



BIO-3906

MASTERGRADSOPPGAVE I BIOLOGI

LEKTORUTDANNING I REALFAG

Undervisning i bioteknologi

-muligheter og utfordringer

Bjørn Sjøttem Nyborg

Desember, 2008

DET MATEMATISK-NATURVITENSKAPELIGE FAKULTET

Institutt for biologi

DET SAMFUNNSVITENSKAPLIGE FAKULTET

Institutt for pedagogikk og lærerutdanning

Universitetet i Tromsø

BIO – 3906

MASTERGRADSOPPGAVE I BIOLOGI

Undervisning i bioteknologi

– MULIGHETER OG UTFORDRINGER

Bjørn Sjøttem Nyborg

Desember, 2008

Innholdsfortegnelse

Forord	s. 7
Sammendrag	s. 9
1. Teori	s. 11
1.1 Naturfagdidaktisk teoribakgrunn	s. 11
1.1.1 Internasjonale undersøkelser	s. 11
1.1.2 Realfagssatsing og kunnskapsløftet	s. 14
1.1.3 Læreplanene i naturfag og biologi	s. 15
1.1.4 Læringsteori	s. 17
1.1.5 Motivasjon	s. 20
1.1.6 Naturfag i Norge	s. 20
1.1.7 Problemstilling	s. 22
1.2 Biologisk teoribakgrunn	s. 23
1.2.1 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> og <i>Sinorhizobium meliloti</i>	s. 23
1.2.2 Trehalose	s. 24
1.2.3 <i>thuA</i> og <i>thuB</i>	s. 24
2. Material og metoder	s. 27
2.1 Materiale	s. 27
2.2 Laboratorietekniske metoder	s. 31
2.2.1 Transformering	s. 31
2.2.2 Transformering av <i>E. coli</i>	s. 31
2.2.3 Prosedyre for ligering av PCR produkt inn i TOPO vektor	s. 33
2.2.4 Prosedyre for transformering av TOPO vektor inn i <i>E. coli</i>	s. 33
2.2.5 Tillaging av rifampicinresistente <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	s. 34
2.2.6 Prosedyre for tillaging av rifampicin resistente <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	s. 34
2.2.7 Transformering av <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	s. 34
2.2.8 Prosedyre for transformering av <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	s. 35
2.2.9 Plasmidrensing	s. 36
2.2.10 Prosedyre for plasmidrensing fra <i>E. coli</i>	s. 37
2.2.11 Opprensing av genomisk DNA	s. 37
2.2.12 Prosedyre for rensing av genomisk DNA fra <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	s. 37
2.2.13 Bestemmelse av DNA konsentrasjon	s. 38
2.2.14 Kutting av DNA med restriksjonsenzymmer	s. 39
2.2.15 Prosedyre restriksjonskutt	s. 39

2.2.16	Gel elektroforese	s. 40
2.2.17	Prosedyre gel elektroforese	s. 41
2.2.18	Polymerase Chain Reaction	s. 41
2.2.19	Prosedyre for PCR reaksjon	s. 45
2.2.20	DNA sekvensering	s. 45
2.2.21	Prosedyre for sekvenseringsreaksjon	s. 46
2.3	Samfunnsvitenskaplige metoder	s. 49
2.3.1	Kvalitativ og kvantitativ forskning	s. 49
2.3.2	Case-studie	s. 50
2.3.3	Kvalitativt forskningsintervju	s. 51
2.3.4	Observasjon	s. 52
2.3.5	Gjennomføring av elevbesøk	s. 53
3.	Resultater	s. 57
3.1	Resultater fra laboratoriearbeidet	s. 57
3.1.1	Transformering av <i>A. tumefaciens</i>	s. 57
3.1.2	Karakterisering av <i>palB</i> fragment	s. 62
3.2	Resultater fra det didaktiske arbeidet	s. 69
3.2.1	Intervju av lærere	s. 69
3.2.2	Elevbesøket	s. 71
4.	Diskusjon	s. 77
4.1	Diskusjon av laboratorieresultatene	s. 77
4.1.1	Transformering av <i>A. tumefaciens</i>	s. 77
4.1.2	Karakterisering av <i>palB</i>	s. 78
4.2	Diskusjon av det didaktiske arbeidet	s. 79
4.2.1	Diskusjon av lærerintervju	s. 79
4.2.2	Diskusjon av elevbesøk	s. 81
4.3	Avslutning	s. 83
4.3.1	Perspektiver	s. 83
4.3.2	Svar på problemstilling	s. 87
5.	Referanser	s. 89

