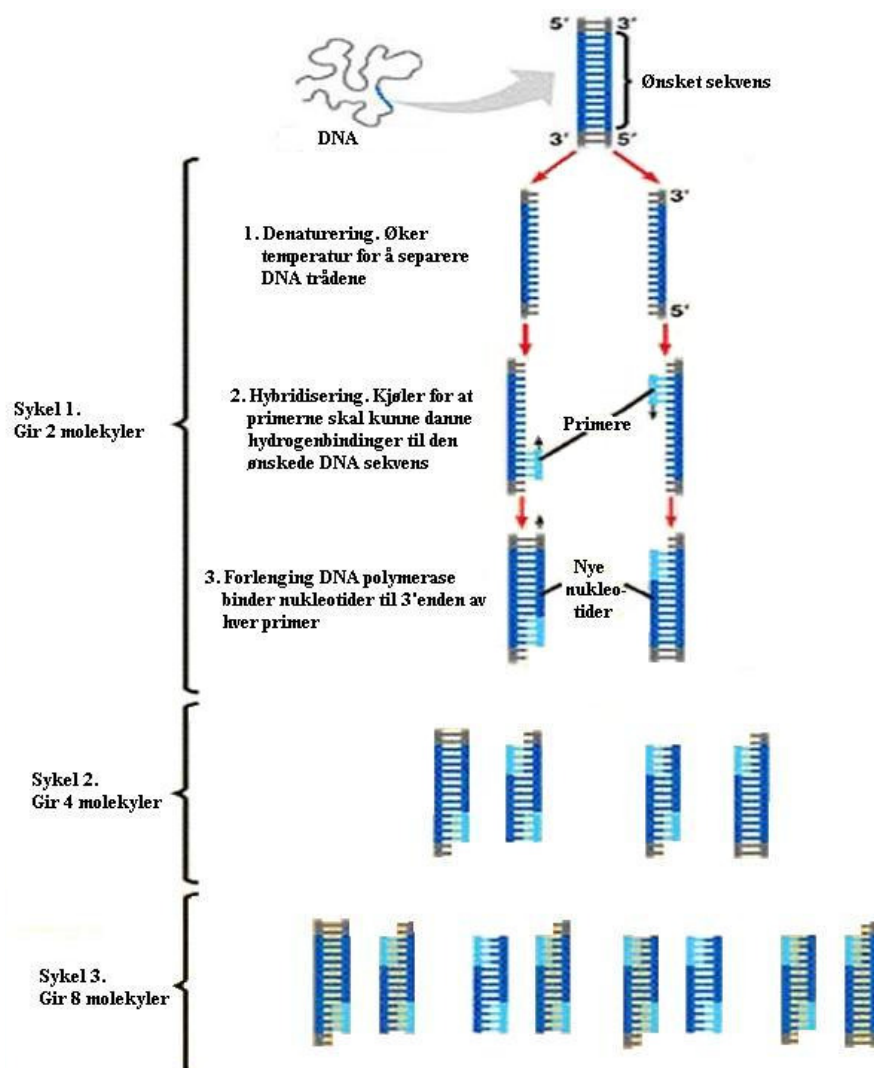
(Gerhardt et al., 1994). Den første frie 3'OH enden tilhører en primer. Primerne er korte dNTP sekvenser som avgrensede område på templatet som ønskes amplifisert. Det er nødvendig med to primere, forward og reverse primer, som er komplementær til 5' og 3' enden på DNA sekvensen som skal amplifiseres (figur 12). Normal lengde på primere er rundt 20 basepar (bp) (Gerhardt et al., 1994). dNTP er byggesteinene i DNA, og er derfor nødvendig under amplifisering. Bufferens funksjon er å holde et stabilt miljø for optimal aktivitet og stabilitet av DNA polymerase. Polymerasen krever frie divalente kationer for å være aktive, og stimulerer polymerase aktivitet. I tillegg øker divalente kationer smeltetemperaturen for dobbeltrådig DNA og templat-primer komplekset (Sambrook & Russell, 2001, Gerhardt et al., 1994).



**Figur 13.** Diagram over syklusene i PCR, og starter med denaturering hvor løsningen varmes opp til ca. 95°C, deretter senkes temperaturen til ca. 60°C for annealing, for så forlenging ved 72°C. Temperaturen er den regulerende faktoren for amplifisering.

PCR starter ved oppvarming av reaksjonen til en temperatur på 94-98°C. Deretter repeteres stegene denaturering, annealing og elongering, 25-35 ganger (figur 13) (Gerhardt et al., 1994). De repeterende stegene starter ved å regulere temperaturen til 94-98°C i 20-30 sekunder for denaturering av dobbeltrådig DNA. Hydrogenbindingene, som holder sammen de to komplementære DNA trådene, blir ustabile og brytes. Dette danner enkelttrådig DNA (figur 14). Ofte er ca. 30 sekunder tilstrekkelig for komplett denaturering (Gerhardt et al., 1994). Temperaturen senkes til 50-65°C i 20-40 sekunder, og dette steget kalles annealing. Her festes primerne til templatet, og DNA polymerasen kan binde til DNA-primer komplekset. Temperaturen justeres til 70-72°C, og elongeringen starter. Ved dette steget syntetiserer DNA polymerasen en ny DNA tråd, ved å polymerisere dNTP i 5' til 3' retning. Varigheten til dette steget er ca. 1 minutt pr 1000 bp som skal amplifiseres (Gerhardt et al., 1994). Etter siste elongering er det normalt og holde temperaturen rundt 70-74°C i 5-15 minutter, for å sikre at alle påbegynte elongeringer er ferdig. Deretter kan PCR produktet lagres ved 4-15°C (Sambrook & Russell, 2001).

Etter hver sykel fordobles antall DNA tråder, og PCR er derfor en svært effektiv metode for amplifisering av DNA.



Figur 14. PCR. Antall kopier av ønsket DNA sekvens fordobles for hver sykel. Hver sykel innholder de tre hovedstegene: Denaturering, hybridisering og forlenging. Se tekst for detaljert forklaring. Tilpasset fra University of Miami (aksessert 2010)

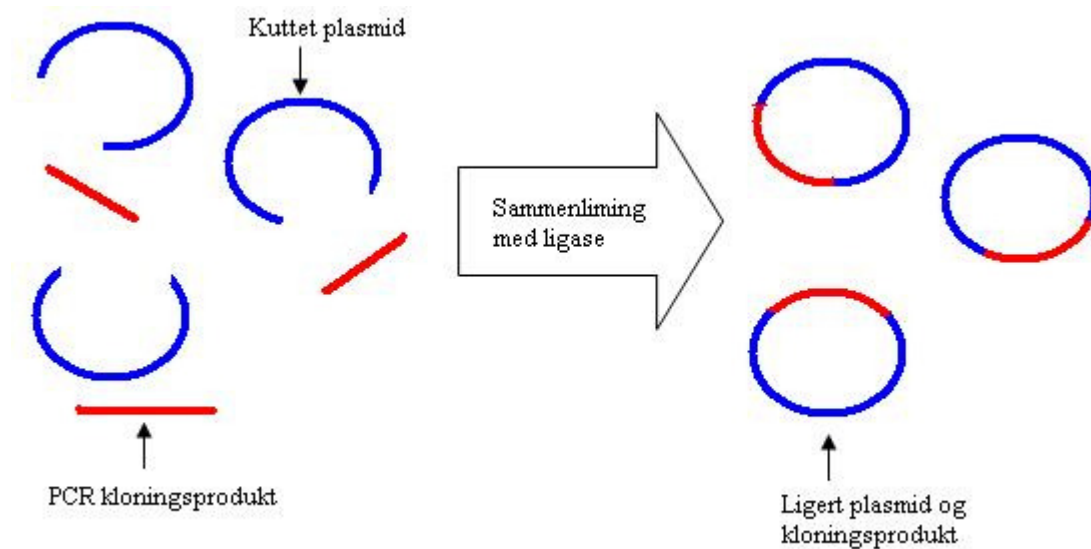
### 2.2.2.6 Defosforlyring av DNA med CIP

Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (heretter kalt CIP) er et enzym som fjerner fosfat gruppen på 5' enden av frie nukleotider i en DNA sekvens (Sambrook & Russell, 2001). Ved ikke-retningsbestemt liggering er plasmidet kuttet med kun et restriksjonsenzym. CIP-behandling er en forbehandling før ikke-retningsbestemt liggering, og skal minke direkte religering av plasmid.

### 2.2.2.7 Liggering av plasmid og PCR kloningsreaksjon

Sammenkobling av et DNA fragment og eksempelvis et plasmid med komplementære ender (kuttet med samme restriksjonsenzym) kan gjøres ved liggering. Liggering utføres av et enzym, ligase, som kobler sammen eksempelvis to dobbeltrådig DNA fragmenter (Sambrook &

Russell, 2001). Dette gjøres ved dannelsen av en fosfodiesterbinding mellom 5' enden til et DNA fragment og 3'enden til et annet (Sambrook & Russell, 2001). Ligering kan også benyttes til å kople sammen to ender fra samme DNA fragment. I dette tilfellet er ligering benyttet for sammenkobling av plasmid og et PCR kloningsprodukt (figur 15).



Figur 15. Ligering mellom DNA fragment, kopiert opp ved PCR, og kuttet plasmid. Endene til plasmidet og fragmentet må ha komplementære ender for ligering.

### 2.2.2.8 Transformering

Transformering er opptak av nakent DNA fra omgivelsene som gir en genetisk forandring i cellen når dette blir uttrykt (Gerhardt et al., 1994). Ikke alle cellene kan ta opp DNA fra omgivelsene, ettersom cellene må være kompetente for å utføre dette. Evnen til å ta opp DNA fra omgivelsene er cellens kompetenthet. Det finnes flere metoder for gjøre cellene kompetente og et tilsvarende antall metoder for transformering (Gerhardt et al., 1994).

### 2.2.2.9 Transformering av kompetente celler

Noen bakteriestammer kan gjøres kunstig kompetente enten ved kjemikalier eller ved elektroporering. Elektroporering er en relativt ny teknikk, hvor cellene gjøres kompetente ved en glyserolbehandling (Gerhardt et al., 1994). Ved denne metoden blir bakteriene utsatt for ett høy-styrke elektrisk felt som overgår ladningskapasiteten til cellemembranen (Gehl, 2003). Dette gjør at membranen delvis brytes ned og porer dannes. Poredannelsen er reversibel. Gjennom disse porene kan DNA fra omgivelsene diffundere inn i cellen (Gehl, 2003).

Kjemokompetente celler benytter "heat shock" for transformasjon. Cellene gjøres kompetent med  $\text{CaCl}_2$ -behandling (Gerhardt et al., 1994). Ved oppvarming (heat shock) til  $42^\circ\text{C}$  i ca. 2

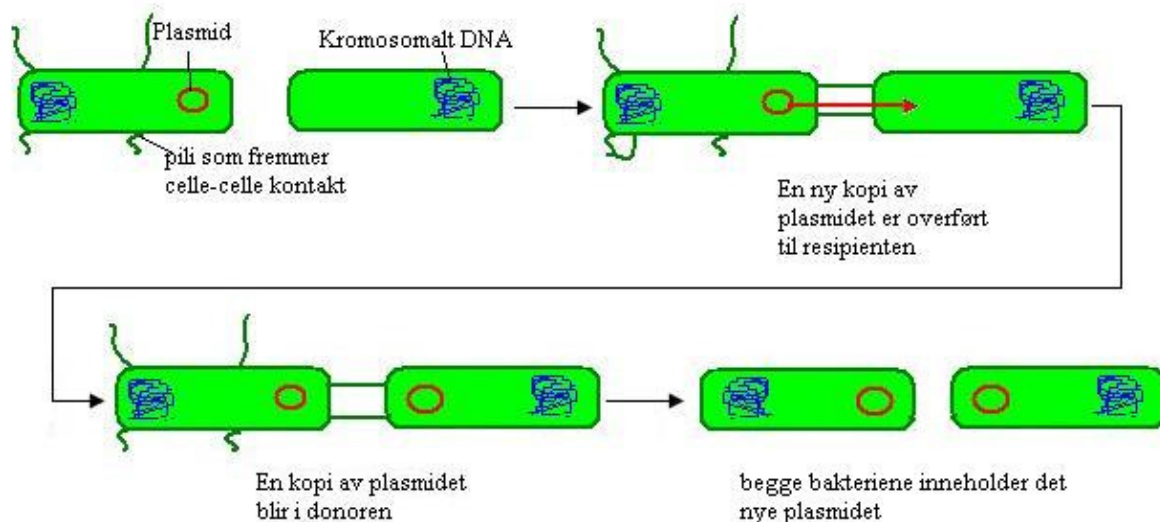


minutter vil membranen delvis brytes ned, og porer dannes. Oppvarmingen senker i tillegg membranpotensialet. Poredannelsen er reversibel, og sammen med nedsatt membranpotensial bidrar dette til at DNA lettere kan diffundere inn i cellen (Panja et al., 2008).

### 2.2.2.10 Transformasjon ved konjugering

Transformasjon ved konjugering er et fenomen hvor plasmider kan overføres alene eller sammen med genomisk DNA fra en celle til en annen (Snyder & Champness, 2007). Under konjugering kobles to ulike bakterier sammen, og utveksling av DNA inntreffer. En bakterie (donor) donerer DNA, enten i plasmidform eller kromosomalform, til en mottaker bakterie (resipient), se figur 16. Når resipienten har mottatt DNA kalles den transkonjugant.

Konjugasjon krever flere gener og faktorer for å kunne finne sted (Snyder & Champness, 2007). Denne metoden avhenger av at donorstammen inneholder det ønskede DNAet for transformasjon.



**Figur 16. Prinsippet bak konjugering.** Cellene finner hverandre ved hjelp av piler, og det opprettes en bro mellom cellenes cytoplasma som gjør at DNA kan fraktes fra donor til resipient. Etter konjugasjon har både donor og tidligere resipient plasmid (Snyder & Champness, 2007).

I dette prosjektet var *S. meliloti* Sm1021 resipient, og donor var *E. coli* stamme S17-1/λpir. S17-1/λpir inneholder nødvendige gener for overføring av plasmider ved konjugasjon. Donor og resipient ble dyrket sammen for å gjøre transformasjon ved konjugasjon mulig.

### 2.2.2.11 Overkyssing og seleksjon

Dersom det transformerte plasmidet ikke inneholder et kjent startesete for kopiering hos resipienten, er det en nødvendighet at plasmidet inkorporeres i genomet. Dette er vesentlig

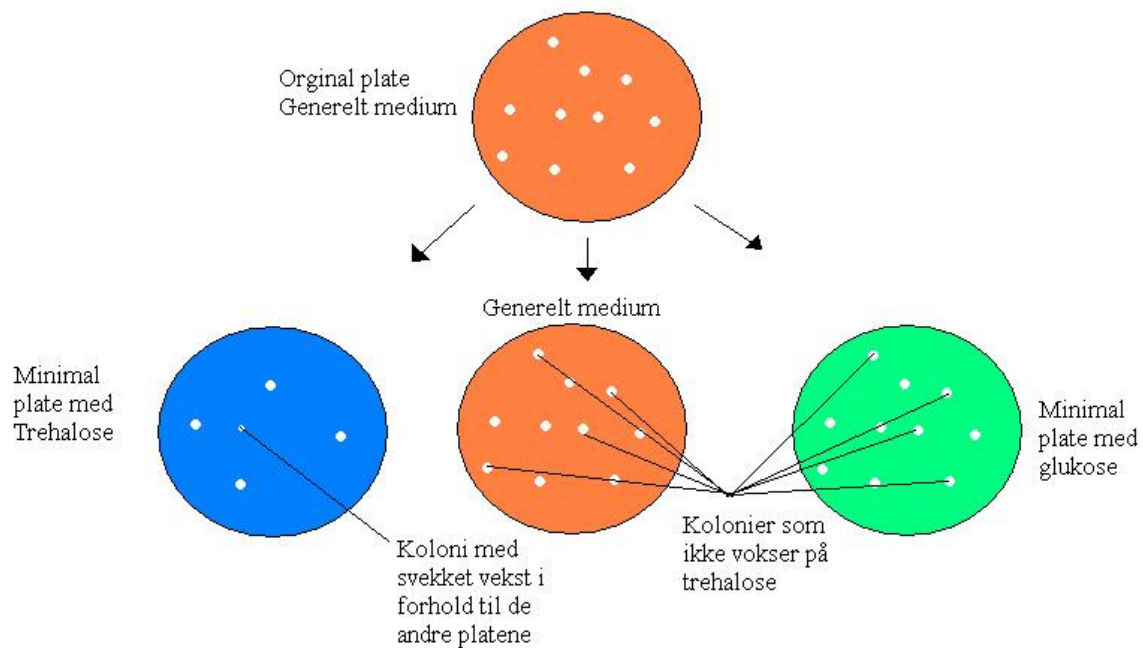
ettersom plasmider med ukjent startsete for kopiering vil forsvinne ved celledeling. Dette kan løses ved overkryssing mellom plasmid og kromosomalt DNA. Overkryssing oppstår når deler av DNA (eksempelvis genom og/eller plasmid) er homolog, og resulterer i plasskifte mellom disse (Snyder & Champness, 2007).

Seleksjon for transkonjuganter krever at donor DNA og resipient har egenskaper som lar seg selektere. Disse egenskapene må være ulik hos i donor DNA og resipient, og kan eksempelvis være resistens mot forskjellige typer antibiotika. Transkonjuganter vil da inneholde begge egenskapene, og seleksjon av transkonjuganter gjøres på seleksjonsmedium som fremmer disse. I denne oppgaven inneholdt donor DNA  $Km^R$ -genet, og resipienten var resistent mot streptomycin. Transkonjugantene, *S. meliloti* Sm7018, var dermed resistent mot både kanamycin og streptomycin, og ble selektert ut fra disse. Dette seleksjonsmediet selekterte bort donorer ved streptomycin og resipienter ved kanamycin (Gerhardt et al., 1994).

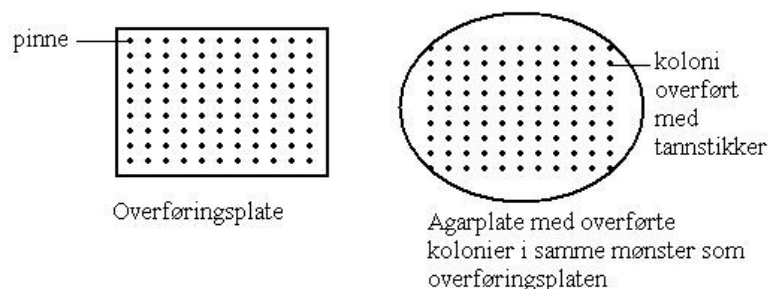
#### **2.2.2.12 Replika plating**

Replika plating er en metode som gjør det mulig å flytte ett større antall kolonier fra en agarplate til en annen. Dette gjøres i en enkel operasjon ved bruk av ru overflate, som velur, som trykkes ned på hovedplaten, fanger opp koloniene og overføres til en ny plate (Gerhardt et al., 1994). Et identisk mønster av kolonier reproduseres på replika platen. Normalt benyttes replika plating til å overføre kolonier fra en plate til flere ny plater (Gerhardt et al., 1994). De nye platene inkluderer normalt en plate bestående av generelt vekstmedium, og flere seleksjonsplater (Gerhardt et al., 1994). Seleksjonsplatene kan eksempelvis inneholde antibiotika og kun en spesiell karbonkilde. Ved bruk av seleksjonsplater kan egenskapene til koloniene raskt undersøkes og sammenlignes i forhold til hverandre (Gerhardt et al., 1994). Kolonier som viser avvik fra vildtypen kan isoleres for videre undersøkelser (figur 17) (Gerhardt et al., 1994).

En annen mulighet ved replika plating er å benytte en metallplate med utstående pinner til å flytte koloniene med. Ved denne metoden må koloniene, som ønskes undersøkt, først overføres til en plate med generelt medium i et mønster tilsvarende pinnene på overføringsplaten (se figur 18). Deretter inkuberes disse platene, før videre overføring til nye seleksjonsplater.



**Figur 17.** Ved replika plating kan en kopiere kolonier fra en hovedplate over til seleksjonsplater. Her vil en kunne sammenligne vekst, og isolere transkonjuganter som viser unormaliteter i forhold til vildtypen. Her illustrerer replika plating med tøy.

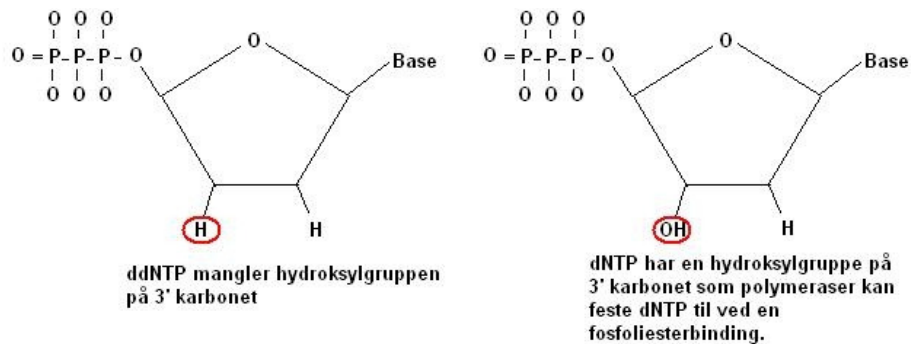


**Figur 18.** Overføringsplaten for replika plating til venstre. Koloniene som overføres plasseres i mønster samsvarende overføringsplaten. Når disse koloniene har vokst opp overføres de til seleksjonsplater. Sammenligning mellom kolonier på seleksjonsplater kan avdekke forskjeller mellom vildtypen og mutanter. Dette illustrer replika plating med metall plate med utstående pinner.

### 2.2.2.13 DNA sekvensering

For å avdekke basesekvensen i DNA kan en benytte en metode kalt dideokseysekvensering (Kristensen, aksessert 2010). Her anvendes DNA polymerase som kopierer opp den delen av DNA templatet som ønskes sekvensert. DNA polymerasen er avhengig av frie 3' OH' ender for å starte sekvenseringen, og disse kommer fra en primer. Primere er korte dNTP sekvenser som avgrensner området på templatet som ønskes sekvensert. Ved forlenging benyttes dNTP og dideoksynukleotider (ddNTP) som byggesteiner. Her skiller ddNTP seg fra dNTP ved at hydroksylgruppen på 3' karbonet er byttet ut med et hydrogen (figur 19). Denne analogen vil i konkurranse med dNTP inkorporeres i den voksende DNA-tråden (Kristensen, aksessert

2010). Ved innsetting av ddNTP vil videre forlenging stoppes, fordi polymerasen ikke kan danne en fosfodiesterbinding mellom ddNTP og en ny dNTP eller ddNTP (dette krever en hydroksyl gruppe på 3' karbonet) (Griffiths et al., 2002). Hver gang ddNTP blir inkorporert i den voksende DNA tråden vil videre forlenging stoppes, og dette resulterer i at en får dannet en rekke DNA-fragmenter i ulike lengder (Griffiths et al., 2002). Hvert fragment vil ha samme startpunkt (primersete), og vil ha en ddNTP ved 3'OH enden. De fire ddNTP molekylene (avhengig av basene) er merket med ulike fluoriserende molekyler (Kristensen, aksessert 2010, Sambrook & Russell, 2001).