Forord

Lektor i realfag er en femårig masterutdanning med integrert praktisk pedagogikk. Mine fordypningsfag har vært biologi og kjemi. Masteroppgaven er på 30 studiepoeng, og skal både ha et faglig og fagdidaktisk fokus. Min oppgave er skrevet over 4,5 travle høstmåneder ved Institutt for biologi, og har et biologifaglig og -didaktisk fokus. Vektleggingen av disse to aspektene er i utgangspunktet fri, og jeg har valgt å ha en mer eller mindre lik fordeling mellom didaktikk og fag i denne oppgaven.

Hvordan jeg endte opp med en realfaglig utdanning er ikke godt å si, det var ikke realfag som var planen i min tidligere skolegang. Det var først da jeg begynte på universitetet at denne interessen virkelig våknet, og siden dette har det gått slag i slag. Det er merkelig å tenke på at det er over fem år siden starten på min studenttilværelse. Årene som har gått og fagene jeg har hatt har både vært krevende og tøffe, men også spennende og lærerike.

Jeg vil først og fremst takke mine to veiledere John Beck Jensen og Hans-Georg Köller. John for trygg og god veiledning i de biologifaglige tema, samt støtte og råd i det daglige arbeidet. Hans-Georg for alle gode innspill og hjelp i de mange didaktiske problemstillinger. Takk til dere begge for å ta imot meg som masterstudent!

En stor takk til alle på Naturfagsbygget for all hjelp jeg har fått og ikke minst et trivelig arbeidsmiljø.

Takk til mamma, pappa og Maria for uvurderlig og god hjelp til korrekturlesing av oppgaven.

Til sist vil jeg takke min kjære Ida, for alle de tingene som du gjør.

Tromsø, Desember 2008

Bjørn Sjøttem Nyborg

Sammendrag

Innenfor feltene biokjemi, genetikk og mikrobiologi har det de siste tjue årene vært en rask utvikling av nye metoder i takt med den teknologiske utviklingen, og disse metodene utgjør det vi kaller for bioteknologi.

Bioteknologi inngår som målområder i læreplanen både for grunnutdanningen og videregående opplæring. Som følge av den raske utviklingen av feltet har derfor skolene en spesiell utfordring når det gjelder å gi en oppdatert og tidsriktig undervisning innenfor tema. Særlig når det gjelder utstyr til praktisk undervisning kan det være vanskelig for skolene å følge med på utviklingen, da utstyr innenfor bioteknologi ofte er svært kostbart, og krever god lærerkompetanse.

Formålet med denne oppgaven er å undersøke hvordan man best kan undervise bioteknologi i skolen. Dette ble gjort gjennom først å grundig sette seg inn i aktuelle bioteknologiske metoder gjennom arbeid med bakterien *A. tumefaciens*. Genene *palA* og *palB* hos *A. tumefaciens* har homologi med genene *thuA* og *thuB* hos *S. meliloti*. For å undersøke om disse genene har samme funksjon i de to organismene ble derfor *palB* forsøkt slått ut hos *A. tumefaciens* ved hjelp av homolog rekombinasjon. Under arbeidet oppstod det problemer med karakterisering av *palB* ved hjelp av PCR og sekvensering, og derfor man fikk vanskeligheter med å karakterisere transformanter. Årsakene til disse problemene blir i oppgaven foreslått å være sekundærstrukturdannelse i *palB*. Arbeidet med *A. tumefaciens* og *palB* ga grundig innføring i en rekke bioteknologiske metoder.