**Figur 19. Sammenligning mellom ddNTP og dNTP. ddNTP mangler hydroksylgruppen på 3' karbonet, som medfører at forlengingsprosessen stopper da polymerasen ikke kan danne en fosfodiesterbinding til hydroksylgruppen på ddNTP.**

Sekvenseringsreaksjonen kjøres i en termosykel med tilpasset program, og produktet kjøres på en gel som skiller DNA fragmentene etter størrelse. De fluoriserende molekylerne eksiteres, og sender ut lys ved en bestemt bølgelengde tilsvarende dens base. Bølgelengdene registreres som fargede topper i et kromatogram, og nukleotidsekvensen organiseres på grunnlag av hvert enkelt fragments lengde (Griffiths et al., 2002, Sambrook & Russell, 2001).

### 3. Resultater

I dette kapitlet presenteres først resultatene fra det didaktiske arbeidet med hensyn på undersøkelser og intervjuer, deretter presenteres resultatene fra arbeidet med *S. meliloti*.

#### 3.1 Resultater fra det didaktiske arbeidet

##### 3.1.1 Lærerundersøkelse og samtale

###### *Lærerens bakgrunn faglig og didaktisk*

Kontakt med læreren ble tidlig opprettet for å avtale hvilke læreplanmål som skulle dekkes ved universitetsbesøket. Lærerens faglige bakgrunn var mastergrad i zoologi, og hun valgte å bli lærer ettersom hun ønsket å arbeide med mennesker, samt anså hun forskning som en usikker framtid. Som lærer i biologi mente hun at hovedområdene bioteknologi og genetikk var utfordrende, og dette hadde en sammenheng med liten eller ingen bakgrunnskunnskaper i emnene. Hun mente at faget generelt bestod av mye detaljer og uttalte seg i undersøkelsen: ”Generelt er biologi 2 detaljert og derfor litt vanskelig å undervise på en morsom måte. Bioteknologi og genetikk er også utfordrende fordi kunnskapen er for liten”. Læreren mente at elevenes motivasjon ble påvirket av faktorer som kjente emner og grad av praktisk deltakelse, og en god variasjon i undervisningsmetodene ville bedre læringsutbyttet deres. Læreren foretrakk oppgaveløsning, individuelt eller i par, hvor hun kunne snakke og forklare til den enkelte elev.

###### *Forventninger til elevbesøk*

I forkant av elevbesøket viste læreren stor takknemmelighet at hennes klasse fikk denne muligheten. Hun håpet universitetsbesøket ble nyttig og lærerikt, og ønsket at hun kunne se og lære av forsøkene som ble gjennomført, både biologisk og didaktisk. Læreren ønsket også at elevene skulle få mulighet å stille faglige utfordrende spørsmål, for å øke den faglige forståelsen.

###### *Kommentarer til elevbesøk*

I etterkant av universitetsbesøket kommenterte læreren at dagen var godt planlagt. Atmosfæren ved laboratoriearbeidet var rolig, og hun mente dette gjorde at samtlige elever fikk med seg hva som skulle gjøres og hvorfor. Hun så en fordel i at utstyret som skulle

benyttes var lagt fram, og samkjøring mellom praktisk arbeid og teori gav elevene bedre forståelse for øvelsen.

#### *Bidrag fra universitet*

Universitetet har faglig oppdatert kompetanse og utstyr, dette er faktorer som med fordel kan benyttes i undervisning til å skape motivasjon og bedre læring. Læreren mente videre at disse faktorene bidrar med større muligheter for variasjon i undervisningen.

#### *Skolens utstyr*

Fra en samtale med lærer kom det fram at skolen har noe utstyr selv, men at dette blir utnyttet dårlig. Lærerne føler de har lite kompetanse om muligheter og bruk av utstyr, og rullering av fagene gjør at de aldri får utbedret forsøkene sine. Dette gjør læreren usikker og nølende til å ta i bruk utstyret, da temaet er vanskelig og bakgrunnspraksis er liten.

#### *Laboratoriearbeid*

I etterkant av elevbesøket ble det sendt ut en mail til læreren, hvor følgende spørsmål ble stilt: ”Kan du beskrive litt om ditt forhold til laboratoriearbeide i undervisningen? Har du noen positive og negative erfaringer med laboratoriearbeid? Hva tror du elevenes synes?”

Positive erfaringer med laboratorieundervisning var at elevene var i høyere grad aktiv og undervisningsformen var mer givende enn ordinær undervisning. Elevene får visualisere teorien gjennom praktiske forsøk, i motsetning til å lese tørr teori fra læreboken. Læreren mente at et slikt avbrekk i undervisningen ville bidra til økt læringsutbytte i biologi. Positive erfaringer for lærer var at hun fikk mulighet til å snakke med elevene, og forklare faget til små grupper.

Læreren hadde negative erfaringer med laboratoriearbeid ettersom at denne undervisningsmetoden raskt kunne fortone seg som litt kaotisk for elevene, og spesielt dersom forsøket ikke ble nøye gjennomgått på forhånd. Slike situasjoner gjør elevene stresset, og oppstår eksempelvis dersom utstyr ikke fungerer og nytt utstyr måtte finnes fram. I slike situasjoner føler ofte lærer seg som en laboratorieassistent. Læreren hadde flere ganger opplevd at laboratorieøvelser gav mindre markant resultat enn det som var forventet, noe som medførte at læreren teoretisk måtte forklare hva som skulle skjedd. Elevene oppfatter også

rapportskriving som negativt, noe som kan komme av minimalt læringsutbytte grunnet de overnevnte stressfaktorene. Læreren selv mente laboratoriearbeid var krevende grunnet mye for og etterarbeid.

### 3.1.2 Elevundersøkelse

Her vil resultatene fra den skriftlige elevundersøkelsen presenteres i tabellform og ved sitater. De fleste tabellene har utgangspunkt i åpne spørsmål som i senere tid er kategorisert, og viser forekomst av hver kategori i klassen. Her kan også noen elevers svar være inkludert flere kategorier, og prosenten for hver kategori er regnet ut fra totalt antall elever.

Det første spørsmålet dreide seg om hvorfor den enkelte elev valgte biologi som studiespesialisering, og var et åpent spørsmål. Tabell 13 viser prosentvis fordeling av bakgrunnskriterier for valg av biologi som studiespesialisering.

**Tabell 13. Spørsmål: "Hvorfor valgte du biologi som en av studiespesialiseringene?" (åpent spørsmål kategorisert i ettertid)**

	<b>Gutt (i %)</b>	<b>Jente (i %)</b>	<b>Totalt (i %)</b>
<b>Interesse</b>	100	85	88
<b>For å slippe annet fag</b>	33	15	19
<b>Opptatt av naturlige fenomener</b>	33	15	19
<b>Nytte</b>	0	15	13
<b>Spennende</b>	33	8	13
<b>Enkelt fag</b>	0	15	13
<b>Læren om mennesket på alle nivå</b>	0	8	6
<b>Teste teorier i praksis</b>	0	8	6
<b>Muligheter</b>	0	8	6

De fleste elevene valgte biologi av interesse og noen elever begrunnet valget med følgende: "For det hørtes interessant ut ..." og "Jeg liker alt som har med organismer å gjøre". Noen elever beskriver mer spesifikt hva de synes er interessant " ... og syntes det hørtes spennende ut å jobbe med dyr/planter" og "Jeg er opptatt av hvordan kroppen og naturen fungerer... ". Mange elever fokuserte på større organismer, mens andre ønsket å oppnå forståelse av de fenomener en ikke kan se. Noen av disse elevene uttalte seg "Bioteknologi er spennende...", "Jeg valgte biologi ... fordi jeg er interessert i biokjemi og sykdommer/vaksiner..." og "Jeg

*synes det er spennende å lære ... hvordan de [organismene] fungerer på cellenivå.*”. Andre begrunnet valget av biologi med at det var ett lettere realfag: ” ... og heller ikke like tungt som for eksempel kjemi.”.

Tabell 14 viser elevenes valg av høyere utdanning som en prosentvis oversikt. Det kommer tydelig fram at en stor andel av klassen ønsker å studere biologi eller biologirelaterte studier. Majoriteten av klassen ønsker å studere realfagsrelaterte studier.

**Tabell 14. Spørsmål: ”Hva ønsker du å studere videre når du er ferdig på videregående og hvorfor?” (åpent spørsmål kategorisert i ettertid)**

	<b>Gutt (i %)</b>	<b>Jente (i %)</b>	<b>Totalt (i %)</b>
<b>Biologi</b>	33	31	31
<b>Biologi relaterte studier</b>	0	15	13
<b>Medisin</b>	33	8	13
<b>Vet ikke</b>	0	15	13
<b>Fysikk og matematikk</b>	0	8	6
<b>Kjemi</b>	0	8	6
<b>Geofag</b>	33	0	6
<b>Lærerutdanning</b>	0	8	6
<b>Elektroingeniør</b>	0	8	6
<b>Litteraturvitenskap</b>	0	8	6
<b>Helserettet</b>	0	8	6
<b>Økonomi og administrasjon</b>	0	8	6
<b>psykologi</b>	0	8	6
<b>Tannlege</b>	33	0	6

Noen emner innenfor et fag blir ofte oppfattet som vanskeligere enn andre. Tabell 15 viser oversikt over hvilke emner som elevene i denne klassen mente var vanskelige. Elevene har gitt de ulike emnene poeng 1-3, hvor 3 tilsvarte vanskeligste tema. De emnene med flest poeng totalt regnes som vanskeligst. Her kommer det klart fram at molekylærbiologi er vanskeligst, med bioteknologi øverst, tett etterfulgt av cellebiologi og energiomsetning.



**Tabell 15. Spørsmål "Hvilke temaer syns du er vanskelig i biologi?" (Avkryssings spørsmål hvor elevene gav poeng fra 1-3, hvorav høyest poengsum tilsvarte vanskeligste fag)**

	Gutt (poeng)	Jente (poeng)	Totalt (poeng)
<b>Bioteknologi</b>	5	21	26
<b>Cellebiologi</b>	5	14	19
<b>Energiomsetting</b>	3	14	17
<b>Biologisk mangfold</b>	0	7	7
<b>Genetikk</b>	1	5	6
<b>Funksjon og tilpassing av organismer</b>	3	3	6
<b>Økologi</b>	0	5	5
<b>Evolusjon</b>	1	3	4
<b>Fysiologien til menneske</b>	0	2	2

Elevene måtte så begrunne hvorfor temaene de hadde kategorisert var vanskelig. Noen av elevene skrev som følger: *"Det er vanskelig dersom det er mye som skjer, mange detaljer å huske, dvs. enzymer, reaksjoner osv."*, *"Det er veldig detaljert og jeg synes det er vanskeligere å jobbe med noe som er så lite at man ikke kan se det"*. og *"Det er mye fakta å holde styr på. Det er også mange nye ord og beskrivelser man må lære seg"*. Andre grunner for at temaer er vanskelig er også dårlig presentasjon av lærestoffet fra læreboken og en elev forklarer dette med: *"Stoffet som læreboken presenterer er ofte uoversiktlig og vanskelig å forstå..."*.

Motivasjon i et fag kan være så mangt, og kan ofte knyttes til personlig trang som belønnes med et ytre eller indre stimuli. I et spørsmål ble det spurt om hva som gjorde eleven motivert i ett fag. Fra tabell 16 kan en se prosentvis fordeling hva elevene mener motiverer de i et fag, og her viser det at lærerens engasjement og kunnskap spiller mye inn. I tillegg kreves også interessante temaer og gode tilbakemeldinger i form av karakterer.

Tabell 16. Spørsmål "Hva gjør deg motivert i ett fag?" (åpent spørsmål kategorisert i ettertid)

	Gutt (i %)	Jente (i %)	Totalt (i %)
Engasjert og flink lærer	67	38	44
Interessante temaer	67	38	44
Gode karakterer	33	46	44
Nyttig	0	23	19
Valgfrihet i læringsmetode	0	15	13
Bra tilrettelegging av læring	0	15	13
Skryt ros fra lærer	0	15	13
Forståelse	0	8	6
Snart ferdig med skolen	0	8	6

Tabell 17 viser en prosentvis oversikt hvilke undervisningsformer elevene mener de lærer mest av. Spørsmålet var et avkryssings spørsmål hvor elevene kunne krysse av ved flere alternativer. Her kan en se at de fleste elevene mener de lærer mest av å ha forelesning, men på samme tid mener over halve klassen at de lærer mest av selvstudie. Få elever mener de lærer mye av laboratoriearbeide.

Tabell 17. Spørsmål "Hvilken undervisningsform lærer du mest av?" (avkryssings spørsmål)

	Gutt (i %)	Jente (i %)	Totalt (i %)
Læreren foreleser	33	69	63
Selvstudie	33	62	56
Oppgaver	33	54	50
Lab	33	31	31
Gruppearbeid/prosjektarbeid	67	0	13
Andre	0	0	0

Tabell 18 viser en prosentvis inndeling hvilke forventninger elevene hadde til universitetsbesøket. De fleste elevene mente elevbesøket ville gi en ny opplevelse som ville vekke interesse. Noen elever beskrev forventningene sine slik: "At det vil være en ny og interessant opplevelse", "Synes det er spennende og håper det blir artig og lærerikt", "Forventer å lære om PCR og gel elektroforese. Gjøre et annet forsøk enn vanlig.", "At vi skal gjøre et forsøk som er litt komplisert kanskje, ved hjelp av utstyr vi ikke har i

videregående skole.” og ”Lære å bruke mer avansert utstyr enn hva skolen og læreren har kompetanse til å undervise oss med”. Generelt kan en si at forventningene var å få litt mer utfordringer og dypere innsikt i tema. I tillegg fikk elevene ekstra motivasjon og interesse av å komme seg ut av klasserommet og gjøre noe utenom det vanlige.

**Tabell 18. Spørsmål ”Hvilke forventninger har du til besøket ved universitetet?” (åpent spørsmål)**

	<b>Gutt (i %)</b>	<b>Jente (i %)</b>	<b>Totalt (i %)</b>
<b>Gjøre noe annet, mer komplisert og med tilgang på mer faglig kompetanse</b>	33	23	25
<b>Interessant og ny opplevelse</b>	0	23	19
<b>Spennende og læringsrikt</b>	33	8	13
<b>Ikke svart</b>	33	8	13
<b>Ingen</b>	0	15	12
<b>Repetisjon</b>	0	8	6
<b>Gi mer interesse</b>	0	8	6
<b>Lære noe nytt</b>	0	8	6
<b>Gi bedre forståelse</b>	0	8	6

### 3.1.3 Intervju av elever

#### *Vanskelige temaer*

Årsaken til at noen emner oppfattes som vanskelig var grunnet mye detaljer og unødvendig tilleggsinformasjon i læreboken. Et emne som flere elever nevnte som vanskelig var fotosyntesen. Dette grunnet at boka gikk veldig dypt inn i dette, samt var det mye detaljer. Ved emner som var oppfattet som vanskelig av klassen mente elevene at læreren var flink å sette av ekstra tid, og læreren la også opp undervisningen for å lette vanskeligere temaer. En elev uttalte seg som følger: ”Ho e veldig opptatt av å variere undervisningen ... i et fag som biologi e d viktig å fokusere på det visuelle som figura og animasjoner... Ho stille spørsmål som e overkommelig [til elevene ved tavlegjennomgang]”. En annen elev beskrev lærerens tilrettelegging av vanskelige temaer slik: ”Når det kommer til tavleundervisning e det de kompliserte tingane vi bruke tida på. Vi bruke også en del figura og animasjoner.” Det kommer tydelig fram at elevene mener visualiseringer letter forståelsen av vanskelige emner.

Elevene ble spurt om de hadde forslag til metoder som kunne lette undervisningen. Spørsmålet hadde en variert tilbakemelding. En elev svarte at hun var uengasjert i biologi 2, ettersom det var mye detaljer. En annen elev var svært engasjert, og mente at læreren kunne introdusere et emne ved å vise en kortfilm, dette ville gjøre at elevene ble kjent med emnet. Praktiske aktiviteter og selvstendig arbeid ble også nevnt som aktiviteter som kunne lette undervisningen i vanskelige emner.

#### *Studievaner*

Elevene var rimelig samstemte ved valg av studievaner, og foretrekk foredrag som en introduksjon. Dette ble etterfulgt av litt varierte aktiviteter som å lese selvstendig, arbeide med oppgaver og diskutere med andre. Alle elevene leste ekstra mye før prøver.

#### *Læringsutbytte*

Elevene fra intervjuet mente de lærte mest av små forelesninger etterfulgt av et annet arbeid. En elev beskrev dette slik: *"Først et lite foredrag, så jobbe aleina eller i mindre gruppe... å da viss man e usikker på nokka så kan man spørre andre eleva... å finne ut, kanskje spørre læreren"*. De andre elevene foretrakk individuelt arbeid med oppgaver, og en elev begrunnet dette med: *"Æ like å gjøre oppgaver, for da presse æ mæ sjøl tell å jobbe"*. Oppgaveløsning ble også nevnt som positivt da elevene fikk arbeide i eget tempo, samt fikk elevene vært innom alle vesentlige ting i tema. Dette i motsetning til gruppearbeid hvor ofte arbeidsoppgavene blir fordelt, og elevene jobber bare med en mindre del av tema.

I forhold til læringsutbytte ved laboratoriearbeid var ingen av elevene overoptimistiske. De fleste kategoriserte laboratoriearbeid som *"helt greit"*. Elevene mente denne undervisningsformen krevde en god introduksjon og mye arbeid med stoffet før de forsto hensikten. Noen nevnte at praktisk arbeid var bra for læringsutbyttet, men ikke alle. En elev forklarte sin opplevelse av laboratoriearbeide slik: *"Æ e ikke særlig praktisk av mæ. Æ vet aldri ka æ skal gjøre. Æ blir bare stressa. Så æ lære mer av teorien. Men det e jo fint for variasjon sin del. Så blir man jo tvungen tell å skrive rapport, men det e ikke bestandi æ forstår ka æ har gjort"*. Denne eleven mente det skjedde for mye på en og samme tid ved laboratoriearbeid, og utstyr måtte hentes, metoder forstås og gjennomføringen måtte gjøres riktig. Laboratoriearbeide ble også nevnt å være en god oppsummering av emner, men denne undervisningsmetoden tar litt unødvendig mye tid.

”Æ ønske å gjøre det bra for å vise respekt for læreren som e så flink og god, det vise at æ følge med, å at ho e en god lærer” forklarte en elev i forhold til hvordan læreren påvirket hans læringsutbytte. Noen andre mente at læreren påvirker læringsutbytte ved å gi gode tilbakemeldinger. En elev forklarte det slik ”dem [lærerne] bør jo være positiv og engasjert og gi gode tilbakemeldinger selv om dem [elevene] ikke e så flink... å fokusere på det gode”. Lærerens engasjement og humør kan være med å påvirke læringen, og en elev beskrev deres lærer slik: ”[Læreren] e jo så positiv, man blir jo smitta av det.”.

Ved den tidligere gjennomførte undersøkelsen var det flere elever som fokuserte på lærerens formidlingsevne. Det var derfor ønskelig å vite hva elevene mente lå bak dette. Det kunne virke til at elevene delte samme forståelse om ordet formidlingsevne, og det gikk ut på at læreren måtte forstå andres problemer og kunne formidle det faglige på en forståelig måte. En elev beskrev ordet formidlingsevne som ”måten å lære bort til andre ... ho[læreren] må klare å forklare på en sånn måte at vi[elevene] forstår”. Lærerens forståelse for elevenes problemer sammen med elevintrasjoner i klassen er viktige faktorer for læringsmiljøet. Læringsmiljøet, i denne klassen, mente elevene var bra, men at klassen var delt i to ettersom de kom fra to forskjellige klasser. Noen av elevene forklarte læringsmiljøet slik: ”... men når man har en sånn vennskapelig tone e det lettere å jobbe, og lære noe.” og ”Det e ingen som flire om når svare nåkka feil”.

#### *Universitetsbesøk*

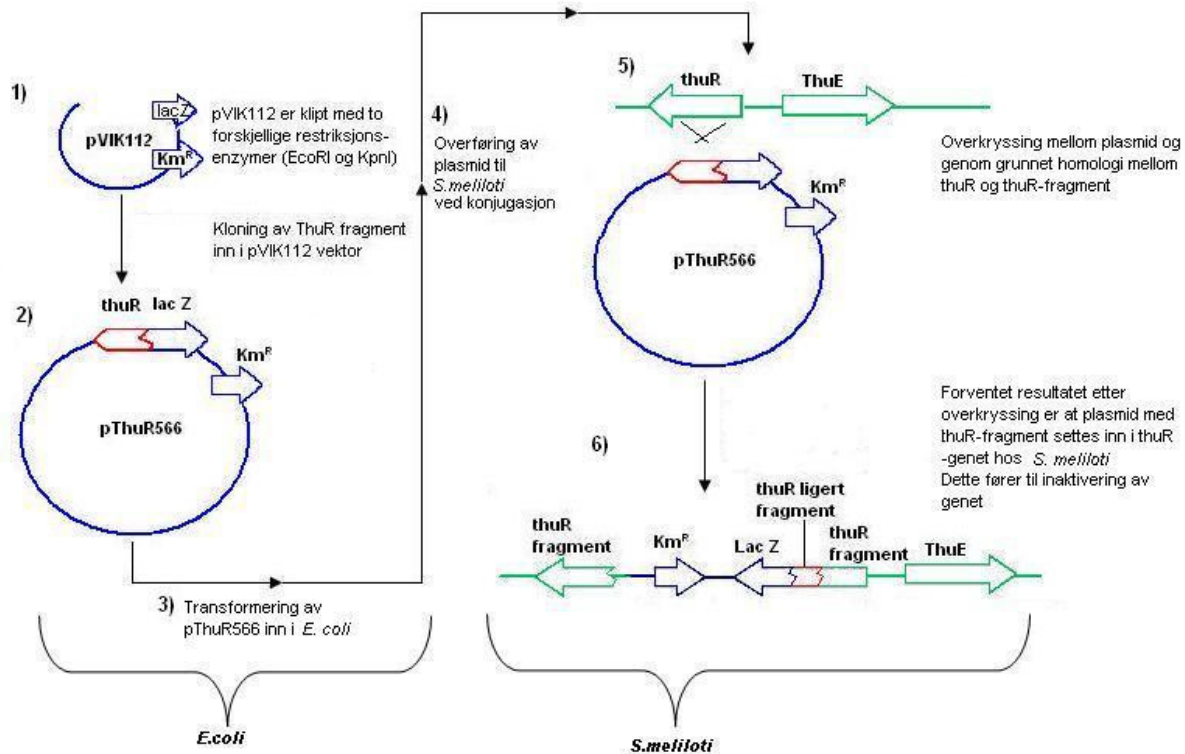
Elevene mente de fikk bedre innblikk og økt forståelse for prinsippet bak genetisk fingeravtrykk. ”Det var jo en fin avveksling fra å være på skolen... det var veldig interessant og æ forstå bedre genetisk fingeravtrykk.”, uttalte en elev seg. Alle elevene mente vanskelighetsgraden var bra, og de fikk god oppfølging. Positive ting ved universitetsbesøket var at det var lærerikt, effektivt og med god vanskelighetsgrad. I tillegg fikk de et inntrykk av universitetshverdagen og et sosialt avbrekk fra vanlig skole. Negative ting ved universitetsbesøket var at de ikke fikk lage gelen selv, det var mindre å gjøre enn forventet, og ble det en del venting.

Alle elevene var enige i at universitetet kan bidra med sterkere faglig kunnskap og bedre utstyr. En elev mente det en motivasjon i seg selv å dra på universitetsbesøk, ettersom en fikk

variasjon i hverdagen. En annen elev mente det var positivt å få inntrykk i hva som skjer på universitetet. ”*Universitetet kan gjerne komme på besøk på skolen også bare en time*”, uttalte han seg, og presiserte at det gav god variasjon og en god inspirasjonskilde med nærmere samarbeid med universitetet. Helt til slutt ble elevene spurt om universitetsbesøk var en motivasjon i seg selv, og her var svarene entydig ja. ”*Man drar til en plass kor det e høyere utdanning, og mange skal gjerne dit seinere, man får se hvordan det e der og følt på stemninga... man øke jo sin egen kunnskap når man drar tell en plass kor kompetansen e bedre...*” forklarte en elev. Andre mente det var spennende, og mente at elever som ofte var borte fra skolen kom ved slike utflukter.

### 3.2 Resultater fra laboratoriet

Tidligere studier (Jensen et al., 2005, Jensen et al., 2002) har undersøkt trehalosetransport- og katabolisme i *S. meliloti* og funnet fram til 7 gener som koder for proteiner involvert i dette. I dette arbeid ble det formodete regulatorgenet, *thuR*, forsøkt slått ut. For å nå dette mål ble en rekke bioteknologiske metoder benyttet gjennom flere steg. Plasmidet pVIK112, som inneholder blant annet kanamycinresistens gen ( $Km^R$ ) og *lacZ* gen, ble kuttet med to restriksjonsenzymmer. Deretter ble det dannet et *thuR* fragment, som ble kuttet med de samme restriksjonsenzymene. *thuR* fragmentet ble så klonet inn i vektoren ved ligering, og dannet plasmidet pThuR566. Dette plasmidet ble transformert inn i *E.coli* stamme S17-1/ $\lambda$ pir, og videre konjugert inn i *S. meliloti* Sm1021. Ettersom pThuR566 mangler et gjenkjennbart startsete for replikering i *S. meliloti* var det en nødvendighet at plasmidet ble inkorporert i genomet. Dette skjedde ved overkryssing grunnet homologi fra *thuR* fragment i plasmidet og *S. melilotis thuR*-gen. Overkryssingen resulterte i en *S. meliloti* stamme med inaktivt *thuR* gen, og ble kalt Sm7018. Seleksjon av Sm7018, fra donor og resipient, ble utført ved dyrkning på generelt medium (TY) streptomycin og kanamycin. Dette kunne gjøres ettersom stammen var resistent mot begge antibiotikaene, og donor og resipient ble selektert bort grunnet manglende antibiotika resistens (de var kun resistent mot en av de overnevnte antibiotika). Sekvensering av et fragment fra *S. meliloti* Sm7018 viste at plasmidet var satt inn i *thuR* gen. Figur 20 viser progresjon i arbeidet. Følgende vil resultatene fra hver del i arbeidet bli presentert.



Figur 20. Skjema over progresjon i arbeidet. 1). pVIK112 kuttes med restriksjonsenzymmer, og 2) *thuR* fragment kloneres inn i vektoren og danner pThuR566. 3) Det nye plasmidet transformeres inn i *E. coli* og 4) konjugeres inn i *S. meliloti*. 5) *S. meliloti* inkorporerer plasmidet inn i genomet ved overkryssing. 6) plasmidet settes inn i *thuR*-genet. pVIK112 er her merket med blått, *thuR* fragment er merket med rødt og *S. melilotis* genom er merket med grønt.

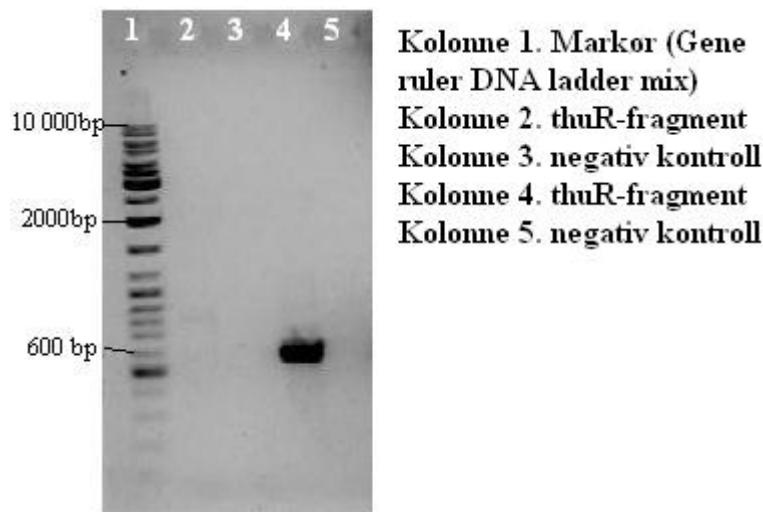
### 3.2.1 Kloning av *thuR* fragment

I tidligere studier ble plasmidet pApa7023 dannet ved hjelp av Tn5 transposon, restriksjonskutt og ligering, og plasmidet inneholder blant annet genene *thuR* og *thuEFGK* (Jensen et al., 2002). Ettersom pApa7023 inneholdt *thuR* ble plasmidet benyttet som templat ved dannelsen av et mindre fragment av *thuR*. Tabell 19 viser en oversikt over material benyttet for dannelsen og kloning av *thuR* fragmentet.

Tabell 19. Material benyttet for dannelsen og kloning av *thuR* fragment.

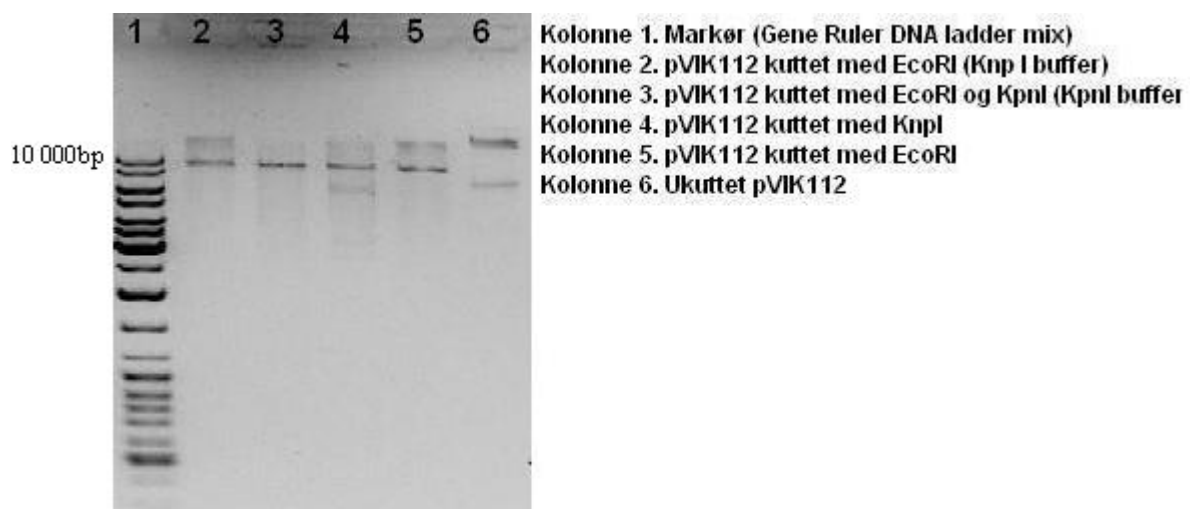
Fragment	Lengde	Primere	Restriksjonsset er i primerne	Mål plasmid	Nytt plasmid
<i>thuR</i> fragment	566 bp	<i>EcoRI</i> forward, <i>KpnI</i> reverse	<i>EcoRI</i> , <i>KpnI</i>	pVIK112	pThuR566





**Figur 21.** Gel testing av PCR produkt fra kopiering av *thuR* fragment. Fragmentene har en størrelse på litt over 500bp ved sammenligning av markør. En ser fra figuren at det ikke er dannet PCR produkt i kolonne 2, som skulle inneholdt *thuR* fragment (båndet mangler)

*thuR* fragment ble dannet ved PCR med pApa7023 som templat. Primerne som ble brukt var *EcoRI* forward og *KpnI* reverse. Figur 21 viser gel elektroforese kjørt av PCR produktet fra dannelsen av *thuR* fragmentet, og viser at størrelsen på fragmentet ligger ca. 600 bp, forventet størrelse var 566 bp. På figuren over skulle to av brønnene (brønn 2 og 4) inneholdt *thuR* fragment, men kolonne 2 viser ingen bånd, noe som tyder på at PCR reaksjonen ikke har fungert. PCR reaksjonene, for begge brønnene, var satt opp likt, men benyttet templat fra to forskjellige plasmidopprensninger. Dette tyder på at dårlig templat er skyld i manglende PCR produkt.



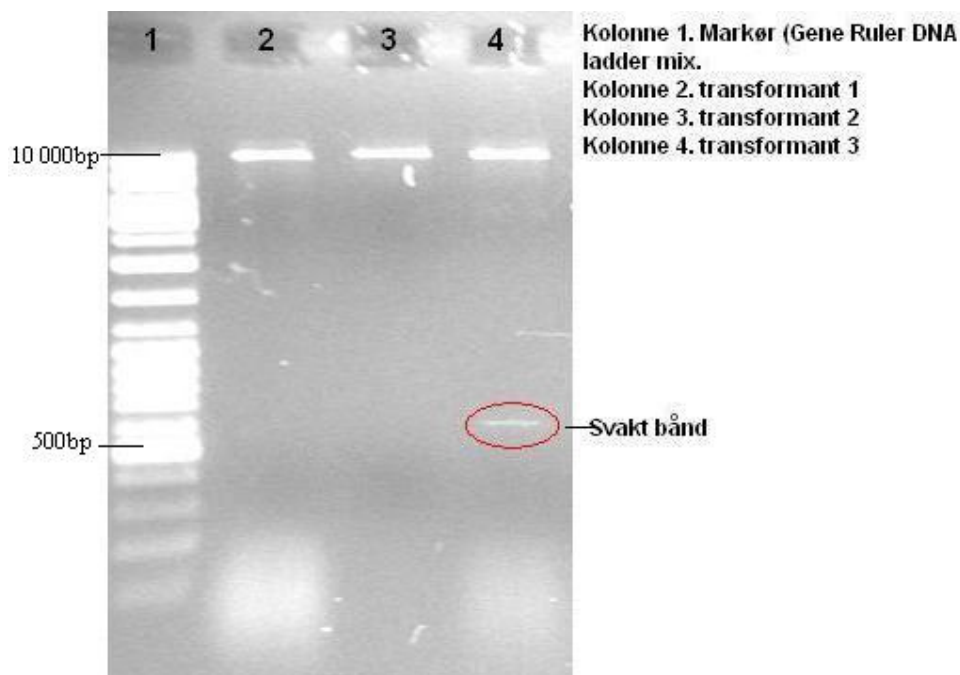
**Figur 22.** plasmidet pVIK112 ble kuttet med både *EcoRI* og *KpnI*, individuelt og sammen, samt med forskjellige buffere, for å teste hva som fungerte. Det viste seg at pVIK112 kunne kuttes med *EcoRI* og *KpnI* sammen ved bruk av NEB buffer 1, som var *KpnI* tilhørende buffer.

*thuR* fragmentet og pVIK112 kuttet med *EcoRI* og *Kpn1*, som begge hadde unike restriksjons seter i både fragment og plasmid. Figur 22 viser pVIK112 kuttet med forskjellige enzymer og buffere. Deretter ble *thuR* fragmentet ligert inn i pVIK112 ved hjelp av T4 DNA ligase.

Tabell 20. Resultater fra transformasjon av elektrokompetente *E.coli* S17-1/ $\lambda$ pir.

DNA transformert	Antall kolonier ved seleksjon (fra pellet)
1:1 Ligering (lik mengde vektor som fragment)	6
5:1 Ligering (5x fragment, 1x vektor)	5
Kuttet plasmid	0
Negativ kontroll (uten DNA)	0
Positiv kontroll (pVIK112)	26

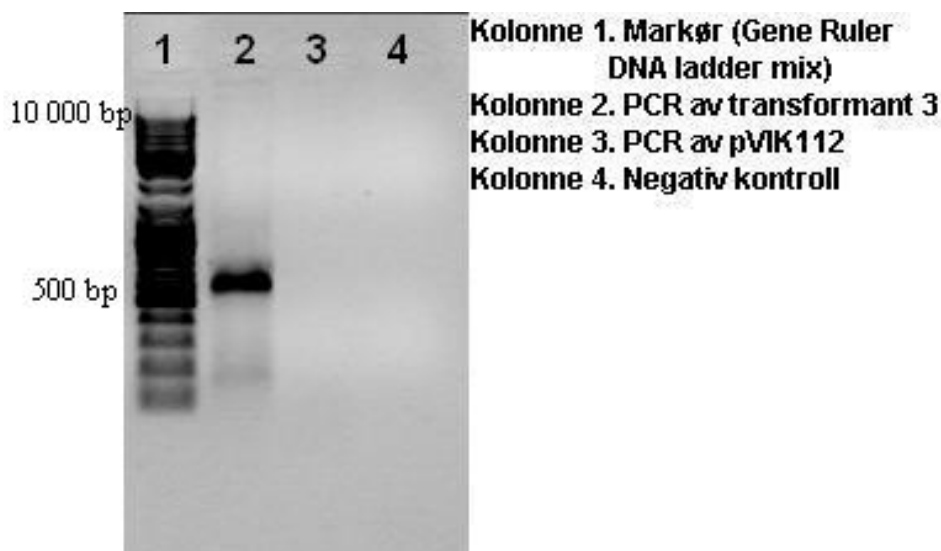
ligeringsreaksjonen ble så elektroporert inn i *E. coli* stamme S17-1/ $\lambda$ pir, og platet ut på LB plater med kanamysin. Tabell 20 viser antall forekomst av kolonier etter elektroporering. Alle disse koloniene har tatt opp plasmid.



Figur 23. Test etter innsatt fragment. Transformanters plasmid ble kuttet med aktuelle restriksjonsenzymer (*EcoRI* og *KpnI*). Ved inkorporert fragment var et bånd på ca. 500 bp synlig ved gel elektroforese. Dette kan en se i brønn 4. Det nye plasmidet ble kalt pThuR566

For å kontrollere om *thuR* fragmentet var inkorporert i plasmid ble 11 kolonier testet. Plasmidene fra koloniene ble kuttet med aktuelle restriksjonsenzymmer (*EcoRI* og *KpnI*) og produktet ble kjørt på gel elektroforese. Ved innsatt fragment var dette synlig som et bånd på ca. 500 bp ved gel kjøring. Figur 23 viser restriksjonskutt av tre plasmider fra transformering. Resultat fra transformeringen var en mulig dannelse av plasmid med innsatt fragment, dette plasmidet ble kalt pThuR566.

For å verifisere at *thuR* fragmentet var innsatt i pThuR566 ble plasmidet testet med PCR. Primerne som ble benyttet her er de samme som ble benyttet for dannelsen av fragmentet, som er spesifikke for *thuR* fragmentet.



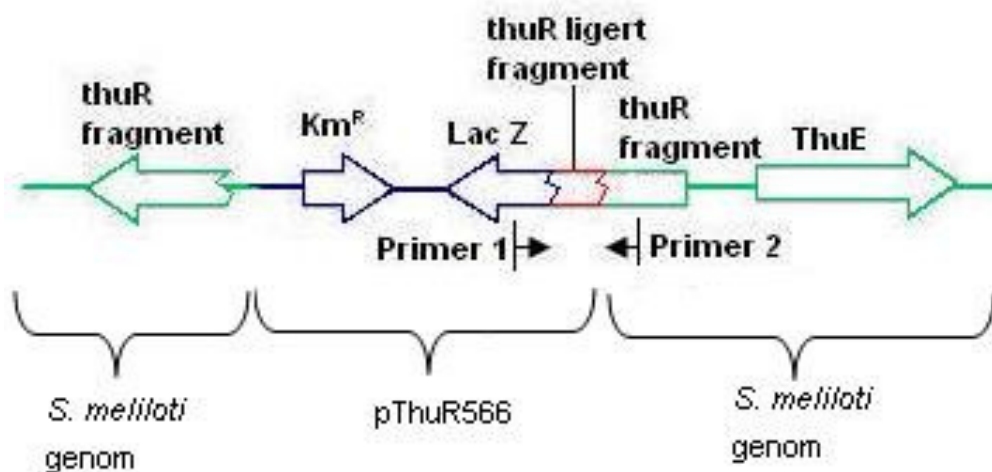
Figur 24. For å verifisere at det innsatte fragmentet var *thuR566* ble dette testet med PCR. Samme primere som ble benyttet ved dannelsen av fragmentet var anvendt. Ved kjøring av PCR produktet på agarose gel elektroforese kunne en se at størrelsen på PCR produktet (i overkant av 500 bp) tilsvarte størrelsen fra restriksjonskuttet, se figur 23.

Figur 24 viser gel kjøring av PCR produktet hvor et klart bånd synes i kolonne 2. Båndet er litt større enn 500 bp. Ingen av kontrollene viste produkt.

### 3.2.2 Konjugering av *S. meliloti* Sm1021

*E. coli* transformanter med pThuR566 ble dyrket sammen med *S. meliloti* Sm1021 i generelt medium (TY) for overføring av plasmidet til *S. meliloti* ved konjugasjon. Deretter ble cellene overført til  $\text{Stp}^{500}\text{Km}^{100}$  agar seleksjonsplater for å selektere for *S. meliloti* transkonjuganter. *S. meliloti* Sm1021 er resistent mot streptomycin, og pThuR566 inneholder resistens genet til

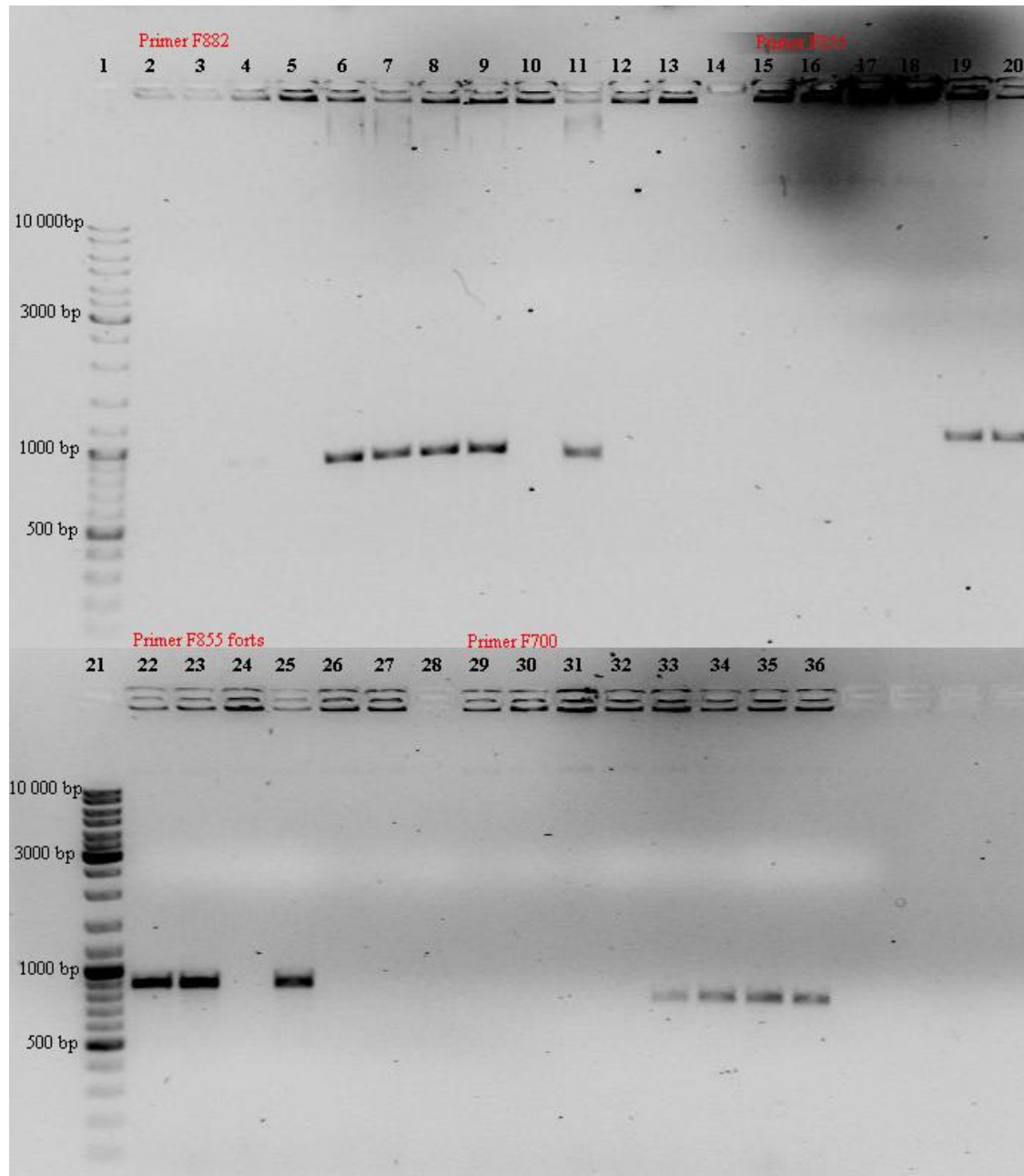
kanamycin. Dette medfører at kun *S. meliloti* hvor pThuR566 er inkorporert i genomet vil vokse på seleksjonsmediet. Fra konjugeringsmiksen ble det strøket ut 31 plater på TY Stp<sup>500</sup> Km<sup>100</sup> hvor av 15 plater var 10x fortykning og 16 plater var 100x fortykning. Ved 10x fortykning forekom det gjennomsnittlig 20 store kolonier og 220 små kolonier. Ved 100x fortykning forekom det gjennomsnittlig 3 store kolonier og 130 små kolonier. Som kontroll ble donor og resipient strøket ut transkonjugantens seleksjonsmedium. Donor (*E.coli*) ble strøket ut på fire plater hvor det forekom i gjennomsnitt 10 kolonier. Resipient (*S. meliloti*) ble også strøket ut på fire plater, men ingen kolonier vokste fram. Store kolonier regnes her som koloner med en diameter på 2-3 mm etter 5 dagers inkubering.