Gjennom intervjuer med lærere fra to ulike videregående skoler kommer det i oppgaven fram to ulike tilnærminger i bioteknologiundervisning. Den ene skolen prioriterte å holde undervisningen på skolen, mens den andre prioriterte samarbeid med universitet. For å undersøke fordeler og ulemper ved universitetsbesøk ble det derfor arrangert et undervisningsopplegg for elever i videregående skole, der metoder fra arbeidet med *A. tumefaciens* ble dratt inn. Opplegget ble gjennomført som en øvelse i genetisk fingeravtrykk, hvor metodene *polymerase chain reaction* og *gel elektroforese* ble gjennomført. Responsen fra elevene etter opplegget var svært god, og i oppgaven argumenteres det derfor for bruk av universitetsbesøk som supplement til skoleundervisning i bioteknologi.

1. Teori

1.1 Naturfagdidaktisk teoribakgrunn

Debatt om hvordan naturfag bør undervises og naturfagundervisningens kvalitet i norsk skole har alltid pågått. Tidligere hadde man imidlertid svært lite dokumentasjon, og argumentene baserte seg stort sett omkring enkle og subjektive observasjoner (Bungum mfl 2005). Dette gjaldt fram til midten av 1980-tallet, hvor Norge litt etter litt ble med i internasjonale skolesammenligninger gjennom Second International Science Study (SISS) og utover 1990-tallet, The Third International Mathematics and Science Study (TIMSS) og Programme for International Student Assessment (PISA) (Bungum mfl 2005). Disse undersøkelsene har gitt oss et bilde av norsk skole som mindre god enn forventet, og har ført til en rekke tiltak og endringer i skolens læreplaner. Spesielt regnes tidligere kunnskapsminister Kristin Clemet som den store brukeren av data fra internasjonale undersøkelser (Bungum mfl 2005). Jeg presenterer i det følgende kort hovedfunnene fra internasjonale undersøkelser og grep som er foretatt i norsk skole på bakgrunn av disse de seneste år. Jeg vil også presentere læringsteorier som er relevant for undervisning i naturfag.

1.1.1 Internasjonale undersøkelser

TIMSS er et forskningsprosjekt igangsatt av International Association for the Evaluation of Educational Achievement (IEA) og utføres i Norge av Enhet for kvantitative utdanningsanalyser (EKVA) ved Institutt for lærerutdanning og skoleutvikling (ILS) ved Universitetet i Oslo (TIMSS 2008). Prosjektet tar for seg å beskrive ulike aspekter ved realfagene i skolen, på systemnivå, i klasserommet og på elevnivå hos elever i barne, ungdom og videregående skole (Bungum mfl 2005). TIMSS er en læreplanbasert undersøkelse. I dette ligger det at det viktigste kriteriet for oppgavene som brukes er at de skal være relevant i forhold til det som undervises i majoriteten av deltakerlandene (TIMSS 2008).

PISA er også et stort internasjonalt prosjekt, men denne undersøkelsen er i regi av Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD). Også i denne undersøkelsen er det ILS som er ansvarlig for gjennomføringen i Norge. PISA tar sikte på å måle 15-åringers kompetanse i lesing, matematikk og naturfag og gjennomføres hvert tredje år med ulik vekt på de tre områdene (PISA 2008). Hensikten med undersøkelsen er å utrede i hvilken grad elever som har fullført obligatorisk skolegang har tilstrekkelig kunnskap og ferdigheter for å kunne ta aktiv del av samfunnet (Bungum mfl 2005). Disse målene er utarbeidet på politisk plan, da politikere ønsker å vite om skolesystemet forbereder elevene til samfunnets utfordringer. Dette betyr at PISA til

forskjell fra TIMSS undersøkelsen ikke tar hensyn til læreplanene i sin utforming av oppgaver, men heller hva som er politisk vedtatt som nødvendig kunnskap og erfaringer for framtiden (Bungum mfl 2005).

TIMSS og PISA har til felles at de begge er store forskningsprosjekter og inkluderer en rekke land og mange tusen elever. Begge testene kan dokumentere god utarbeidelse av oppgaver og grundig behandling av innhentet materiale (Bungum mfl 2005). Omfanget av resultater fra disse undersøkelsene er stort, og jeg vil her nøye meg med å trekke fram hovedfunnene og parallellene mellom de to undersøkelsene innenfor naturfag og biologi. Disse resultatene er hentet fra PISA rapporten "Tid for tunge løft" (Kjærnsli mfl 2007) og TIMSS rapporten "Hva i all verden har skjedd i realfagene?" (Grønmo mfl 2004).

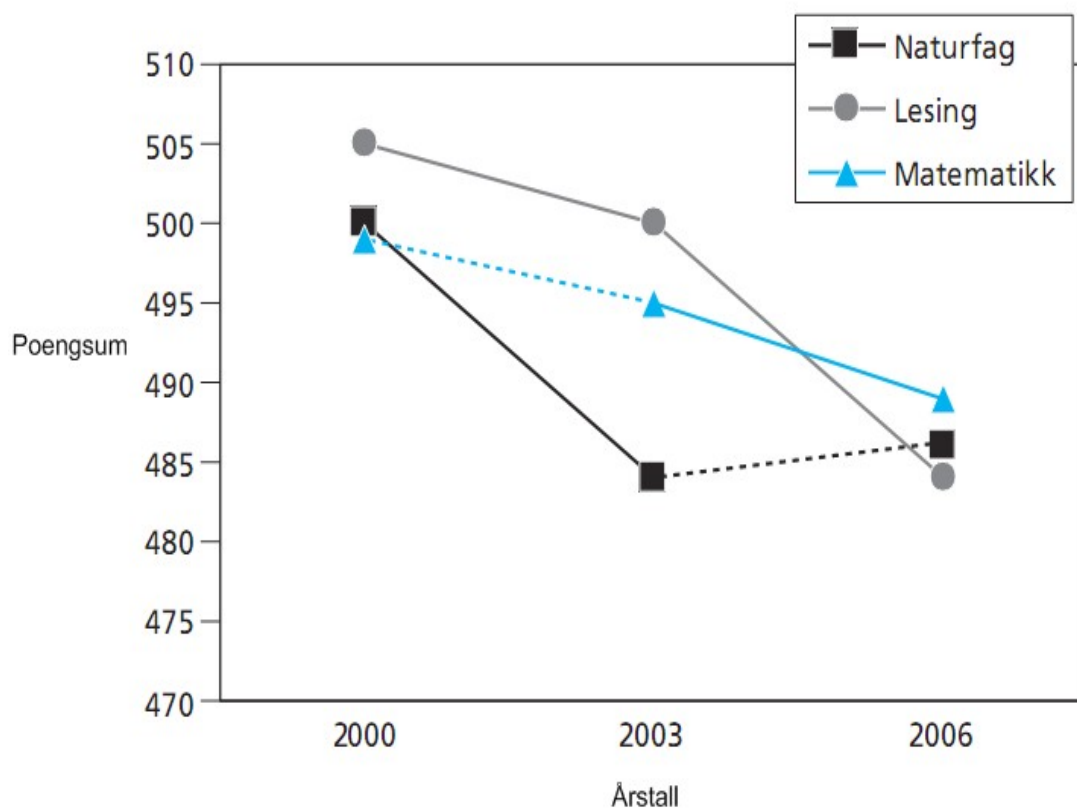
Mye er sagt om hvordan Norge bør gjøre det i forhold til gjennomsnittet av landene i disse internasjonale undersøkelsene, og det har vært mye diskusjon rundt resultatene Norge har oppnådd. Mange har ment at de norske resultatene er for dårlige i forhold til det man kan forvente i et rikt land som vårt. Jeg lar denne diskusjonen ligge, og vil her fokusere kort på trendene som har kommet fram i lyset etter flere år med disse undersøkelsene.

Om vi starter med TIMSS rapporten 2004 kommer det fram at norske elever har hatt en signifikant tilbakegang i naturfagskåre mellom 1995 og 2003. For åttendeklassingene oppsummerer rapporten trenden i utviklingen innenfor naturfag med at Norge er et av de landene som har hatt størst tilbakegang i naturfag. For norske elever svarer tilbakegangen omtrent til 6 måneders undervisningstid i 2003 sammenlignet med år 1995 (Grønmo mfl 2004).

Det vil si at for åttendeklassingene anno 2003 har et halvt år undervisning i naturfag "forsvunnet" i forhold til elevene på 1995 kullet. For fjerdeklassingene synes utviklingen å gå enda brattere nedover. Her ligger tilbakegangen til Norske elever langt foran andre land i undersøkelsen, og fjerdeklassingene anno 2003 ligger et helt år etter fjerdeklassingene anno 1995 (Grønmo mfl 2004). Vi ser altså at uavhengig av hvordan vi vurderer norske eleveres resultater i forhold til gjennomsnitt av deltakerland kan vi si at kunnskapsnivået hos norske elever mellom 1995 og 2003 er synkende ifølge TIMSS (Grønmo mfl 2004).