**Figur 25.** Ved forventet overkryssing vil plasmidet settes inn i *thuR*-genet til *S. meliloti*. Her vises hvor primerne benyttet for å verifisere korrekt innsetting av plasmid i genom.

Store kolonier ble plukket ut og overført til nye TY Stp<sup>500</sup> Km<sup>100</sup>. Koloniene ble derfra overført til seleksjonsplater med Km<sup>100</sup>, Stp<sup>500</sup> og glukose eller trehalose som karbonkilde. Fra seleksjonsplatene ble 12 kolonier som tilsynelatende varierte i vekst plukket ut. For å verifisere om pThuR566 var inkorporert i *thuR* genet, ble det kjørt PCR direkte på kolonisuspensjon av transkonjugantene. Primerne som ble benyttet her var F882, F855, F700 og MedR. De tre førstnevnte primerne er forward primere og binder til en sekvens som, ved forventet overkryssing, vil ligge oppstrøms av det innsatte plasmidet (i genomet). MedR er en revers primer, og binder til en sekvens i *lacZ* genet som ligger inne i plasmidet. Det ble her benyttet flere forward primere for å teste hvilke som gav PCR produkt. MedR (reverse) primeren var tidligere benyttet for PCR av *lacZ*, og behøvde derfor ikke å kontrolleres (Ampomah et al., 2008). Figur 25 viser utdrag av forventet overkryssing mellom pThuR566 og genomet til *S. meliloti*. Figuren viser også binstedene til primerne, hvor primer 1 referer

til reverse (MedR) primer og primer 2 referer til forwardprimerne (F822, F855 og F700). PCR av de 12 koloniene resulterte i 5 sterke bånd (figur 26).



**Figur 26.** Resultat av PCR direkte på kolonisuspensjon. 12 kolonier transkonjugerte *S.meliloti* ble testet for inkorporering av pThu566 i genomet. Brønn 1 og 21 er markør. Brønn 2-13 er koloni 1-12 amplifisert med F822 og MedR. Brønn 15-27 er koloni 1-12 amplifisert med F855 og MedR. Brønn 29-36 er koloni 1-8 amplifisert med F700 og MedR. Brønn 14 og 28 er kontroll med vildtype *S. meliloti* Sm1021. Som en ser gir koloni 5-8 og koloni 10 sterke bånd.

Figur 26 viser fem sterke bånd fra PCR av transkonjugantene, og viser DNA fragmenter med en størrelse på i ca. 900 bp som var forventet. For å verifisere at de fem båndene var

bestående av deler av *S. melilotis* genom og deler det innsatte pThuR566 ble PCR produktet sekvensert.

### 3.2.3 DNA Sekvensering

De fem prøvene ble sekvensert i begge retninger med primerne F882 og MedR. Dette gav to komplementære sekvenser for hver transkonjugant. For å kontrollere dette ble de to komplementære prøvene fra hver transkonjugant parret (alignet) ved bruk av Geneious Pro trial 4.8.5. Resultatene viste at de komplementære sekvensene hadde en parvis identitet på 99,2 % eller bedre, sekvensene hadde også 91,9 - 92,5 % identiske seter.

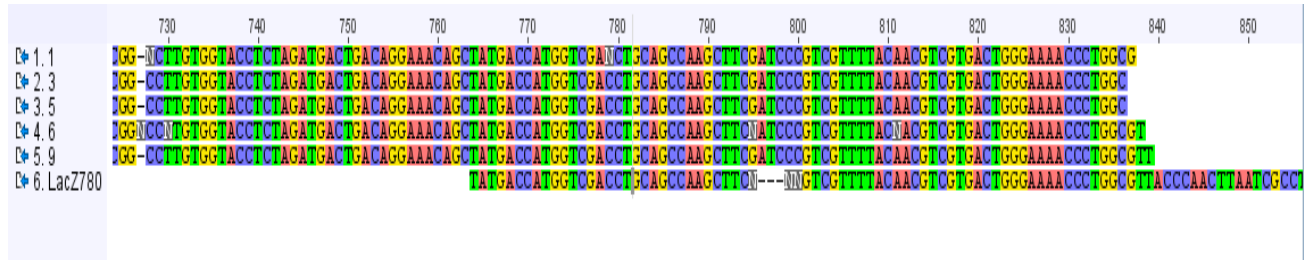
Det var forventet at samtlige av sekvensene skulle inneholde deler av *thuR* og *lacZ* genet (figur 25). For å undersøke at alle sekvensene innholdt disse genene ble sekvensene alignment verktøyet "BLAST". Denne parringen (alignment) viste at sekvensene hadde 98 – 100 % identitet med *thuR*, og 92 – 100 % identitet med *lacZ*. Samme alignment ble gjennomført med Geneious Pro trial 4.8.5. Tabell 21 Tabell 21 viser resultatet fra sekvensene alignet med *thuR* og *lacZ*.

**Tabell 21. Alignment av sekvenser fra mutanter med *thuR* og *lacZ* ved bruk av Geneious Pro trial 4.8.5**

Sekvens	Transkonjugant (retning på sekvens)	Identiske seter med <i>thuR</i>	Parvis identitet med <i>thuR</i>	Identiske seter med <i>lacZ</i>	Parvis identitet med <i>lacZ</i>
1	1 (forward)	789 (77,2 %)	93,2 %	67 (4,5 %)	91,9 %
2	1 (reverse)	793 (77,2 %)	95,4 %	35 (2,3 %)	88,8 %
3	2 (forward)	791 (77,4 %)	93,2 %	67 (4,5 %)	92,8 %
4	2 (reverse)	801 (78,5 %)	95,4 %	36 (2,4 %)	86,9 %
5	3 (forward)	791 (77,4 %)	93,2 %	67 (4,5 %)	92,8 %
6	4 (forward)	790 (77,2 %)	92,9 %	68 (4,6 %)	92,0 %
7	3 (reverse)	793 (77,5 %)	93,9 %	40 (2,6 %)	84,0 %
8	4 (reverse)	796 (78,0 %)	95,4 %	36 (2,4 %)	86,9 %
9	5 (forward)	792 (77,5 %)	93,2 %	70 (4,7 %)	93,1 %
10	5 (reverse)	802 (78,6 %)	94,8 %	39 (2,6 %)	83,9 %

Sekvenser fra de ulike transkonjugantene var svært like, og inneholdt som nevnt deler av både *thuR* og *lacZ* genene. I tillegg ble programmet "Primer-BLAST" benyttet til å finne

primersete for det innsatte *thuR* fragment i sekvensene, og dette viste at det innsatte *thuR* fragment var midt i samtlige sekvenser. Figur 27 viser alle av forward sekvensene og *lacZ* genet alignet mot hverandre ved bruk av Geneious Pro trial 4.8.5.

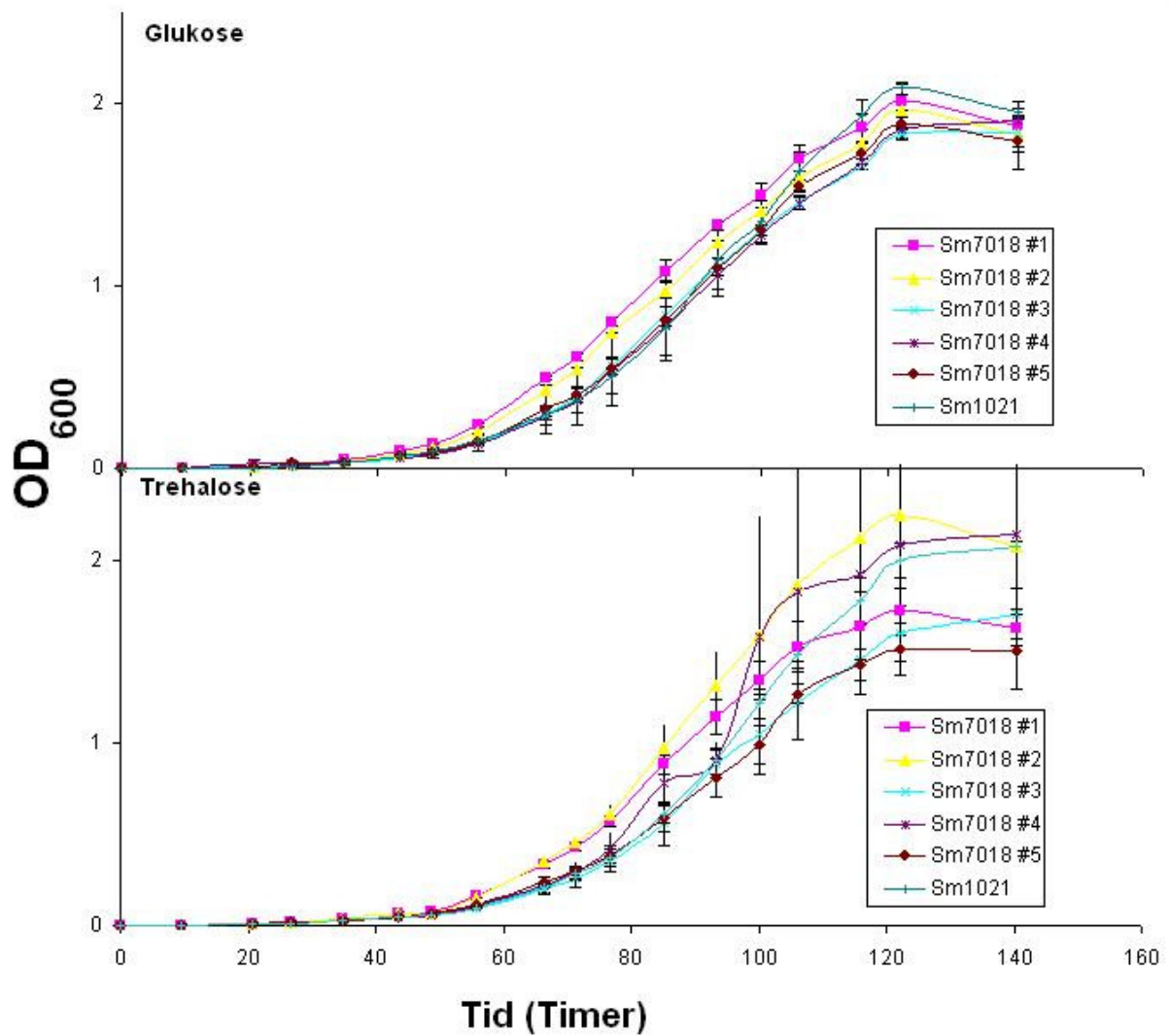


**Figur 27.** Alle forward sekvensene parret (alignment) med *lacZ*. Sekvens 1 er fra transkonjugant 5, sekvens 2 er fra transkonjugant 6, sekvens 3 er fra transkonjugant 7, sekvens 4 er fra transkonjugant 8 og sekvens 5 er fra transkonjugant 10.

Resultatene viser at alle sekvensene inneholder deler av *thuR* og deler av *lacZ*, hvor *thuR* ligger oppstrøms *lacZ*. Dette viste at mutering av *thuR* i *S. meliloti* var vellykket og den nye *S. meliloti* stammen ble kalt Sm7018.

### 3.2.3 Vekstkurve

*S. meliloti* Sm7018 har et inaktivt *thuR* gen, og det var av interesse å undersøke fenotypen til denne stammen. Ettersom *thuR* formodet er et regulatorgen for trehalose transport var det relevant å undersøke stammens evne til å utnytte trehalose som karbon - og energikilde. Sm7018 og Sm1021 ble dyrket på flytende seleksjonsmedium med 0,4 % (w/v) trehalose eller glukose (figur 28) Her sees at Sm7018 og Sm1021 har en relativt lik vekst ved glukose som karbonkilde. Med trehalose som karbonkilde er det større variasjon i veksten mellom Sm7018 og Sm1021, men ingen signifikant forskjell. Stammene har en normal vekstkurve med glukose eller trehalose som hovedkarbon og energikilde, og inkluderer lag-fase, eksponensialfase, stasjonærfase og dødsfase.



Figur 28. Vekst av *S. meliloti* Sm1021 og Sm7018 på glukose og trehalose. Hver kurve representerer gjennomsnittet av tre forskjellige vekst eksperiment pr. stamme, hvor standardavviket er markert.



## 4. Diskusjon

### 4.1 Diskusjon av det didaktiske arbeidet

#### *Interesse for biologi*

De fleste elevene, fra undersøkelsen, viste at de hadde stor interesse for biologi, og så nyttigheten og mulighetene med faget. Store deler av klassen hadde vurdert å studere biologi eller biologirelaterte fag etter endt videregående skole, og majoriteten av klassen ønsket å studere realfag. Grunnen til høy rekruttering til biologi i denne klassen kan komme av en god lærer som vekker elevenes interesse for faget og faget gir realfagspoeng ved opptak til høyere utdanninger.

#### *Forventninger til elevbesøket*

Læreren så fram til universitetsbesøket, og fokuserte på det faglige utbyttet elevene og hun selv kunne få ved dette besøket. Hun ønsket å øke sin forståelse for metodene, og styrke egen undervisningskompetanse i emnet. Læreren mente elevene ville få mulighet til å stille faglig utfordrende spørsmål og øke den faglige forståelsen. Lærerens fokus på faglig utbytte er naturlig da hennes formål med å delta på universitetsbesøket var at elevene skulle få et bedre undervisningstilbud enn hun og skolen kunne stille med. Elevene fokus var rettet mot universitetsbesøket som en opplevelse og avbrekk fra en ordinær skoledag. I tillegg var det noen elever som mente universitetets kompetanse og utstyr kunne gi ekstra utfordringer. Fra elevintervjuet kom det også fram at universitetsbesøk var en motivasjon i selv, og var en god inspirasjonskilde for elevene. Inspirasjon, motivasjon og opplevelser er verdier som kan være viktige faktorer for elevenes læring.

#### *Tilbakemeldinger på elevbesøk*

Ved endt universitetsbesøk kommenterte læreren at alt var godt planlagt, og dette skapte en rolig atmosfære. En rolig atmosfære, hvor elevene har klart alt materiell, kan være med å minke stressfaktorer i laboratorieundervisningen. Dette gjør at elevene får mer tid til å fokusere på hva som skal gjøres og hvorfor det skal gjøres, framfor å fokusere på hva de trenger til å utføre forsøket. Elevene ved elevintervjuet var alle svært fornøyde med universitetsbesøket. De mente de fikk bedre innblikk i bioteknologi og spesielt metoden genetisk fingeravtrykk. I tillegg mente elevene at vanskelighetsgraden og oppfølgingen underveis var bra. Det er viktig å tilpasse vanskelighetsgrad slik at elevene har noe å strekke

seg etter faglig. Oppfølging er da viktig for å lede elevene i riktig retning. Hva elevene kan lære alene og hva elevene kan lære med hjelp fra andre kalles den nærmeste utviklingssonen, og er svært viktig for faglig progresjon (Imsen, 2005). Elevene fikk delta aktivt i diskusjon og refleksjon rundt metodevalg, og dette var en motivasjonsfaktor som skapte stor læringsinteresse. Elevene hadde få negative ting å påpeke med undervisningsbesøket, men kommenterte at det var mindre å gjøre enn forventet, samt var det noe av utførelsen som var utført på forhånd grunnet bruk av farlige stoffer. Det vil alltid være noen ting som kan forbedres ved en slik første gangs utprøvd øvelse.

#### *Mulige bidrag til undervisningen av det lokale universitet*

I en samtale med lærer kom det fram at skolen selv hadde noe molekylærbiologisk utstyr, men grunnet manglende kompetanse hos lærerne ble dette utstyret sjeldent benyttet. Læreren mente at universitetet har sterk faglig kompetanse og oppdatert utstyr. Dette kan gi en bedre og variert undervisning for elevene, sammenlignet med den undervisningen læreren eller skolen har kompetanse til å gi. Undervisning ved universitetet kan legges opp som fag dager, hvor elevene får en opplevelse med både faglig arbeid og et innblikk i høyere utdanninger. Dette kan motivere elevene, og resultere i større faglig fokus. For universitetet kan samarbeid med videregående skole øke rekrutteringen ved at elevene får bedre kjennskap til institusjonen (dette er spesielt viktig for realfagene). Elevene, ved elevintervjuet, var også enige at universitetet kunne bidra med sterkere faglig kunnskap og bedre utstyr. Ofte er skolens økonomiske situasjon og lærernes kompetanse begrensninger for undervisningen. TIMSS 2007 viser at norske lærere har mindre relevant etterutdanning sammenlignet med internasjonalt nivå (Grønmo & Onstad, 2009b). For å bedre denne situasjonen kan universitetet bidra med relevante kurs og etterutdanninger med ekstra fokus på utfordrende lærerplanmål, og dette kan igjen øke kvaliteten og undervisningen ved norske skoler, som er et mål i strategiplanen "Realfag for fremtiden – strategi for styrking av realfag og teknologi 2010-2014" (Kunnskapsdepartementet, 2010f).

#### *Faktorer som skaper motivasjon i undervisningen*

Motivasjon er sammensatt og at det er flere faktorer som spiller inn på elevenes motivasjon (Imsen, 2005). I elevundersøkelsen kom det fram at ytre faktorer som gode tilbakemeldinger i form av karakterer og lærerens engasjement og kunnskap var sentrale i elevenes motivasjon. I tillegg var indre faktorer som personlig interesse og mestring av emnene vesentlige faktorer

for optimal læringsmotivasjon. Fra intervjuet kom det fram at gjensidig respekt mellom lærer og elever er også en mulig motivasjonsfaktor for faglig progresjon. Læreren må forstå elevenes problemer og kunne formidle faget slik at hun når fram til elevene. Til gjengjeld kreves det at elevene ønsker å vise at de har lært noe, og gjennom elevenes arbeid vil lærer kunne se resultatet av egen undervisning.

#### *Molekylærbiologi – det vanskelige temaet innen biologi*

Læreren som deltok på undersøkelsen hadde lite erfaringer og kunnskaper om molekylærbiologi. Mye tydet på at dette var en begrensende faktor i hennes planlegging og gjennomføring av undervisning, da hun selv mente det var utfordrende å undervise så detaljerte emner med minimale forkunnskaper. Ved både elev undersøkelser og intervju var det molekylærbiologi som framstod som vanskelige emner. Begrunnelsen som ble gitt for hvorfor temaene var vanskelig indikerte at mye detaljer var en av hovedgrunnene, her inkluderte elevene både reaksjonsmekanismer og fenomener på molekylært nivå. Felles faktorer som gav opphav til vanskelige emner var at fenomenene ikke kunne sees med det blotte øye og detaljer var vanskelig å huske. Lærer og elever har, i denne klassen, samme syn på hvilke biologiemner som er vanskelig og mer krevende. Om det er en sammenheng mellom lærerens svake kompetanse og elevenes syn på emnene er vanskelig å anslå konkret ut fra dette, men det kan være en sammenheng.

#### *Tilrettelegging av undervisning ved vanskelige temaer*

Læreren nevnte at biologi 2 var svært detaljert og dette gjorde det vanskelig å legge opp en morsom undervisning. Med manglende dybde og bredde i fagfeltet kan det være en utfordring å se mulighetene for variasjon som finnes innen undervisningen. Tiltross for at læreren følte at hun strakk lite til ved planlegging av en variert undervisning i vanskelige temaer, fikk hun god tilbakemelding hos elevene ved intervjuet. Elevene mente at læreren var flink å prioritere tid og fokus til utfordrende deler av pensum. I tillegg var læreren flink å inkludere elevene i diskusjoner ved løsning av problemer på tavle. Aktiv elevdeltakelse er svært viktig for å øke refleksjon og læringsutbytte til elevene. Mye tyder på at elevene ikke alltid krever en morsom undervisning, men at undervisningen er tilpasset vanskelighetsgraden til det omtalte emnet ved fokus på tidsbruk og undervisningsmetoder.

Læreren ønsket å lette undervisningen i vanskelige emner ved å relatere teori til kjente fenomener. PISA 2006 viste at naturfagsundervisning med fokus på anvendelighet i dagliglivet hadde positiv korrelasjon med naturfagsskår (Kjærnsli et al., 2007), her inngår relatering av teorier til kjente fenomener. Elevene selv mente at visualiseringer i form av animasjoner og kortfilmer kunne benyttes for å lette undervisningen i vanskelige emner. Kortfilmer ville gi en visualisert form for introduksjon i emnene. Dette kunne gi elevene et innblikk i begreper og fenomenene i emnene, og dermed gi elevene noe å bygge forståelsen rundt. Animasjoner kan bidra til å forstå funksjoner av fenomener, og på denne måten bidra til økt forståelse.

Grunnet lærerens manglende kompetanse i molekylærbiologi kan det oppstå utfordringer når hun prøver å relatere teorien til noe kjent. Lærerens faglige bakgrunn i hvert tema spiller inn på kvaliteten på undervisningen læreren potensielt kan gi, og innen bioteknologi viste det seg at læreren hadde begrensninger som hemmet kvaliteten på undervisningen. Dette var læreren åpen om, og grep dermed sjansen raskt da universitetet stilte seg til disposisjon, både for å lære selv og for å øke kvaliteten til elevene sine.

#### *Lærerens og elevenes syn på laboratoriearbeid*

Både lærer og elever i denne klassen fortrakk klasseromsundervisning, bestående av en introduksjon etterfulgt av en valgfri arbeidsmetode. Her hadde læreren mulighet å hjelpe etter elevenes behov, og elevene kunne velge metode etter hva de selv foretrakk. Individuelt arbeid ble belyst i TIMSS 2007 hvor Norge hadde langt mer individuelt arbeid enn vanlig internasjonalt, og i tillegg et lavere nivå i naturfag (Grønmo & Onstad, 2009b). Det virker til å være en sammenheng mellom mengden individuelt arbeid og elevenes prestasjoner, og dette kan ligge til grunn i at elevene ikke blir tvungen til refleksjon ved denne undervisningsmetoden. Bruk av diskusjon og samarbeid i undervisningen kan øke den mentale aktiviteten, samt tvinge fram refleksjon hos elevene. Dette kan gjøre at elevene oppnår høyere forståelse og kunnskap til å avklare faglige problemer. Tiltross for at læreren likte oppgaveløsning understreket hun at dette gjaldt ikke bare individuelt, men også i par og mindre grupper.