PISA resultatene årene 2000 – 2006 forteller om en lignende trend. I årene 2000 – 2003 har nedgangen i naturfag vært særdeles bemerkelsesverdig, mens det i årene 2003 – 2006 har vært en svak økning i naturfagskåre (Kjærnsli mfl 2007). Sammenligningen 2003 – 2006 er imidlertid noe

problematisk, da rammeverket for undersøkelsen er forandret noe og at det har vært en bevist senking av krav til leseferdighet i naturfagsoppgavene. Trenden over hele perioden er allikevel ikke til å ta feil av, i perioden 2000 – 2006 har norske 15-åringers kunnskapsnivå i naturfag vært synkende (se figur 1) (Kjærnsli mfl 2007).



Figur 1. Norske elevers kunnskapsnivå i de ulike PISA fagene over tid. Naturfagsutviklingen i svart viser en kraftig nedgang i perioden 2000 – 2003 og en svak oppgang 2003 – 2006. Sammenlagt over perioden er allikevel trenden nedadgående. Linjen mellom 2003 – 2006 er stiptet fordi rammeverket i denne perioden er noe forandret (hentet fra Kjærnsli mfl 2007:27).

TIMSS og PISA undersøker i tillegg til elevenes kunnskaper også hyppighet og utbytte av ulike undervisningsformer. TIMSS 2003 konkluderer med at eksperimentell undervisning er mindre vanlig i Norge sammenlignet med andre land. Det påvises også at mange lærere benytter denne arbeidsformen sjeldnere enn de selv ønsker. Et flertall av lærerne i undersøkelsen mener at denne typen arbeid er for tidkrevende i forhold til timetallet i faget. En annen faktor er at lærere oppfatter sin egen manglende kunnskap som hinder for god eksperimentell undervisning (Grønmo mfl 2004).

1.1.2 Realfagssatsing og kunnskapsløftet

Som en reaksjon på Norges resultater i undersøkelsene PISA og TIMSS og realfagenes dårlige rekrutteringsevne ved høyere utdanninger, ble strategiplanen "Realfag, naturligvis – strategi for styrking av realfagene 2002-2007" lansert i 2002 (Kunnskapsdepartementet 2006a). Denne planen tar sikte på å heve realfagenes status, øke rekrutteringen til fagfeltet og bedre kvaliteten både i grunnopplæringen og høyere utdanning (Kunnskapsdepartementet 2006a).

For å oppnå dette dannet man en mengde ulike målsettinger, og disse målsettingene ble i 2005 vurdert. Blant målene er krav om realfag for å begynne på alle naturvitenskaplige studier ved universitetene i Norge. Dette er senere vedtatt og gjelder siden 2005. I tillegg finner man at forskningsformidling rettet mot barn, unge og allmennhet skal inngå som pliktarbeid i forskerutdanningen (Kunnskapsdepartementet 2006a). De relativt nye didaktiske mastergradene i realfag ved høyskoler og universitet er også direkte resultat av realfagssatsingen. Vi ser altså at departementet, blant mange andre tiltak, ønsker å involvere universitetene i realfagrekrutteringen. Andre tiltak som har blitt iverksatt er dannelsen av Naturfagsenteret i 2003, ved Universitetet i Oslo. Oppgavene til Naturfagsenteret er å øke motivasjon for naturfag hos elever og lærere, gjennom samarbeid mellom universiteter, høyskoler, museer, vitensentra, skoleverk, læremiddelprodusenter og næringsliv (Kunnskapsdepartementet 2006a). Det har her blant annet blitt dannet demonstrasjonslaboratorium for naturfagene hvor elever kan komme å gjøre forsøk på laboratorie.