Læreren mente at laboratoriearbeid var et positiv innskudd i undervisningen, ettersom det er mindre kjedelig enn ordinær undervisning og elevene er mer aktiv. Elevene får både sett og

lært ting ved praktiske forsøk, og det teoretiske kan relateres til det praktiske. Disse faktorene mente læreren kunne bidra til å øke læringsutbytte. Ut fra PISA 2006 ble det avdekket at det var en negativ korrelasjon mellom laboratoriearbeid og læringsutbytte (naturfagsskår) (Kjærnsli et al., 2007). Dette kan ha en sammenheng ved, som læreren og elevene nevnte, at laboratoriearbeid kan fortone seg litt kaotisk og stressende. Lite forkunnskaper og tilrettelegging av laboratoriearbeid kan hindre elevenes refleksjon. Dette kan igjen resultere i manglende forståelse av hensikten, og kan skape problemer ved laboratorierapport skriving. Dårlig utstyr kan resultere i lite eller fraværende resultat ved laboratoriearbeidet, og dette ender ofte med en teoretisk gjennomgang av hensikten med arbeidet. I undersøkelsen kom laboratoriearbeid svært dårlig ut i forhold til hva elevene følte de hadde mest læringsutbytte av. Ved elevintervjuet ble dette begrunnet med at undervisningsmetoden krevde mye tid og grundig bakgrunnskunnskap.

#### *Laboratoriearbeid og tilrettelegging for læringsutbytte*

I denne klassen kan det være en sammenheng mellom lærerens faglige bakgrunn og hva elevene oppfatter som vanskelige biologiemner. Ved manglende kunnskaper blir det utfordrende å tilrettelegge undervisning som gir optimalt læringsutbytte, da læreren ikke har kunnskaper om mulighetene som finnes. I slike situasjoner blir ofte lærebøkene fulgt direkte, og læreren utfordrer seg lite. Dette kommer spesielt til uttrykk ved praktiske arbeidsmetoder som laboratorium ettersom manglende kompetanse hos lærere kan resultere i bruk av kokebokoppskrifter i laboratoriearbeide (Hofstein & Lunetta, 2004). En slik måte å legge opp laboratorieundervisningen fører til at elevene reflekterer lite, og hensikten med øvelsen oppfattes ofte å være framgangsmåten eller oppnåelse av riktig resultat (Hofstein & Lunetta, 2004). Lite refleksjon og egenprøving fører ofte til lavt læringsutbytte. Her er det svært viktig å poengtere at uansett hvor trygg en lærer føler seg i faget bør ikke elevene få full frihet. Dette av den grunn til at elevene vil lett gå seg vill, som nevnt i PISA 2006 (Kjærnsli et al., 2007). Elevenes tøyler bør være delvis kontrollerte slik at det er rom for refleksjon på samme tid som at det faglige læringsutbyttet ikke rotes bort i prøving og feiling (Kjærnsli et al., 2007).

For å øke læringsutbyttet må elevene utfordres. Dette kan gjøres ved å ha delvis åpne laboratorieøvelser, hvor hensikten med arbeidet, tidsrammene og noen utvalgte metoder er klar. Det er svært viktig at laboratoriearbeidet ikke begrenses til å lære bestemte metoder, men at metodene benyttes som hjelpemidler for å undersøke fenomener og løse problemer

(Hofstein & Lunetta, 2004). Dette medfører at elevene bør ha kunnskaper om metodene, som skal benyttes, før gjennomføring av laboratoriearbeidet. Fokus ved gjennomføring må være på de fenomener som skal undersøkes og de problemer som skal løses. Dette krever tid til refleksjon for å finne hvilke metoder som er mest hensiktsmessig å benytte. Av den grunn trenger elevene kunnskaper om de fenomener som skal undersøkes, og dette kan gjennomgå som en introduksjon til øvelsen. På denne måten kan en legge opp det praktiske og teoretiske sammen, ved at en gjennomgår relevant teori underveis i laboratoriearbeidet etter behov. En slik sammenfletting av teori og praksis vil også friggi en del tid, ettersom det teoretiske ofte gjennomgås to ganger: ved ordinær undervisning og som introduksjon ved laboratoriearbeide. For å legge opp en slik delvis åpen laboratorieundervisning kreves god planlegging. Kommunikasjon mellom lærer og elever vil være sentralt både under og etter gjennomføring. Læreren bør ha en sterk faglig kompetanse for å se muligheter med undervisningen, men også for å mestre en viss spontanitet ved diskusjoner med elevene. God planlegging, tilrettelegging og gjennomføring vil skape en rolig atmosfære ved laboratoriearbeid, og forebygge stress, uforutsette situasjoner og strenge tidsrammer. I tillegg vil elevenes egenutforskning og refleksjon fremmes. Meningen med en delvis åpne laboratorieøvelser er at elevene skal ha frihet innen visse rammer, slik at de kan utfordre seg selv uten å gå seg vill. Graden av åpenhet ved laboratoriearbeide, både ved egenutforskning og i utførelse, må avgjøres ut fra både klasse og øvelse som skal gjennomføres.

## 4.2 Diskusjon av laboratorieresultatene

I dette arbeidet ble dannet et plasmidet pThuR566 inneholdende et *thuR* fragment. Dette plasmidet ble transformert inn i *E. coli* stamme S17-1/λpir, og videre inn i *S. meliloti* Sm1021 ved konjugasjon. Resultatet var flere transkonjuganter og 12 av disse ble testet ved PCR, for å verifisere om plasmidet var inkorporert i *thuR*-genet. Ved forventet innsetting av plasmid ville PCR gi resultater i form av ett bånd med en størrelse på ca. 900 bp. Fem av koloniene viste forventet innsetting av plasmid i genom, og PCR produktet fra disse ble sekvensert. Transkonjugantene som ikke viste resultat fra PCR kan ha inkorporert hele eller deler av plasmidet ved andre seter i genomet. Dette kan skje dersom mindre områder av plasmid og genom er homologt.

Sekvenseringen av hver transkonjugant ble gjort med to primere, som gav opphav til to komplementære sekvenser. Ved alignment ble det vist at de komplementære sekvensene var mer enn 99 % like. Grunnen til at de ikke var 100 % like er at sekvenseringen ikke gir komplett sekvensering i starten ved primerne, og dette gir avvik ved endene av sekvensene. Denne sekvenseringen viste en vellykket overkrysning mellom plasmid og genom i *thuR* regionen, og disse stammene av *S. meliloti* ble kalt Sm7018.

Sekvensene ble alignet med genene *thuR* og *lacZ*, både ved bruk av "BLAST" og Geneious Pro trial 4.8.5. Disse parringene viste mindre avvik mellom sekvensene og genene, og dette kan komme av små endringer i base sammensetningen som er innført ved å innsetting av restriksjonsseter. Resultatene fra "BLAST" avvok i mindre grad fra parringen gjort med Geneious. Dette kan komme av at Geneious og "BLAST" benytter forskjellige algoritmer og cost matrix. Alle resultatene viser at samtlige sekvenser inneholder både *thuR* og *lacZ*, og at *lacZ* er å finne nedstrøms av *thuR*.

*S. meliloti* Sm7018 viste samme type vekstkurver som vildtypen, Sm1021, ved dyrkning på glukose eller trehalose.. Dersom *thuR*-genet koder for et regulatorprotein, kan mye tyde på at mutasjonen fører til konstitutivt opptak av trehalose. For å finne ut mer om sammenhengen mellom det muterte *thuR*-genet og fenotypen til Sm7018 kan utføre et transportforsøk på Sm7018 med <sup>14</sup>C-merket trehalose. Dermed kan en måle radioaktiviteten til kulturen for å se hvordan trehaloseopptaket er hos Sm7018 i forhold til Sm1021 (vildtypen). Det kan også

være av interesse å se nærmere på er hvordan Sm7018 interagerer med planter ved knolldannelse. Nærmere bestemt kan det være relevant å undersøke om Sm7018 har en fordel i koloniseringsprosessen, undersøke hvordan de koloniserer røttene, og vil de bli overrepresentert ved kolonisering sammen med vildtypen Sm1021.

### **4.3 Bruk av *S. meliloti* som illustrasjon i videregående biologi undervisning**

Arbeidet med inaktivering av *thuR* av *S. meliloti* har vist seg å kunne bidra til flere læreplanmål. Gjennom arbeid med dyrking, transformering og konjugering av bakterier, samt arbeid med antibiotikaresistens har kunnskap om hovedområdet "Cellebiologi" (kunnskapsløftet) blitt opparbeidet (Kunnskapsdepartementet, 2010a). Transformering av bakterier er en egenskap som kan føre til økt antibiotikaresistens. Dette kan skje ved opptak av nakent DNA fra omgivelsene (transformasjon) eller ved at to celler kobles sammen og DNA overføres fra en donor til en mottaker (transformasjon ved konjugasjon). I dagens samfunn er økende bruk av antibiotika innen både medisin og matproduksjon med på å skape multiresistente stammer. Dette skaper store utfordringer i dagens samfunn, og er svært relevant for undervisning i den videregående skole. Metodene som ble benyttet for dyrking, transformering og konjugering var enkle metoder, og kostbart utstyr var ikke nødvendig. Dette gjør at metodene kan benyttes i skolelaboratoriet, og kan brukes som illustrasjon av tilpassningsdyktighet og formering hos bakterier. Metodene benyttet for innsetting av fragment i plasmid kan illustrere genmodifisering (Kunnskapsdepartementet, 2010b), og kan anvendes for å gi eller fjerne egenskaper fra bakterier. Slik genmanipulasjon benyttes til flere formål i forskning og matproduksjon, eksempelvis kan frukt og grønnsaker gjøres kulde og tørketolerante.

PCR, restriksjonskutting, DNA sekvensering og gel elektroforese er metoder som kan benyttes for illustrasjon av læreplanens hovedområde "Genetikk" i biologi undervisningen (Kunnskapsdepartementet, 2010b). Dette målområdet tar for seg oppbygningen og funksjon til DNA. PCR og DNA sekvensering benytter prinsippet bak cellenes DNA syntese for oppkopning av DNA eller for DNA sekvensering. Restriksjonskutt benytter basesammensetningen av DNA til å kutte det, og er en naturlig forsvarsmekanismer mot fremmed DNA i celler. Gel elektroforese er en metode hvor man kan visualisere størrelser på DNA fragment, og benytter DNAets naturlige negative ladning ved nøytral pH til å forflytte DNAet i et spenningsfelt.



Hovedområdet bioteknologi omhandler utviklingen av nye teknikker og hjelpemidler til medisin, matproduksjon og forskning (Kunnskapsdepartementet, 2010b). Dette hovedområdet kan knyttes til samtlige metoder benyttet ved dette prosjektet. Laboratoriearbeid innen bioteknologi hemmes ofte av manglende og kostbart utstyr, samt at lærerne ofte har svak kompetanse om metodene og utstyret (Hofstein & Lunetta, 2004). Særlig PCR og gel elektroforese krever utstyr som skoler som regel ikke har. Transformasjon kan gjøres dersom en har ferdig kjemokompetente celler. Problemet her kan være manglende utstyr for inkubering og dyrkning av kulturer. Her kan universitetet være en viktig bidragsyter, både med faglig kompetanse og utstyr. Strategiplan "Realfag for fremtiden – strategi for styrking av realfag og teknologi 2010-2014" vektlegger blant annet samarbeid mellom skoler, universitet, høyskoler og næringsliv. Et slikt samarbeid vil være viktig innenfor undervisningen for å kunne gjennomføre flere metoder som kan brukes i bioteknologi. Skolen som deltok hadde litt utstyr som gel elektroforese kar og pipetter, men dette ble svært sjeldent benyttet grunnet lærerens manglende kompetanse om utstyret. I tillegg hemmet stadig rullering på fagene lærerens utvikling og forbedringsmuligheter, da lærerne bare underviste et fag ett år av gangen.

I dette prosjektet ble kunnskap om *E. coli* og *S. meliloti*, samt deres tilpasninger, opparbeidet. Kunnskap om disse bakteriene kan benyttes til illustrasjoner av andre læreplanmål som ikke omhandler molekylærbiologi.

I biologi 1 kan kunnskap om overnevnte organismer benyttes til å illustrere deler av hovedområdene "Den unge biologen", "Cellebiologi", "Funksjon og tilpassing" og "Biologisk mangfold" (Kunnskapsdepartementet, 2010c). I først nevnte hovedområde kan *S. meliloti* benyttes til planlegging og gjennomføring av undersøkelser, samt rapportering fra arbeidet. Undersøkelsene kan dreie seg om *S. melilotis* intraksjoner i sitt økosystem, videre kan disse organismene observeres og sammenlignes med bakgrunnskunnskap fra systematikk. Innen for hovedområdet "Cellebiologi" kan *S. melilotis* symbiose med planter være relevant. Planter er eukaryote og her kan det være vesentlig å forklare oppbygningen og funksjoner til ulike deler av plantecellen, også ved knolldannelse. Videre kan transport gjennom cellemembran illustreres gjennom *S. meliloti* og plantens samspill, hvor de forsyner hverandre med nitrogenkilder og karbonkilder. Oppbygning og formering til bakterier vil også være relevant innen dette hovedområdet. For å illustrere hovedområdet "Funksjon og tilpassing" kan

symbiosen mellom *S. meliloti* og planter benyttes. Her kan eksempelvis symbiosen illustrere mulige tilpassinger planter kan ha ved vekst i nitrogenfattig jord. Hovedområdet ”Biologisk mangfold” kan illustreres ved variasjoner i livsformene og fysiologiske tilpassninger til planter og mikroorganismer. En kan illustrere variasjoner innefor og mellom populasjoner, samt kunne forklare biologisk mangfold i forhold til variasjon i habitat og nisjer i økosystemer med de overnevnte organismer.

Innen biologi 2 finnes hovedområdene ”Den unge biologien”, ”Energiomsetting”, ”Genetikk”, ”Bioteknologi”, ”Økologi” og ”Evolusjon” (Kunnskapsdepartementet, 2010b). Deler av disse hovedområdene kan også illustreres med bakteriene *E. coli* og *S. meliloti*, samt *S. melilotis* symbiosedannelse med belgplanter. Formål med forskningen på *S. meliloti* og dens trehalose gener kan brukes til å diskutere etiske utfordringer innenfor biologisk forskning og inngår i hovedområdet ”Den unge biologien”. På cellenivå vil en kunne illustrere hovedområdet ”Energiomsetting” ved bruk av de samme organismene, hvor en kan vise opptak og katabolisme i en frittlevende bakterie eller ved samspillet mellom to symbionter. Forskningen på ulike trehalose gener i *S. meliloti* kan benyttes for å illustrere utfall av genetiske sykdommer forårsaket av mutasjoner, og dette inngår i hovedområdet ”Genetikk”. Mye av forskningen på trehalose genene går ut på å mutere gener for å se konsekvenser av dette. Genetiske sykdommer fremmer mutasjoner i gener, og vil kunne få samme resultat som fremmes ved forskning. Innen ”Bioteknologi” kan ulike stammer av *S. meliloti* benyttes til å lage genetiske fingeravtrykk for å illustrere slektskap mellom organismer. Framstilling av genmodifiserte organismer kan også illustreres med forskning utført på *S. meliloti* og dens trehalose gener, som ofte inkluderer overføring av egenskaper til bakterier som den opprinnelig ikke hadde. Innen hovedområdet ”Økologi” kan *S. meliloti* benyttes for å illustrere faktorer som regulerer vekst og størrelse av populasjoner, og symbiosen mellom *S. meliloti* og planter kan illustrere en del av karbon og nitrogenskretsløpet i et økosystem. Innen for ”Evolusjon” kan de overnevnte bakteriene benyttes til å illustrere endring i genetisk sammensetting ved mutasjoner, naturlig seleksjon, genetisk drift, genflyt og horisontal genoverføring (Kunnskapsdepartementet, 2010b).

Med en gode kunnskaper om en organisme kan en bygge store deler av undervisningen på dette. Elevene kan dermed fordype seg i en organisme, noe som vil gjøre det lettere å få et helhetlig bilde av biologi som fag. Elevene vil da kunne tenke biologifaget som helhet rundt

en organisme, og dette kan gjøre det lettere for elevene både å huske og forstå detaljer og sammenhenger i faget. Det bør nevnes at andre illustrasjoner bør benyttes i tillegg for at elevene skal få faglig bredde og optimal forståelse.



## 5. Avslutning

I arbeidet med denne oppgaven er flere ulike molekylærbiologiske laboratorieteknikker benyttet. Molekylærbiologiske laboratorieteknikker som er benyttet i dette prosjektet omhandlet ligering av DNA-fragment i plasmid, ulike metoder for transformering og konjugering av bakterier, samt antibiotika resistens hos bakterier. Arbeidet har også inkludert metoder som PCR, gel elektroforese, DNA opprensning, DNA analyser og DNA sekvensering, samt bruk av bioteknologisk dataverktøy. Hovedformålet med den eksperimentelle delen var og øke den personlige kunnskapen om metodene, for senere å kunne benytte denne kunnskapen i bioteknologi- og molekylærbiologiundervisning i den videregående skolen. Problemstillingens fokus var rettet mot laboratoriearbeid som undervisningsmetode, og hvor tilrettelegging for bedre læringsutbytte stod sentralt. Dette kan begrunnes i læreplanens mål "Forskerspiren" og "Den unge biologien" (Kunnskapsdepartementet, 2010e, Kunnskapsdepartementet, 2010a). Disse hovedmålene beskriver at elevene skal bruke naturvitenskapelige metoder og biologifaglige arbeidsmåter i opplæringen, her inngår også laboratoriearbeid. Som PISA 2006 nevnte, er en viktig naturfaglig kompetanse å kunne vurdere og bearbeide resultater, samt trekke konklusjoner fra empiriske data (Kjærnsli et al., 2007). Eksperimentelt og praktisk arbeid er ifølge læreplanen en viktig kompetanse i seg selv (Kjærnsli et al., 2007). For å kunne oppnå denne kompetansen er forståelse rundt begrepet "nature of science" viktig, da denne forståelsen vil gi innsikt i vitenskapelig læring som letter oppfatningen av vitenskapelige metoder (Lederman, 2007).

Grundig kunnskap rundt en organisme kan vise seg å være nyttig, da en ofte kan bruke både organismen og dens økosystem til å illustrere flere læreplanmål. Dette kan hjelpe læringen til elevene, ved at de opparbeider seg en helhetlig forståelse om en organismes liv og omfang. Dette vil gi eleven en dybde i læringen og kan begrunnes med utsagnet "Less is more" av Benchmarks (Hofstein & Lunetta, 2004). Slagordet er en beskrivelse på at elevene øker læringsutbyttet ved å gå i dybden, i motsetning til bredden, av faget. Det bør nevnes at andre eksempler for å illustrere motsetninger må inngå i undervisningen. I dette prosjektet har *S. meliloti* vist seg å være en organisme som kan benyttes til å dekke flere læreplanmål, både praktisk og teoretisk.

Lærere har en stor utfordring i undervisningen med å tilrettelegge laboratoriearbeid som gir godt læringsutbytte. Disse utfordringene blir enda større ved mangel på faglig bredde og dybde. Tiltross for at laboratorieundervisning krevde mye fra lærerens side, mente læreren at denne undervisningsmetoden øker motivasjon og læringsutbytte til elevene. Elevene fra intervjuet omtalte laboratoriearbeid som ”helt greit”, og denne uttalelsen ble begrunnet med at undervisningsformen var tidskrevende i forhold til læringsutbyttet. Mange elever ble stresset under gjennomføringen, og dette medførte at de ikke helt fikk med seg hva og hvorfor ting skulle gjøres. Stressfaktoren og nødvendig bakgrunnskunnskap nevnte også læreren som begrensende faktorer i laboratorieundervisningen. Stressfaktorer og strenge tidsrammer kan hindre refleksjon ved laboratoriearbeid, og dette er en klar begrensning for læringsutbyttet. Et annet argument var også at forsøkene ofte ikke fungerte som forventet, og endte med en teoretisk gjennomgang.

Ved elevbesøket kom både elever og lærer med gode tilbakemeldinger på opplegget. Utstyret var tilrettelagt, elevene var aktivt med i diskusjon og stilte spørsmål etter behov. Dette skapte en rolig atmosfære rundt øvelsen, og elevene og læreren følte de hadde hevet kunnskapen om emnet til et nytt nivå. Med stor interesse for biologi i klassen gav universitetsbesøket en annerledes skoledag fylt med mange nye momenter for elevene. Universitetsbesøket stilte med utstyr og kompetanse skolen ikke kunne stille med, og en vinkling på gjennomføringen som skapte spenning. Dette skapte en produktiv tilnærming av emnet med tanke på læring, motivasjon og rekruttering i biologi. Høyere faglig kompetanse og oppdatert utstyr tillater flere muligheter for faglig utfordrende laboratorieøvelser og undervisning.

For å nå et høyere læringsutbytte ved laboratoriearbeid kan delvis åpne laboratorieøvelser benyttes, og kan inkludere:

- En klar hensikt som viser til de fenomener og problemer som skal arbeides med
- Et utvalg av metoder, slik at elevene selv må reflektere rundt hva som er mest hensiktsmessig og benytte (og hvorfor)
- Sammenfletting av teori med praksis (dette vil også gi bedre tid rammer)
- Kommunikasjon mellom alle deltakere ved laboratoriearbeide
- Sterk faglig kompetente lærere
- Materielle ressurser

Med god planlegging og tilrettelegging vil de overnevnte punktene kunne bidra til en rolig atmosfære for aktivt deltakende og reflekterende elever (Hofstein & Lunetta, 2004). God kommunikasjon og forståelse mellom lærer og elever vil også kunne forbygge begrensende faktorer som stress, utforutsette situasjoner og strenge tidrammer. Graden av åpenhet ved laboratoriearbeide, både ved egenutforskning og i utførelse, må avgjøres ut fra både klasse og øvelse som skal gjennomføres.

Ofte er den største begrensende faktoren i skolelaboratoriet svak faglig kompetanse blant lærerne og dårlig utstyrssituasjon. Dette er faktorer som universitetet kan stille med ved samarbeid med skoler. Med utstyr og kompetanse kommer muligheter for variert undervisning med et faglig utfordrende nivå, både for lærere og elever. Universitetet kan bidra med fag dager som universitetsbesøket gjennomført her, og på denne måten bidra etter skolens behov. Slike universitetsbesøk kan øke elevenes motivasjon, faglige fokus og interesse. For å bidra i undervisningen kan også universitetet bidra med etterutdanninger som kan øke lærerens kunnskap både praktisk og teoretisk. Dette kan øke lærernes muligheter både for bruk av illustrasjoner og laboratoriearbeid i undervisningen. Lærernes kunnskap om laboratoriearbeide vil være sentral, for å bearbeide mange av de begrensninger som finnes i laboratoriet. Dette kan bidra til å øke lærerens engasjement, bedre klassens læringsmiljø og danne en rolig atmosfære ved laboratorieøvelser, og dette kan igjen skape en motivasjon blant elevene som styrker læringsutbyttet.





## 5.1 Svar på problemstilling

Problemstillingen for oppgaven var: Hvilket syn har lærer og elevene ved en biologi 2 klasse på laboratoriearbeid, og hvordan kan laboratoriearbeide legges opp for å bidra til bedre læring? Hvordan kan universitetet bidra?

Elevenes og lærerens syn på laboratoriearbeid var splittet. Elevene var ikke særlig begeistret for bruk av laboratoriearbeid, grunnet stressfaktorer og negativt samsvar mellom tidsbruk og læringsutbytte. Lærerens syn indikerte at hun var klar over disse faktorene. Tiltross for dette mente hun at laboratoriearbeide kunne, med god planlegging og tilrettelegging, være en god illustrasjon på teori, samt et godt læringsriktig innslag i undervisningen.

For å nå et høyere læringsutbytte ved laboratoriearbeid kan delvis åpne laboratorieøvelser benyttes, og dette kan inkludere:

- En klar hensikt som viser til de fenomener og problemer som skal arbeides med
- Et utvalg av metoder, slik at elevene selv må reflektere rundt hva som er mest hensiktsmessig og benytte (og hvorfor)
- Sammenfletting av teori med praksis (dette vil også gi bedre tid rammer)
- Kommunikasjon mellom alle deltakere ved laboratoriearbeide
- Sterk faglig kompetente lærere
- Materielle ressurser

For å bedre læringsutbyttet ved laboratoriearbeid må elevene få utfordre seg selv under kontrollerte forhold med tid til refleksjon. En god planlegging og tilrettelegging kan skape en rolig læringsatmosfære og er forebyggende mot flere av begrensingene som normalt finnes i skolelaboratoriet, som stress og strenge tidrammer.

Universitetet kan bidra med en faglig oppdatert kompetanse og har tilgang på oppdatert utstyr. Universitetet kan også bidra til å styrke den faglige kompetansen til lærerne, både om laboratoriearbeid og rent teoretisk. Universitetsbesøk kan være et positivt innslag og variasjon i undervisningen, og kan fylle de sider skolen ikke kan tilby alene. Utstyrsituasjonen ved universitetet vil kunne føre til et helt annet omfang i den praktiske undervisningen. I tillegg kan universitetsbesøk være en stor motivasjonsfaktor som øker den faglige interessen og fokus hos elevene.



## 6. Referanser

- . University of miami, department of biology. Tilgjengelig fra:  
<http://www.bio.miami.edu/~cmallery/150/gene/Taq.htm> [Aksessert 02.01 2010].
- AMPOMAH, O., JENSEN, J. og BHUVANESWARI, T. 2008. Lack of trehalose catabolism in Sinorhizobium species increases their nodulation competitiveness on certain host genotypes. *New Phytologist*, 179, s. 495–504.
- BECKER, W. M., KLEINSMITH, L. J. og HARDIN, J. 2006. *The world of the cell*, San Francisco, Calif., Pearson/Benjamin Cummings.
- BIOCHEM. 2010. *Research in depth* [Online]. Tilgjengelig fra:  
<http://www.biochem.duke.edu/wysiwyg/images/RaetzImages/CRFig8.jpg> [Aksessert 12.02 2010].
- BIRNBOIM, H. C. og DOLY, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 6, s. 1513-23.
- BØRRESEN-DALE, A.-L. *Restriksjonsenzymmer* [Online]. Store Norske leksikon. Tilgjengelig fra: [http://www.snl.no/sml\\_artikkel/restriksjonsenzymmer](http://www.snl.no/sml_artikkel/restriksjonsenzymmer) [Aksessert 15.12 2009].
- CONTROLLER, B. R. P. Operating Instructions and Application Guide. Accessory for bacterial and fungal Electro-transformation.
- DARNELL, J., LODISH, H., BERK, A., ZIPURSKY, L., P. M. og BALTIMORE, D. 1999. *Molecular Cell Biology*, W.H.Freeman & Co Ltd.
- EHRlich, D. A. 1979. *Competent cells, CaCl<sub>2</sub> method, E. coli, long protocol* [Online]. Zappe, H. Tilgjengelig fra: <http://web.uct.ac.za/depts/mmi/bbhelp/bac1.html> [Aksessert 24.03 2010].
- FERMENTAS 2010. T4 DNA ligase Fermentas
- FRANCHE, C., LINDSTRÖM, K. og ELMERICHE, C. 2008. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants *Plant and Soil*, 321, s. 35-59.
- GAGE, D. J. 2004. Infection and Invasion of Roots by Symbiotic, Nitrogen-Fixing Rhizobia during Nodulation of Temperate Legumes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 68, s. 280-300.
- GEHL, J. 2003. Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. *Acta Physiologica Scandinavica*, 177, s. 437-447.
- GERHARDT, P., WILLIS, R. G. E. M., WOOD, A. og KRIEG, N. R. 1994. *Methods for General & Molecular Bacteriology*, Washington DC, American Society for Microbiology.

- GIBSON, K. E., KOBAYASHI, H. og WALKER, G. C. 2008. Molecular Determinants of a Symbiotic Chronic Infection. *Annual Review of Genetics*, 42, s. 413-441.
- GRIFFITHS, A. J. F., GELBART, W. M., LEWONTIN, R. C. og MILLER, J. H. 2002. *Modern genetic analysis: integrating genes and genomes*, W.H. Freeman and Co.
- GRØNNMO, S. 1996. Forholdet mellom kvalitative og kvantitative tilnærminger i samfunnsforskningen. *Kvalitative metoder i samfunnsforskning*. Oslo: Universitetsforl.
- GRØNNLIEN, H. K., RYVARDEN, L. og TANDEBERG, C. 2008. *Bi2 Grunnbok*, Oslo, Gyldendal Norsk Forlag.
- GRØNNMO, L. S. og ONSTAD, T. 2009a. Kortrapport fra TIMSS 2007. Oslo.
- GRØNNMO, L. S. og ONSTAD, T. 2009b. *Tegn til bedring Norske elevers prestasjoner i matematikk og naturfag i TIMSS 2007*, Oslo.
- GYLDENDAL. 2008. *Polymerase Chain Reaction* [Online]. Tilgjengelig fra: [http://web2.gyldendal.no/undervisning/felles/pixdir20/data/archive\\_specific/bi2\\_grunnbok/image\\_fullsize/09\\_11\\_080852.jpg](http://web2.gyldendal.no/undervisning/felles/pixdir20/data/archive_specific/bi2_grunnbok/image_fullsize/09_11_080852.jpg) [Aksessert 03.03 2010].
- HOFSTEIN, A. og LUNETTA, V. N. 2004. The Laboratory in Science Education: Foundations for the Twenty-First Century. *Science Education*, 88, s. 28-55.
- IMSEN, G. 2005. *Elevenes verden: innføring i pedagogisk psykologi*, Oslo, Universitetsforlaget.
- JENSEN, J. B., AMPOMAH, O. Y., DARRAH, R., PETERS, N. K. og BHUVANESWARI, T. V. 2005. Role of Trehalose Transport and Utilization in Sinorhizobium meliloti-Alfalfa Interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18, s. 694-702.
- JENSEN, J. B., PETERS, N. K. og BHUVANESWARI, T. V. 2002. Redundancy in Periplasmic Binding Protein-Dependent Transport Systems for Trehalose, Sucrose, and Maltose in Sinorhizobium meliloti. *J. Bacteriol.*, 184, s. 2978-2986.
- KALOGERAKI, V. S. og WINANS, S. C. 1997. Suicide plasmids containing promoterless reporter genes can simultaneously disrupt and create fusions to target genes of diverse bacteria. *Gene*, 188, s. 69-75.
- KITTOLAB. aksessert 2009. *Ethanol Precipitation of DNA* [Online]. Austin: The University of Texas at Austin. Tilgjengelig fra: <http://kitto.cm.utexas.edu/research/Kittolabpage/Protocols/Microbiology/ethanolPpt.html> [Aksessert 11.09 2009].

- KJÆRNSLI, M., LIE, S., OLSEN, R. V. og ROE, A. 2007. *TID FOR TUNGE LØFT - Norske elevers kompetanse i naturfag, lesing og matematikk i PISA 2006*, Oslo, Universitetsforlaget.
- KRISTENSEN, T. aksessert 2010. *DNA sekvensering* [Online]. Store Norske leksikon. Tilgjengelig fra: <http://www.snl.no/DNA/dNA-sekvensering> [Aksessert 25.05 2010].
- KUNNSKAPSDEPARTEMENTET 2005. Realfag naturligvis - strategi for styrkning av realfagene 2002 - 2007.
- KUNNSKAPSDEPARTEMENTET. 2010a. *Hovudområde* [Online]. Oslo: Undervisningsdepartementet. Tilgjengelig fra: <http://www.udir.no/grep/Lareplan/?laereplanid=170703&visning=2> [Aksessert 24.02 2010].
- KUNNSKAPSDEPARTEMENTET. 2010b. *Læreplan i biologi - programfag i studiespesialiserende utdanningsprogram* [Online]. Oslo: Utdanningsdirektoratet. Tilgjengelig fra: <http://www.udir.no/grep/Lareplan/?laereplanid=170703&visning=5&sortering=2&km sid=170715> [Aksessert 23.03 2010].
- KUNNSKAPSDEPARTEMENTET. 2010c. *Læreplan i biologi - programfag i studiespesialiserende utdanningsprogram* [Online]. Oslo: Utdanningsdirektoratet. Tilgjengelig fra: <http://www.udir.no/grep/Lareplan/?laereplanid=170703&visning=5&sortering=2&km sid=170714> [Aksessert 23.02 2010].
- KUNNSKAPSDEPARTEMENTET. 2010d. *Læreplan i naturfag - formål* [Online]. Oslo: Utdanningsdirektoratet. Tilgjengelig fra: <http://www.udir.no/grep/Lareplan/?laereplanid=117461> [Aksessert 23.02 2010].
- KUNNSKAPSDEPARTEMENTET. 2010e. *Læreplan i naturfag - Hovedområde* [Online]. Tilgjengelig fra: <http://www.udir.no/grep/Lareplan/?laereplanid=117461&visning=2> [Aksessert 20.02 2010].
- KUNNSKAPSDEPARTEMENTET 2010f. Realfag for framtida - strategi for styrkning av realfag og teknologi 2010-2014.
- KVALE, S., BRINKMANN, S., ANDERSSEN, T. M. og RYGGE, J. 2009. *Det kvalitative forskningsintervju*, Oslo, Gyldendal akademisk.
- LEDERMAN, N. G. 2007. *Handbook of research on science education*, Mahwah, N.J., Lawrence Erlbaum Associates.
- MEADE, H. M., LONG, S. R., RUVKUN, G. B., BROWN, S. E. og AUSUBEL, F. M. 1982. Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis. *J. Bacteriol.*, 149, s. 114-122.

- PANJA, S., AICH, P., JANA, B. og BASU, T. 2008. How does plasmid DNA penetrate cell membranes in artificial transformation process of *Escherichia coli*? *Mol Membr Biol.*, 5, s. 11.
- PATRIARCA, E. J., TATÈ, R. og IACCARINO, M. 2002. Key Role of Bacterial NH<sub>4</sub><sup>+</sup> Metabolism in Rhizobium-Plant Symbiosis *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66, s. 203-222.
- PAUL, M. J., PRIMAVESI, L. F., JHURREEA, D. og ZHANG, Y. 2008. Trehalose Metabolism and Signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 59, s. 417-441.
- PISA. 2010. *PISA - en internasjonal undersøkelse av elevferdigheter* [Online]. Oslo: Universitetet i Oslo. Tilgjengelig fra: <http://www.pisa.no/> [Aksessert 26.02 2010].
- POSTHOLM, M. B. 2010. *Kvalitativ metode: en innføring med fokus på fenomenologi, etnografi og kasusstudier*, Oslo, Universitetsforl.
- PREUSSLAB, T. aksessert 2009. *Alkaline Lysis Mini-Prep* [Online]. Tilgjengelig fra: <http://preuss.bsd.uchicago.edu/index3.html?content=protocols/protocols.html> [Aksessert 16.10 2009].
- SAMBROOK, J. og RUSSELL, D. W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SCIENCE, M. 2007. *MP Science* [Online]. Tilgjengelig fra: [http://images.google.no/imgres?imgurl=http://www.mpsciences.com/images/pcr\\_reagents.jpg&imgrefurl=http://www.mpsciences.com/index-3.html&usq=\\_\\_w0n2S1\\_J4Ho2dpvbNAHsZg6sVks=&h=389&w=550&sz=69&hl=no&start=33&um=1&itbs=1&tbnid=Zb4p1dlRtXghQM:&tbnh=94&tbnw=133&prev=/images%3Fq%3DPCR%26start%3D21%26um%3D1%26hl%3Dno%26client%3Dfirefox-a%26sa%3DN%26rls%3Dorg.mozilla:nb-NO:official%26ndsp%3D21%26tbs%3Disch:1](http://images.google.no/imgres?imgurl=http://www.mpsciences.com/images/pcr_reagents.jpg&imgrefurl=http://www.mpsciences.com/index-3.html&usq=__w0n2S1_J4Ho2dpvbNAHsZg6sVks=&h=389&w=550&sz=69&hl=no&start=33&um=1&itbs=1&tbnid=Zb4p1dlRtXghQM:&tbnh=94&tbnw=133&prev=/images%3Fq%3DPCR%26start%3D21%26um%3D1%26hl%3Dno%26client%3Dfirefox-a%26sa%3DN%26rls%3Dorg.mozilla:nb-NO:official%26ndsp%3D21%26tbs%3Disch:1) [Aksessert 26.02 2010].
- SIMON, R., PRIEFER, U. og PUHLER, A. 1983. A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. *Nat Biotech*, 1, s. 784-791.
- SNYDER, L. og CHAMPNESS, W. 2007. *Molecular genetics of bacteria*, Washington D.C., ASM Press.
- THESEN, J. 2004. *Normalitesett fra allmennlegekontoret* [Online]. Tilgjengelig fra: [http://images.google.no/imgres?imgurl=http://www.uib.no/isf/utposten/2004nr5/fingeravtrykk.jpg&imgrefurl=http://www.uib.no/isf/utposten/2004nr5/utp04511.htm&usq=\\_tXQNjyAB-BQH4jChYnLKDGhtoeQ=&h=256&w=200&sz=25&hl=no&start=6&um=1&itbs=1&tbnid=c\\_I0NCMukw\\_25M:&tbnh=111&tbnw=87&prev=/images%3Fq%3Dfingeraavtrykk%26um%3D1%26hl%3Dno%26client%3Dfirefox-a%26sa%3DN%26rls%3Dorg.mozilla:nb-NO:official%26tbs%3Disch:1](http://images.google.no/imgres?imgurl=http://www.uib.no/isf/utposten/2004nr5/fingeravtrykk.jpg&imgrefurl=http://www.uib.no/isf/utposten/2004nr5/utp04511.htm&usq=_tXQNjyAB-BQH4jChYnLKDGhtoeQ=&h=256&w=200&sz=25&hl=no&start=6&um=1&itbs=1&tbnid=c_I0NCMukw_25M:&tbnh=111&tbnw=87&prev=/images%3Fq%3Dfingeraavtrykk%26um%3D1%26hl%3Dno%26client%3Dfirefox-a%26sa%3DN%26rls%3Dorg.mozilla:nb-NO:official%26tbs%3Disch:1) [Aksessert 01.03 2010].

- TIMSS. 2006a. *Hva er TIMSS* [Online]. Oslo: Universitetet i Oslo. Tilgjengelig fra: [http://www.timss.no/timss05\\_om.html](http://www.timss.no/timss05_om.html) [Aksessert 26.02. 2010].
- TIMSS. 2006b. *TIMSS i forhold til PISA* [Online]. Oslo: Universitetet i Oslo. Tilgjengelig fra: [http://www.timss.no/timss05\\_vs\\_pisa.html](http://www.timss.no/timss05_vs_pisa.html) [Aksessert 26.02 2010].
- TØNJUM, T. Aksessert 2009. *Virus (SML-artikkel)* [Online]. Store norske leksikon. Tilgjengelig fra: [http://www.snl.no/sml\\_artikkel/virus](http://www.snl.no/sml_artikkel/virus) [Aksessert 23.02 2010].
- WIKIPEDIA. 2006. *Gel electrophoresis* [Online]. Tilgjengelig fra: [http://images.google.no/imgres?imgurl=http://en.wikivisual.com/images/e/ec/AgaroseGel.jpg&imgrefurl=http://en.wikivisual.com/index.php/Gel\\_electrophoresis&usq=mX5LWZDrknraa\\_Y5OJ5KBKxG0h4=&h=403&w=484&sz=47&hl=no&start=9&um=1&itbs=1&tbnid=ckLMk0rnQRm0LM:&tbnh=107&tbnw=129&prev=/images%3Fq%3Dgel%2Belektroforese%26um%3D1%26hl%3Dno%26client%3Dfirefox-a%26hs%3DINT%26sa%3DG%26rls%3Dorg.mozilla:nb-NO:official%26tbs%3Disch:1](http://images.google.no/imgres?imgurl=http://en.wikivisual.com/images/e/ec/AgaroseGel.jpg&imgrefurl=http://en.wikivisual.com/index.php/Gel_electrophoresis&usq=mX5LWZDrknraa_Y5OJ5KBKxG0h4=&h=403&w=484&sz=47&hl=no&start=9&um=1&itbs=1&tbnid=ckLMk0rnQRm0LM:&tbnh=107&tbnw=129&prev=/images%3Fq%3Dgel%2Belektroforese%26um%3D1%26hl%3Dno%26client%3Dfirefox-a%26hs%3DINT%26sa%3DG%26rls%3Dorg.mozilla:nb-NO:official%26tbs%3Disch:1) [Aksessert 15.02 2010].
- AASLAND, R. 2000. *Nukleotider i DNA og RNA* [Online]. Tilgjengelig fra: <http://images.google.no/imgres?imgurl=http://gensidene.uib.no/bilder/nukleotid.gif&imgrefurl=http://gensidene.uib.no/nukleotid.html&usq=vYfWQylo6sZGNWqiX2w2PpPfh5A=&h=195&w=233&sz=5&hl=no&start=2&um=1&itbs=1&tbnid=g0HLehbH6Ha3iM:&tbnh=91&tbnw=109&prev=/images%3Fq%3Dnukleotid%26um%3D1%26hl%3Dno%26client%3Dfirefox-a%26sa%3DG%26rls%3Dorg.mozilla:nb-NO:official%26tbs%3Disch:1> [Aksessert 23.02 2010].





## Appendiks

### 1. Prosedyrer

#### 1.2 Prosedyre for plasmidopprensning fra *E.coli*

1. Dyrk en flytende kultur med ønsket plasmid.
2. 1,5 ml cellekultur flyttes over til ett eppendorfrør og sentrifugeres ved maks hastighet i ca. 1 minutt, fjern supernatanten.
3. Resuspender bakteriepelleten i 100 µl av iskald lyseløsning, bestående av 50 mM glukose, 25 mM TrisCoCl (pH 8) og 10mM EDTA (pH 8), ved vorteksing. 1 µl RNase A tilsettes for nedbryting av RNA. La løsningen stå på is i noen minutter.
4. Tilsett 200 µl av iskald alkalisk SDS løsning, bestående av 0,2 M NaOH og 1% SDS. Vend tubene raskt fem ganger slik at hele overflaten på tuben kommer i kontakt med løsningen. La løsningen stå i noen minutter på is.
5. Tilsett 150 µl av iskald 5M natriumacetat med konsentrert eddiksyre. Vortex tuben forsiktig i en invertert posisjon i ca. 10 sekunder for å blande løsningen. La løsningen stå på is i 3-5 minutter.
6. Sentrifuger ved 12.000 xg i 5 minutter ved 4 °C og overfør supernatanten til et nytt friskt eppendorfrør.
7. Fell ut dobbeltrådig DNA ved å tilsette 0,6 ganger volumet isopropanoal ved romtemperatur. Miks ved vortexing. La løsningen stå i 2 minutter ved rom temperatur.
8. Sentrifuger ved 12.000 xg i 15 minutter ved 4°C.
9. Fjern supernatanten ved forsiktig aspirering. Sett eppendorfrørene opp ned på ett papir for å få vesken til å renne bort. Fjern alle dråper som er festet til veggen i røret.
10. Rens pelleten bestående dobbeltrådig DNA med 1 ml 70% etanol ved 4°C. Fjern supernatanten ved sentrifugering som beskrevet over, og la pelleten med nukleinsyre lufttørke i 10 minutter. Løs så pelleten i sterilt vann i passende mengde.

(Preusslab, aksessert 2009)

#### 1.2 Klargjøring av RNase A

Bland RNase A i konsentrasjon 10mg/ml i 0,01 M natriumacetat pH. 5,2. Varm opp til 100 °C i 15 minutt. Kjøøl i romtemperatur. Tilpass pH ved å tilsatte 0,1 volum av 1M Tris-Cl (pH 7,4). Lages ved -20°C. (Sambrook & Russell, 2001)

### 1.3 Prosedyre DNA utfelling med etanol

Denne prosedyren kan benyttes for å konsentrere DNA eller som siste rensessteg ved DNA ekstraksjon.

1. Overfør DNA til en beholder.
2. Tilsett 1/10 volum av 3M natrium acetat buffer (jevner ione konsentrasjonen).
3. Tilsett minst to volum av iskald 100 % etanol, og la stå i  $-20^{\circ}\text{C}$  i minst en time.
4. Sentrifuger prøvene i 15 minutter ved høyeste hastighet ved  $4^{\circ}\text{C}$  i en sentrifuge. Fjern supernatant.
5. Tilsett 200  $\mu\text{l}$  iskald 70 % etanol, sentrifuger i 5 minutter ved  $4^{\circ}\text{C}$ .
6. Fjern supernatanten, og evaporer vekk resten av etanolen i ett  $37^{\circ}\text{C}$  vannbad.
7. Resuspender pellet i en passende mengde vann eller TE-buffer.

(Kittolab, aksessert 2009)

### 1.4 Prosedyre for DNA ekstraksjons med fenol/kloroform

1. Tilsett ett volum av fenol/kloroform 1:1 miks. Miks innholdet til en emulsjon dannes ved lett rotering (ca. 20rpm).
2. Sentrifuger 3 min ved 1600g eller 15 sekunder i en eppendorfsentrifuge ved romtemperatur. Ved dårlig separasjon kan en sentrifugere lengre tid ved høyere hastighet.
3. Bruk en pipette og overfør øverste lag av vannfasen til en frisk tube.
4. Tilsett ett volum kloroform (24:1 (v/v) miks av kloroform og isoamyl alkohol) og gjenta steg 2, 3 og 4.
5. Rens så opp DNA ved "DNA utfelling med etanol"

(Sambrook & Russell, 2001)

### 1.5 Prosedyre for restriksjonskutt:

Ved restriksjonskutt kreves riktige restriksjons seter i DNA for å få resultat. Tabell 22 Tabell 22 viser et mulig oppsett av restriksjonskutt. Mengden restriksjonsenzym må reguleres etter konsentrasjon av produktet. (Sambrook & Russell, 2001)

1. Bland ingrediensene i tabell 22
2. Inkuber løsningen ved  $37^{\circ}\text{C}$  i ca. 1 time.

Tabell 22 Ingredienser for restriksjonskutt

Ingrediens	Mengde (total volum 50 µl)
Plasmid	3000 ng
Restriksjonsenzym	1,5 µl <i>EcoRI</i> og/eller 3 µl <i>KpnI</i>
Buffer tilpasset restriksjonsenzym	5 µl
10xBSA buffer	5 µl
dH <sub>2</sub> O	Opp til 50 µl

### 1.6 Prosedyre for agarose gel elektroforese

1. 0,4 gram agarose veies ut og blandet i 50ml 1xTEA buffer
2. Løsningen varmes opp til den koker og all agarosen er smeltet (ingen synlige korn i løsningen). Løsningen kjøles til den kan berøres med bare hender.
3. En gelstøpeform med kam gjøres klar.
4. 1 µl Ethidium bromid settes som en dråpe i gelstøpeformen.
5. Agarose-bufferblandingen helles over. Gelstøpeformen beveges lett slik at etidium bromiden blandes i resten av løsningen. Løsningen står i ca. 30 minutter til den har stivnet.
6. Gelen overføres og monteres i gel elektroforesekar, og kammen fjernes.
7. Prøvene tilsettes i brønner og gelen kjøres ved 70 V i ca. en time. Tiden avhenger av hva hvilke prøver som kjøres og mengden agarose i gelen.

### 1.7 Prosedyre for PCR

1. Komponentene fra tabell 23 blandes i PCR rør. Husk negativ kontroll som ikke inneholder templat.
2. Prøvene settes i en PCR maskin og programmet i tabell 24 kjøres.

Tabell 23. PCR reagenser for oppkopiering av et lite område fra *thuR* på pApa7023

Reagenser	Mengde
DNA templat	5ng
dNTP	10 mM for hver av basene
Forward primer	0,5 µl
Reverse primer	0,5 µl
10x Dynazym buffer	5 µl
Dynazym polymerase	1 µl
dH <sub>2</sub> O	Opptil 50 µl
MgCl (stabiliserer reaksjonen)	Reguleres fra 0,4-4 mM

Tabell 24. PCR program for oppkopiering av et mindre fragment fra *thuR*.

Steg	Temperatur	Tid
1. Initiering	95 °C	5 minutter
2. Denaturering	92 °C	30 sekunder
3. Annealing	60 °C	30 sekunder
4. Elongering	72 °C	30 sekunder
Repeter steg 2-4 29 ganger		
6. Avslutning	72 °C	5 minutter
7. Pause/lagring	8 °C	∞

PCR miks og program varier ut fra type program og templat en benytter. I store deler av dette studiet ble disse oppsettene fulgt.

### 1.8 Prosedyre for defosforylering med CIP

1. Tilsett til DNA: 5 µl 10x CIP buffer, og opp til 48µl med dH<sub>2</sub>O
2. Tilsett en passende mengde CIP. En enhet CIP er definert som den mengden av enzymer som hydrolyserer 1µmol –nitrofenylfosfat til p- nitrofenol i et total reaksjonsvolum på 1ml i 1 minutt ved 37°C i 1 M diethanolamine-HCl (pH 9,8) med 0,5 mM MgCl<sub>2</sub> aog 10 mM p-nitrophenylphosphate. (disse forholdene er bare brukt for å kvantifisere enzymaktivitet).
3. Inkuber reaksjon i 60 minutter ved 37°C.
4. CIP inaktiveres ved tilsetting av SDS og EDTA (pH 8,0) til en sluttkonsentrasjon av 0,5% og 5mM. Løsningen mikses godt og tilsettes proteinkinase K til den totale konsentrasjon på 100µg/ml. Dette inkuberes 30 minutter ved 56°C. Proteinkinase K inaktiverer CIP.
5. Plasmidet renses så opp ved fenol:kloroform ekstraksjon.

(Sambrook & Russell, 2001)

### 1.9 Prosedyre for ligering

1. Bland følgende reaksjonsmikser:

Lineært vektor DNA (kuttet plasmid)	20-100 ng
Innsettings DNA (PCR kloningsreaksjon)	1:1 til 5:1
	Molar ratio over vektor
10X T4 DNA ligase Buffer	2 µl
T4 DNA ligase	1 U (en enhet)
dH <sub>2</sub> O	Opp til 20µl

2. Inkuber 10-60 minutter ved 22°C
3. Varme inaktiver ved 65°C i 10 minutter eller ved 70°C i 5 minutter
4. Bruk opp til 5 µl av miksen for transformering av 50µl kjemokompetente celler eller 1-2 µl per 50 µl av elektrokompetente celler.

(Fermentas, 2010)

### 1.10 Prosedyre for å danne elektrokompetente celler

1. Start en 10 ml flytende kultur ved at en koloni blandes ut i 10 ml LB-medium og inkuber over natt.

2. Inkuber 1 liter LB-medium med 1/100 volum frisk kultur.
  3. La cellene vokse ved 37°C med risting til en OD<sub>600</sub> (OD med bølgelengde 600nm) på 0,5 til 0,7 (de beste resultatene fås når cellene er høstet ved tidlig- til midt-lag fase da cellene er i aktiv vekst)
  4. For høsting, kjøøl flaksen på is i 15 til 30 minutter, og sentrifuger i en kald rotor ved 4000xg i 15 minutter.
  5. Fjern supernatanten. Resuspender pelleten i totalt 1 liter av iskald steril 10% glycerol. Sentrifuger ved 4°C, 4000x g i 15 minutter
  6. Resuspender pellet i 0,5 liter av iskald steril 10 % glyserol. Sentrifuger som i punkt 5.
  7. Resuspender pellet i 20 ml iskald steril 10 % glyserol. Sentrifuger som i punkt 5.
  8. Resuspender pellet til totalt volum av 2 til 3 ml i iskald 10 % glyserol.
- For lagring, frys cellene i -80°C. (Controller)

### 1.11 Prosedyre for elektroporering

1. Ca. 10-15 ng av DNA tilsettes rør med elektrokompetente celler og blandes forsiktig.
2. Løsningen overføres til en 0,1 cm kyvette. Pass på at løsningen fyller hele bunnen i kyvetten slik at strømmen kan passere gjennom.
3. Prøvene elektroporerer ved bruk av elektroporator (Bio-Rad Gene Pulser). Elektroporeringen skjer ved 2,5 V, 200OHMS og 25µFD.
4. Tilsett 800µl S.O.C. medium til kyvetten og overfør hele løsningen til et eppendorf rør.
5. Plasser rørene på risting (200rpm) i 1 time ved 37°C.
6. 2 x 40 µl av hvert rør spres så ut på seleksjonsplater. Resten av bakteriekulturen spinnes ned og supernatanten fjernes. Pelleten spres på seleksjonsplater. Platene inkuberes ved 37°C over natt. Videre lagring skjer ved 4°C.

### 1.12 Prosedyre for dannelsen av kjemokompetente celler

1. Start en 5 ml flytende kultur og inkuber over natt.
2. Inkuber 100 ml LB-medium med 1/100 volum frisk kultur i en 1 liters kolbe.
3. La cellene vokse ved 37°C med risting til en OD<sub>600</sub> på 0,2 til 0,4 (tidlig lag fase). 90 – 180 minutter avhengig av stamme.
4. Samle cellene ved sentrifugering 5000 x g i 5 minutter ved 4 °C. Hold cellene å is i alle følgende steg.

5. Resuspender cellene 1/2 kulturvolum av 0,1 M iskald CaCl<sub>2</sub>. Hold cellene på is i minst 30 minutter, helst 1-2 timer.
6. Sentrifuger som steg 4 og resuspender de forsiktig i 1/10 kulturvolum 0,1 M iskald CaCl<sub>2</sub>.
7. Kompetente celler kan bli lagret over lengre tid ved å tilsette iskald steril glyserol til en sluttkonsentrasjon av 10 %. Mix og la de stå på is i 30 min, så lagre de ved – 80°C.  
Cellene fordeles i rør med totalt cellevolum på 0,1 ml.

(Ehrlich, 1979)

### 1.13 Prosedyre for “heat shock”

1. For å transformere, miks 0,1 ml av kjemokompetente celler med DNA (1-10 ng). La de stå på is i 10-30 minutter.
2. ”Heat shock” behandle dem ved 42°C i 2 minutter.
3. Tilsett 0,9 ml av LB og inkuber de ved 37°C på risting i 20-60 minutt før utplating.
4. 2 x 40 µl av hvert rør spres så ut på seleksjonsplater. Resten av bakteriekulturen spinnes ned og supernatanten fjernes. Pelleten spres på seleksjonsplater. Platene inkuberes ved 37°C over natt. Videre lagring skjer ved 4°C

(Ehrlich, 1979)

### 1.14 Prosedyre for testing av innsatte fragment

- 1 Rens opp plasmid fra transformantene med plasmidrensing
- 2 Lag et restriksjonskutt med de aktuelle restriksjonsenzymene
- 3 Kjør en gel for å visualisere små bånd som tilsvarer størrelse til det innsatte fragmentet  
Kjør en PCR med samme primere som ble brukt under oppkopiering av fragmentet ved samme PCR program.
- 4 Kjør agarose gel elektroforese av PCR produkt, og sammenlign størrelse med fragmentets størrelse, samt fra restriksjonskutt.

### 1.15 Prosedyre for konjugasjon mellom *S. meliloti* og *E.coli* transformant

1. En flytende *S.meliloti* kultur startes to dager før og en flytende kultur startes en dag i før. Kulturene dyrkes i 20 ml TY Str<sup>250</sup> medium ved 27 °C og 250rpm risting.
2. En flytende *E.coli* kultur startes en dag før. *E.coli* dyrkes i (20 ml) LB med 50 µg/ml kanamycin medium ved 37 °C og 225 rpm risting.
3. OD (optisk tetthet) ved bølgelengde 600 nm måles for hver av kulturene. Kulturene skal ha en OD<sub>600</sub> mellom 0,250 – 0,450.

4. Dersom OD<sub>600</sub> er over 0,450 startes en ny 10 ml kultur med samme medium, bestående av 9 ml frisk medium og 1 ml bakterie kultur.
5. Avhengig av bakterie stammer inkuberes denne i 2 -5 timer til ønsket OD<sub>600</sub> er oppnådd.
6. Ved oppnådd OD<sub>600</sub> overføres 1,5 ml av hver av kulturene til eppendorfrør og spinnes ned ved 1000 xg i 10 minutter.
7. Supernatant fjernes, og pelles resuspenderes i 1 ml 0,9 % NaCl. Kulturen sentrifugeres som i steg 6
8. Steg 7 gjentas.
9. Supernatant fjernes og pellet resuspenderes i 1ml 0,9 % NaCl.
10. Ett filterpapir legges på en TY agarplate, og 100µl av hvert rør overføres til hver sin agarplate med tilhørende filter. En tredje plate tilsettes en 1:1 miks av *S.meliloti* og *E.coli*. Platene inkuberes i 12-24 timer ved 27°C.
11. Filterpapirene vortexes i 5 ml vann. Løsningen fortynnes til 10x og 100x fortynning og plates ut på TY Str<sup>500</sup>Km<sup>100</sup> seleksjonsplater.
12. Etter 3-5 dager plukkes kolonier og spres ut på nye seleksjonsplater.(Gerhardt et al., 1994)  
Koloniene kan plukkes ved replica plating og overføres til forskjellig seleksjonsplater.  
Disse platene innkuberes på nytt til kolonier vokser opp og kan analyseres direkte eller videre behandles.

(Gerhardt et al., 1994)

### 1.16 Prosedyre for replika plating med stoff

1. Klipp ut et stoff i ett kvadrat med sidene 20 cm og autoklaver. Stoffet må være stort nok til at det kan festes på en sylinder kaldt replika block. Replika block har en omkrets som er omtrent like stor som en petriskål innvendig. Tøy biten festes på replika block med en ring som er litt større i omkrets en selve replika blocken.
2. Tillat de muterte cellene som skal testes å vokse i generelt næringsmedium
3. Når koloniene har nådd en størrelse på ca. 3mm i diameter replikeres de til minimal medium. Her en M9 minimalmedie med stp<sup>500</sup> og Km<sup>100</sup>, samt enten glukose eller trehalose benyttet (inkl. noen vitaminer). De replikeres også til en generell næringsagar som TY medium. Orienteringen må merkes på platene for at kolonimønstre skal kunne sammenlignes senere.
4. Inkuber platene under optimale vekstforhold til bakterien, og når koloniene har vokst opp sammenlignes koloniene på de ulike mediene.



- Plukk ut kolonier som skiller seg ut med en steril tannpirker og isoler for videre analyser. Koloniene fra replika plating kan eksempelvis testes ved PCR for søking etter innsatt fragment.

(Gerhardt et al., 1994)

### 1.17 Prosedyre for replika plating med overføringsplate

- Autoklaver overføringsplaten, og trykk platen lett mot en ny agarplate med generelt medium. Dette gir mønstret til overføringsplaten synlig på den nye agarplaten.
- Overfør utvalgte kolonier over til den nye agarplaten, og plasser de etter mønsteret fra overføringsplaten.
- Når koloniene er overført inkuberes platen tilpasset bakterietypen
- Når koloniene er 2-3mm i diameter kan de overføres ved replika plating.
- Overføringsplaten orienteres slik at den plukker med seg alle koloniene.
- Overføringsplaten trykkes så lett over på seleksjonsplater, 2-3 stykker. Inkuber platene til koloniene har vokst opp. Koloniene fra replika plating kan sammenlignes mellom ulike medier, men også testes ved PCR for søking etter innsatt fragment.

(Gerhardt et al., 1994)

### 1.18 Prosedyre DNA sekvensering

DNA sekvensering ble utført med BigDye v3.1 Cycle Sequencing Kit

- Ingrediensene i tabell 25 blandes sammen i PCR rør
- Rørene plasseres i en PCR maskin og kjøres på program gitt i tabell 26.
- Etter PCR kjøring sendes prøvene til et sekvenseringslaboratorium. Når resultatene er ferdige benyttes analyse software til analyse av sekvensene, eksempelvis aligning for å sjekke slektskap mellom gener.

**Tabell 25. Ingredienser til DNA sekvensering**

Ingrediens	Mengde
DNA templat	5-20 ng
Sekvenseringsbuffer	3 µl
Primer	3,2 nmol
BigDye v3.1	2 µl
dH <sub>2</sub> O	Opp til 20 µl

Tabell 26. PCR program for sekvenseringsreaksjon

Steg	Temperatur	Tid
1. Initiering	96°C	5 min
2. Denaturering	96°C	10 sek
3. Annealing	55°C	5 sek
4. Elongering	60°C	4 min
Tilbake til steg 2, 24 ganger		
6. Pause	4°C	For alltid

### 1.19 Prosedyre for å lage vekstkurve blant mutanter og vildtype *S.meliloti*.

1. Start en kultur til hver av mutantene og vildtypen i flytende TY med Km<sup>50</sup> og Stp<sup>250</sup>.
2. Når kulturene har kommet i stasjonærphase (OD<sub>600</sub> på ca 2-2,5) renses 1 ml av hver kultur opp og vaskes i M9 salter. Vaskingen gjøres ved å spinne cellene ned ved 1000xg i 10 minutter, supernatant fjernes og cellene resuspenderes i M9 salter. Dette steget gjentas en gang.
3. 40 µl av de vaskede cellene tilsettes 4 ml av M9 minimalmedie med tilsatt vitaminer, stp<sup>250</sup>, Km<sup>50</sup> og karbonkilde. Karbonkildene er glukose og trehalose. Hver kultur med tilhørende karbonkilde lages i tre eksemplarer.
4. Kulturene inkuberes ved 27°C på risting (ca 250 rpm), og første OD<sub>600</sub> – måling gjøres etter ca. 12 timer.
5. De neste målingene gjøres med ca. åtte timers mellomrom. Målingene forsetter til kulturene er i stasjonærphase.
6. Målingene plottes i et diagram og kulturenes vekstkurve sammenlignes.

## 2 Undersøkelse i biologididaktikk

Under ligger de skriftlige spørreundersøkelsene benyttet i dette prosjektet. Ikke alle spørsmålene er benyttet videre ved analyse.

### 2.1 Elevskjema

**Undersøkelsen vil bli brukt kun i sammenheng med masteroppgave i biologididaktikk.**

Det er frivillig deltakelse på undersøkelsen og en kan trekke sitt samtykke til deltakelse, uten nærmere begrunnelse, før og undervegs i undersøkelsen. All informasjon som blir gitt her vil bli anonymisert, og alle data som er brukt vil bli slettet ved prosjekt slutt 1.juni 2010. Dersom det er spørsmål kan disse stilles til meg, Silje Jørgensen, på e-post [silje\\_joergensen@hotmail.com](mailto:silje_joergensen@hotmail.com)

Fornavn:

(Dersom du ikke vil oppgi ditt fornavn kan du lage ett alias som du heretter bruker i undersøkelsen, ved muntlige utsagn er det fint at du gir beskjed om alias slik at jeg noterer ut fra dette)

Hvorfor valgte du biologi som en av studiespesialisering?

---

---

Har du andre realfag, eventuelt hvilke?

---

---

Hva ønsker du å studere videre når du er ferdig på videregående og hvorfor?

---

---

Hvilke temaer/Hva synes du er vanskelig i biologi? Merk av de tre vanskeligste med tallene 1-3, hvor 1 er vanskeligst.

- |   |  |   |                                       |
|---|--|---|---------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Cellebiologi       | <input type="checkbox"/> Fysiologien til mennesket | <input type="checkbox"/> funksjon og tilpassing av organismer |                                       |
| <input type="checkbox"/> Biologisk mangfold | <input type="checkbox"/> Energiomsetning           | <input type="checkbox"/> Genetikk                             | <input type="checkbox"/> Bioteknologi |
| <input type="checkbox"/> Økologi            | <input type="checkbox"/> Evolusjon                 | <input type="checkbox"/> andre                                |                                       |

Dersom du svarer andre, eventuelt vil tilføye gjøres det her

---

---

Hvorfor synes du temaene fra spørsmålet over er vanskelig?

---

---

Hvilke studievaner har du i biologi? Kryss av en eller flere.

- Leser pensum til timene    Gjør oppgaver    Forbereder meg aldri    Andre

- Skriver labrapporter       Tar notater i timene    Skriver notater når jeg leser biologi

Dersom du svarer ”andre” kan du utdype dette her:

---

---

Hva gjør deg motivert i ett fag?

---

---

Hvilken undervisningsform lærer du mest av?

- Læreren foreleser    Oppgaver    Selvstudie    Lab    Gruppearbeid/prosjektarbeid  
 Andre

Dersom du svarer ”andre” kan du utdype dette her:

---

---

Hvilke forventinger har du til besøket ved universitetet?

---

---

## 2.2 Lærerskjema

Undersøkelsen vil bli brukt kun i sammenheng med masteroppgave i biologididaktikk. Det er frivillig deltakelse på undersøkelsen og en kan trekke sitt samtykke til deltakelse, uten nærmere begrunnelse, før og undervegs i undersøkelsen. All informasjon som blir gitt her vil bli anonymisert, og alle data som er brukt vil bli slettet ved prosjekt slutt 1.juni 2010. Dersom det er spørsmål kan disse stilles til meg, Silje Jørgensen, på e-post [silje\\_joergensen@hotmail.com](mailto:silje_joergensen@hotmail.com)

Hvilken grunn var det til at du ble biologilærer?

---

---

Har du andre fag som støtter opp om faget biologi?

---

---

Hvorfor tror du elever tar biologi som studiespesialisering (majoriteten)?

---

---

Hvilke temaer/Hva synes du er vanskelig i biologi?

---

---

Hvorfor er dette vanskelig?

---

---

Hvilke temaer i biologi synes du har en ekstra utfordring når det gjelder planlegging og gjennomføring av undervisning?

---

---

Hva gjør elevene motivert i faget?

---

---

Hva kan du gjøre for å få elevene motiverte?

---

---

Hvordan kan du tilrettelegge for best mulig læringsutbytte for elevene?

---

---

Hvilke forventninger har du til besøket ved universitetet?

---

---

Hva tror du universitetet kan bidra med i undervisningen i biologi?

---

---

### 3. Kompendium til universitetsbesøk

## LABORATORIEDEL

### GENETISK FINGERA VTRYKK

#### Innbrudd på Universitetet

Døren fløy opp og inn stormet to personer ikledd mørke klær. Begge hadde på seg hetter, den ene var ca. 180 cm høy og spe kroppsbygning, den andre var litt lavere og mer kompakt. Ansiktet hadde begge godt skjult. De var raske. De hadde ett mål, en perm med ferske svært verdifulle forskningsdokumenter. De brøt opp døra med ett brekkjern for å komme seg inn på kontoret hvor dokumentet befant seg. Merkelig nok stoppet den ene raneren opp og holdt seg for nesen som om det skulle være en fryktelig odør i rommet. Han nøs. Han tørket hånden sin på et papir som lå på kontorpulten før han snudde og slo følge med den andre ransmannen ut.

Dette viste overvåkningskameraet fra Universitetet i Tromsø fredag den 29. januar da to menn tok seg inn på avdeling for Biologi og målrettet hentet ut verdifulle forskningsdokumenter. Overvåkningsbildene var for dårlige til å kunne identifisere ransmennene, men bevis på etterlatt DNA kan være nøkkelen til å få løst saken. Blodspor på døren kan indikere at en av de mistenkte skadet seg i det de skulle bryte opp døren, og en etterlot et papir etter ett nys. Noen vitner som var i området samme tidsrom har også avgitt vitneforklaring, og politiet har dermed tre mistenkte som er under etterforskning.

#### Hensikt:

Denne øvelsen skal demonstrere hvordan genetiske fingeravtrykk kan benyttes til oppklaring av kriminalsaker. Her vil også relevante metoder som PCR og gel elektroforese benyttes. Det vil være av betydning å forstå metodenes relevans, samt deres sammenheng med konserverte områder (sekvenser) av DNA (deoksyribonukleinsyre). Hensikten er dermed å gjøre greie for framstillingen av genetiske fingeravtrykk, og hvordan de kan brukes i rettsmedisin og i studium av slektskap mellom individer og grupper av organismer.

I denne øvelsen skal 5 prøver DNA analyseres. To av prøvene er tatt fra en hypotetisk ”Crime-scene” (åsted) og 3 av prøvene er hentet fra såkalte ”mistenkte”.

## Teori kort oppsummert.

Polymerase Chain Reaction (PCR) er en metode som kan benyttes for å kopiere opp DNA til større mengder. Dette er nødvendig for å kunne analysere DNA prøver fra eksempelvis et åsted. PCR kan også benyttes til å kopiere opp bestemte deler av DNA (fragmenter) og bevarte (konserverte) sekvenser av DNA. Prinsippet bak denne metoden går ut på at sekvensene er bevart, men har endret seg i antall og plassering i alle individers DNA. Dette medfører at antallet sekvenser, og lengden på sekvensene vil være forskjellig fra individ til individ. (Grønnlien et al., 2008)

Prinsippet bak PCR bygger til dels på samme konsept som DNA-kopiering i cellen, men reguleres også ved temperatur for å hjelpe reaksjonen. PCR består av tre hovedsteg:

- Denaturering hvor hydrogenbindingene mellom to komplementære DNA-tråder brytes.
- Annealing hvor enkle DNA-tråder binder primere (korte DNA fragmenter som fungerer som startpunkt for forlengelses fasen)
- Elongering (forlenging) hvor DNA-polymeraser bygger opp en ny dobbeltrådig DNA ved hjelp av en gammeltråd som templat, nukleotider og primere.

Ved bruk av gel elektroforese vil en agarose gel separere DNA-fragmentene etter størrelse. Prinsippet er bygd på DNAets negative ladning, som fører til at DNA-fragmentene vil vandre fra negativ til positiv pol i elektroforesekaret (Darnell et al., 1999). Agarosen danner et nettverk av polymerer (molekyler) som hindrer fragmentene i å vandre raskt gjennom gelen. Jo mindre et fragment er, jo raskere vil det vandre i gelen grunnet mindre motstand av agarosen. De minste fragmentene vandrer lengst og de lengste fragmentene kortest.

De overnevnte metodene benyttes for å lage et genetisk fingeravtrykk. Prinsippet ligger i at hver enkelt person har et unikt DNA. Alle DNA vil inneholde en eller flere eksemplarer av en spesiell type bevarte DNA sekvens. Ut fra fordelingen av og lengden på sekvensene vil PCR danne fragmenter med ulik størrelse og antall. Dette vil danne forskjellige mønstre ved gel elektroforese. Disse mønstrene kan sammenlignes mellom DNA tatt fra åsted og mistenkte, og på denne måten kan en konstatere om disse tilhører samme person. DNA materialet kan



hentes fra blod, hår, vev, sæd etc. DNA analysene kan også hentes fra tørt materiale, som inntørket blod, eller mumifisert vev (Grønnlien et al., 2008).

For å bedre forståelsen kan disse nettsidene være til hjelp:

<http://www.viten.no/?pcr> (animasjon av PCR)

<http://www.maxanim.com/genetics/PCR/PCR.htm> (animasjon av PCR)

<http://www.tvdsb.on.ca/westmin/science/sbioac/genetics/electro.htm> (animasjon av gel elektroforese)

<http://www.sumanasinc.com/webcontent/animations/content/gelectrophoresis.html>

(animasjon av gel elektroforese)

## Utstyr:

### PCR

dNTP (deoksynukleotid trifosfat)

Forward primer

Reverse primer

Buffer

DNA polymerase

dH<sub>2</sub>O (vann)

Pipetter

Pipettespisser

### Gel kjøring

Gel elektroforese form

Kar

Kam

TBE-buffer

Agarose

Etidium bromid

Loading dye

Markør

## Framgangsmåte

### Del 1. Innføring i pipettebruk

Først en liten introduksjon til bruk av pipetter. Det er svært viktig å være nøye ved bruk av pipetter. Alle pipettene har et målområde, og dersom dere stiller den utenfor dette området kan dette føre til at pipetten blir ødelagt (en pipetter er dyr! Så vær forsiktig).

En pipette har også to hakk når dere trykker ned. Når dere skal suge opp en bestemt (forhåndsinnstilt mengde) væske skal det trykkes til første hakk. Når dere så skal tømme pipetten trykkes helt ned til andre hakk for å tømme den helt. Dersom dere trykker til andre hakk når dere fyller pipetten vil det gå væske inn i systemet, og den kan ødelegges. I tillegg vil dere ikke få riktig angitt mengde.

I denne øvelsen skal vi bruke pipetter, og vi skal pipettere veldig små volumer. Dette krever en spesiell pipette-teknikk;

1. Innstill ønsket volum. NB: Ikke still inn et volum utenfor pipettens område. Det kan ødelegge pipetten.
2. Sett på pipettespiss. Trykk den fast ved å trykke enden på pipetten lett ned i pipette spissen.
3. For å suge opp innhold i pipetten trykkes knappen på toppen til *første stopp*.
4. Stikk pipettespissen ned i væsken og sug langsomt inn.
5. Ta opp pipetten.
6. Se etter at den inneholder væske, og at det ikke henger væske på utsiden.
7. Sett pipettespissen ned i eppendorfrøret. Hold det mot rørveggen
8. Trykk knappen ned til *andre stopp*.
9. Ta ut pipetten. Se etter at væsken henger igjen i røret, og ikke henger igjen på pipettespissen.
10. Væskedråpene i røret kan sentrifugeres til bunns, eller bruke knipsing for å samle væsken. Væskedråpene i røret kan blandes ved forsiktig pipettering opp og ned. NB! Pass på at det ikke suges opp væske dersom du har trykt pipetten ned til *andre stopp*!
11. Nå kan dere prøve å pipettere følgende mengder  
0,5 µl, 1 µl, 5 µl, 15 µl  
Følg med på hvor store mengder som er i pipettespissen slik at dere senere kan gjenkjenne om mengden væske er riktig.

## **Del 2. Polymerase Chain Reaction**

### **Reagens Pr. PCR rør**

0,5 µl dNTP

0,5 µl Forward primer (Merket med p1)

0,5 µl Reverse primer (Merket med p2)

3,5 µl Buffer

1 µl DNA polymerase (merket med pol)

13 µl dH<sub>2</sub>O

1 µl DNA

**Tilsammen 20 µl**

1. Finn fram ett tomt PCR rør og merk de med samme nr. som står på DNA analyseprøven i is boksen. Prøve 4 og 5 er tatt fra åstedet. Merkingen av rørene er svært viktig å få rett, slik at rett gjerningsmann blir tatt.
2. Ha riktig mengde av reagensene fra PCR oppskriften i hvert av de 4 PCR rørene. Hold rørene på is.
3. Pipetter forsiktig litt opp og ned slik at løsningen blandes godt.
4. Sett rørene i PCR maskinen og kjør prøvene på følgende program:
  1. Initiering: 95 °C, 7 min
  2. Denaturering: 94 °C, 1 min
  3. Annealing: 52 °C, 1 min
  4. Elongation: 65 °C, 8 min, tilbake til punkt 2, 30 ganger
  5. Endelig elongering: 65 °C, 16 min
  6. Pause: 8 °C for alltid.
5. Tilsett 3 µl 6xLoading dye til de ferdige PCR rørene.
6. Tilsett DNA ladder og PCR prøvene i hver sine brønner på agarose gelen. Se del 3.
7. Kjør ved 80V ca. 75 minutter.
8. Ta bilde av gel og forsøk å finne de skyldige.

### **Del 3. Gel elektroforese**

#### **Støping av agarose gel**

1. Vei opp 1,5 gram agarose og bland dette med 100 ml 1x TBE buffer.
2. Varm løsningen opp til den begynner å koke (mikrobølgeovn ~2 minutter).
3. Hell litt av gelen i gelstøpeformen. Tilsett 1 µl Ethidium bromid.
4. Hell resten av gelen i gelstøpeformen. Beveg forsiktig på støpeformen slik at Ethidium bromiden fordeler seg godt. **NB! Ethidium bromid er kreftframkallende og kan være svært irriterende ved kontakt med øyne, hud, slimhinner og pusterør. Brukt derfor hansker ved handtering av gelen. Gravide skal ikke utføre dette arbeid.**
5. La gelen stivne og monter den så i gel elektroforese karet.

## Bakgrunnsteori for genetisk fingeravtrykk

Læreplanmål:

*”gjere greie for framstilling av genetiske fingeravtrykk, og korleis dei kan brukast i rettsmedisin og i studium av slektskap mellom individ og grupper av organismar”*

(Grønnlien et al., 2008)

### Definisjon:

Bioteknologi innbærer metoder som bruker levende celler til å produsere et ønsket produkt. Produktet kan være mat, medisin og andre kjemikalier. Avl er den tidligste formen for bioteknologi, hvor en parrer to maker med ønskede egenskaper for med større sannsynlighet å oppnå ønsket egenskap (Grønnlien et al., 2008).

Genteknologi innbærer bruk av teknikker hvor arvestoffet isoleres, karakteriseres, modifiseres og så settes inn i levende celler eller virus. Mest brukte arvestoffet er DNA (deoksynukleinsyre). DNA sees på som universelt arvestoff, og har også den samme oppbygningen i de fleste organismer (Grønnlien et al., 2008). Et eksempel på unntak fra DNA som arvestoff er noen virus som benyttes RNA (ribonukleinsyre) som arvestoff (Tønjum, Aksessert 2009).

### Metoder:

Bioteknologiske metoder er ofte arbeid med svært små mengder, for eksempel DNA som ikke er synlig for det blotte øye. Dette krever svært høy nøyaktighet av de som benytter disse metodene (Grønnlien et al., 2008).



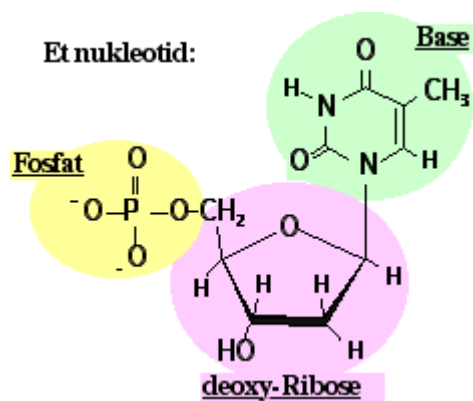
**Figur 29** DNA danner en spiral. Lånt fra MP Science (Science, 2007)

## Polymerase Chain Reaction (PCR)

For å kunne jobbe med DNA kreves større mengder av DNAet. For å kopiere opp DNAet finnes i dag en metode som kalles Polymerase Chain Reaction (PCR).

Prinsippet i PCR bygger på DNA replikasjon som fins naturlig i cellen ved kopiering av cellens DNA før celledeling. DNA polymerase, deoksyribonukleotider (dNTP som fungerer som byggesteiner), primere, buffer og PCR maskin trengs i tillegg til DNAet som skal kopieres (Grønnli et al., 2008).

DNA polymerasen fungerer slik som den gjør i cellen, ved at det fester en ny nukleotid til en allerede eksisterende nukleotids frie OH-ende. DNA-polymerasen bruker en ”gammel” DNA tråd som templat (oppskrift) slik at rett nukleotid festes. DNA-polymerasen oppgave er altså bygging av en ny DNA-tråd (Grønnli et al., 2008).



**Figur 30.** Et nukleotid består av en fosfatgruppe, en sukkergruppe (i DNA deoksyribose), og en base. Basen kan enten være adenin, cytosin, guanin, eller tymin. Lånt fra Aasland (Aasland, 2000, Grønmo & Onstad, 2009b)

Deoksyribonukleotider er byggestein i DNA, og er molekyler bestående av en fosfatgruppe, en sukkergruppe (deoksyribose i DNA), og en base. I DNA er det fire forskjellige baser: Adenin, Cytosin, Tymin eller Guanin. Disse basene koder for gener som gir opphav til for eksempel proteiner i cellen (Aasland, 2000). Det er derfor svært viktig at rekkefølgen av basene blir riktig, ettersom riktig kombinasjon kreves for at proteinet skal bli satt sammen til et fungerende protein.

Primere er et kort DNA fragment som er komplementær (lik) endene på DNA-tråden som skal kopieres. Disse korte DNA sekvensene er viktig for at DNA-polymerasen skal kunne starte forlengingsprosessen av den nye DNA-tråden. Primerne festes til komplementære områder på DNAet ved hydrogenbindinger, og forlengingsprosessen kan starte. Selve festingen av primerne til DNA-tråden skjer når temperaturen senkes.

En buffer er en løsning som består både av en syre og en base som holder pHen i løsningen stabil selv om det tilsettes/produseres syrer eller baser i en reaksjon. Dette gjør at miljøet under en PCR vil være konstant. Dette er svært viktig da samme reaksjonen blir gjentatt

mange ganger for å få et høyt antall DNA kopier. Ofte tilsettes vann også for å øke reaksjonsvolumet.

PCR maskin er en maskin hvor en på forhånd kan stille inn temperaturer intervaller som skal gjentas under kopiering av DNA.

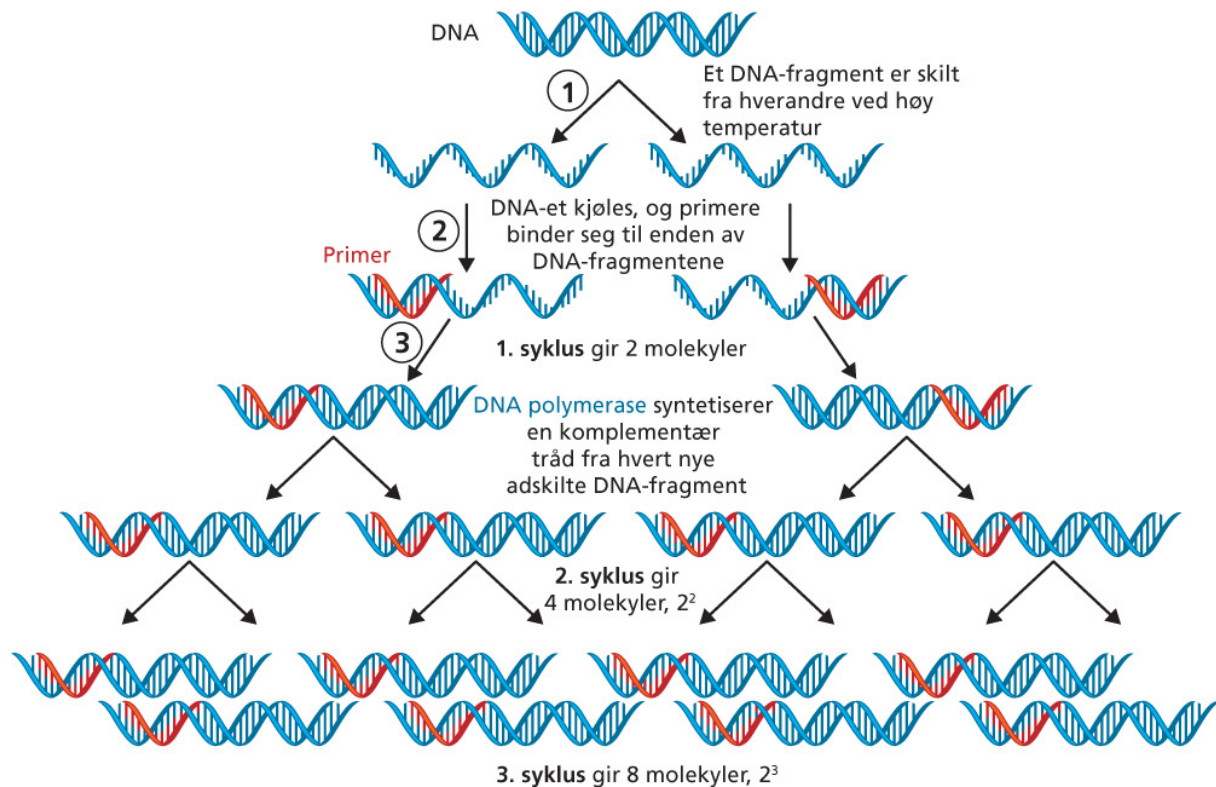
PCR starter med oppvarming av reaksjonen til temperatur på 94-98°C i ca. 5 minutter. Dette gjøres for at hele reaksjonsvolumet skal økes i temperatur, enzymer aktiveres og klargjøres for reaksjon. Etter dette steget starter hovedstegene i PCR, disse stegene gjentas normalt 25-35 ganger (sykluser). Antall kopier DNA øker eksponentielt i en PCR, noe som betyr at antall kopier dobles fra en runde til neste (Grønnlien et al., 2008, Sambrook & Russell, 2001).

Første hovedsteg er denaturering som består av oppvarming av DNA templat til 94-98°C i 20-30 sekunder. Denatureringen gjør at dobbeltrådig DNA splittes og danner singel trådig DNA. Hydrogenbindingene som holder sammen de to komplementære DNA trådene blir ustabil og brytes. Ofte er ca. 30 sekunder tilstrekkelig til komplett denaturering (Grønnlien et al., 2008, Sambrook & Russell, 2001).

Andre hovedsteg er annealing og temperaturen senkes til 50-65°C i 20-40 sekunder. Her dannes det hydrogenbinding mellom komplementære deler av DNA og primer. Når primerne har bundet templatet, fester DNA polymerasen til primer-templat komplekset og begynner DNA-syntese. For å unngå at primere danner hybrider med hverandre er mengden primere større enn mengden komplementært DNA (Grønnlien et al., 2008, Sambrook & Russell, 2001).

Tredje og siste hovedsteg er elongering og temperaturen tilpasses DNA-polymerasen. Temperaturen som brukes er normalt litt under optima temperaturen for DNA polymerasen som brukes. Temperatur optima er den temperaturen DNA-polymerasen arbeider best ved. Her syntetiserer DNA polymerasen en ny DNA tråd som er komplementær til DNA templatets tråd ved å feste dNTPs som er komplementær til templatet. dNTP festes i 5' til 3' retning. Varigheten til dette steget er avhengig av lengden til DNAet som kopieres, og 1 minutt pr. 1000 basepar er normalt tilstrekkelig (Gerhardt et al., 1994).

Etter siste forlengingssteg er det normalt og holde temperaturen rundt 70-74 °C i 5-15 minutter etter siste PCR syklus for å forsikre at alle de siste enkelt-trådig DNA er forlenget. Deretter er det amplifiserte DNAet lagret ved 4-15 °C dersom resultatet skal lagres.



**Figur 31. Polymerase Chain Reaction.** 1. Første hovedsteg er denaturering og skiller to DNA tråder fra hverandre ved høy temperatur. 2. Andre hovedsteg er annealing, og temperaturen senkes og primerne binder seg til komplementære sekvenser av DNAet. 3. tredje hovedsteg er forlenging, og det dannes nye DNA tråder ved hjelp av DNA polymerase og nukleotider, samt andre reagenter. De tre hovedstegene blir gjentatt 25-35 ganger normalt for å oppnå en høy konsentrasjon. (Gyldendal, 2008)

## Gel elektroforese

Gel elektroforese er en metode som benyttes for analyse av DNA. Metoden benytter en gel, et gel elektroforesekar og en spenningskilde. Under gel elektroforese skilles DNA eller RNA fragmenter etter størrelse. DNA eller RNA fragmentene som kjøres på gelen kan for eksempel være produkter fra polymerase chain reaction, PCR. (Grønnlien et al., 2008)

Bufferen som er i gel elektroforesekarret leder strøm ettersom den blant annet inneholder salter. Av den grunn til at DNA og RNA er negativt ladd vil små fragmenter av DNA og RNA vandre fra negativt mot positiv pol i ett spenningsfelt. Gelen som benyttes lages av agarose

som er en type sukker. Tillagingen av agarose gel er blanding av agarose og buffer som kokes, og når løsningen kjøles stivner den. Agarosen gir motstand til DNA/RNA fragmentene i vandringen fra negativ til positiv pol, og større fragmenter vil dermed møte mer motstand enn små fragmenter. Dette gjør at små DNA eller RNA fragmenter vandrer lengre enn større fragmenter. (Grønlien et al., 2008)

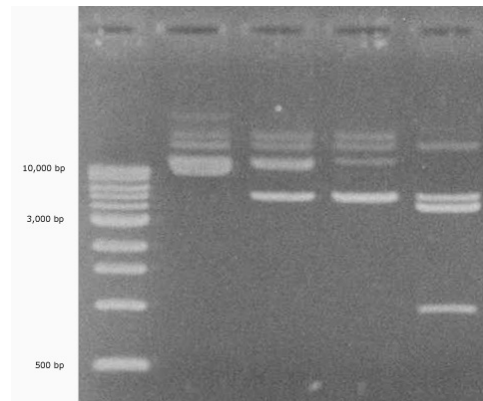
## Genetisk Fingeravtrykk

Genetisk fingeravtrykk er identisk for en hver person på samme måte som ett vanlig fingeravtrykk fra fingeren. Fra biologisk materiale som hudceller, hår, blod og lignende kan en profil lages som kalles genetisk fingeravtrykk.

For fremkalle et genetisk fingeravtrykk fra biologisk materiale må først DNA isoleres. Små bevarte sekvenser av det isolerte DNAet kopieres opp ved PCR. Etersom de bevarte sekvensene av DNAet finnes i ulikt antall, og er fordelt ulikt utover DNA fra individ til individ, vil PCR av disse sekvensene gi ulikt antall DNA fragmenter som varierer i lengden. Disse fragmentene skilles så ved bruk av gel elektroforese, og dette er individets genetiske fingeravtrykk. Relaterte organismer har ofte genetiske fingeravtrykk som ligner, men ikke er identiske.



**Figur 33.** Fingeravtrykk fra fingeren og genetisk fingeravtrykk er like spesielt. Lånt fra Thesen (THESEN, 2004, Kjærnsli et al., 2007)



**Figur 32.** Genetisk fingeravtrykk kan sammenlignes for å finne ut hvem sitt DNA som er funnet på eksempelvis et åsted. Lånt fra wikipedia(Wikipedia, 2006, Kjærnsli et al., 2007)