Resultater fra de internasjonale undersøkelsene inngikk også i begrunnelsen for "Kunnskapsløftet" som nå er den gjeldende reformen i grunnskole og videregående opplæring. Reformen representerte en endring i skolens innhold, struktur og organisering. Blant annet ble det utarbeidet nye læreplaner, som er gjennomgående for hele grunnopplæringen. Disse læreplanene har tydeligere mål for elevers og lærlingers kompetanse. I tillegg kom det nye fag og endret timefordeling inn i skolen (Kunnskapsdepartementet 2006b). Målet med kunnskapsløftet er at "alle elever skal utvikle grunnleggende ferdigheter og kompetanse for å kunne ta aktivt del i kunnskapssamfunnet" (Kunnskapsdepartementet 2006b:<http://www.regjeringen.no/nb/dep/kd/tema/Grunnopplaring/kunnskapsloeftet.html?id=1411>). Som vi ser ligger denne begrunnelsen tett opp mot begrunnelsen for utvelgelsen av oppgaver i PISA undersøkelsen. Kunnskapsløftet ble satt ut i livet i august 2006.

1.1.3 Læreplanene i naturfag og biologi

I Norge er biologi en del av faget naturfag i hele grunnskolen (1-10 trinn) og første år ved videregående skole. Etter dette må elever som ønsker å fortsette med faget velge studieretningsfagene Biologi 1 og 2 (Kunnskapsdepartementet 2008e). I det følgende ønsker jeg å belyse de målområdene som omhandler praktiske arbeidsformer i biologi, og da spesielt bioteknologi.

Læreplanene i naturfag og biologi forteller at kunnskap om naturvitenskapelig arbeidsmåte og tenkning er tema helt fra første år i skolen. Under hovedmålet "forskerspiren" som gjelder gjennom hele grunnskolen til og med videregående trinn 1 (vg1) heter det at:

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 2008e:2).

Det vil si at elevene helt fra de er 6 år gamle skal lære om gjeldende naturvitenskapelig kunnskap, og om metoder som kan benyttes for å bygge videre på denne nåværende kunnskapen.

Det andre aktuelle hovedmål for grunnskolen er "teknologi og design", på vg1 kalt "bioteknologi". I dette området står det:

Teknologi og design dreier seg om å planlegge, utvikle og framstille produkter til nytte i hverdagen. Samspillet mellom naturvitenskap og teknologi står sentralt i dette hovedområdet. Naturfaglige prinsipper vil være et grunnlag for å forstå teknologisk virksomhet (Kunnskapsdepartementet 2008e:3).

Vi ser her at samspillet mellom naturvitenskapelig kunnskap og teknologi er viktig. Gjennom naturvitenskapelig kunnskap har man stadig utviklet kompliserte teknologiske innretninger til nytte både i arbeidsliv og hverdagsliv. Samtidig har de teknologiske innretningene man har blitt i stand til å produsere gjort videre framskritt innenfor naturvitenskapen mulig.

Om vi så går over til studiespesialiseringsvalgfagene biologi 1 og biologi 2 finner vi enda flere målområder som er aktuelle for praktisk undervisning i bioteknologi. I målområdet "den unge biologen" heter det følgende:

Hovudområdet handlar 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 2008d:2).

Vi ser at i dette målområdet inngår praktisk kunnskap om arbeid og forsøk i laboratorie, samt etiske problemstillinger rundt metoder som kan gjennomføres på laboratoriet.

I målområdet "cellebiologi" er det oppbygging og funksjon av eukaryote celler, bakterier og virus som defineres som pensum:

Hovudområdet handlar om den indre bygnaden i eukaryote celler, korleis dei ulike delane fungerer, og transport av stoff ut og inn av celler. Området omfattar i tillegg oppbygginga og formeininga til bakteriar og virus (Kunnskapsdepartementet 2008d:2).

Cellebiologiområdet overlapper på sett og vis med målområdet "genetikk". Området "genetikk" handler imidlertid mest om DNA'ets funksjon og oppbygging:

Hovudområdet handlar om oppbygginga av DNA-molekyl og korleis dei er utgangspunktet for styring av livsprosessane. I tillegg dreiar hovudområdet seg om korleis nedarvingsmønster kan studerast frå generasjon til generasjon, og korleis endringar i kodinga til DNA-molekyla kan føre til mutasjonar og sjukdommar (Kunnskapsdepartementet 2008d:3).

Det siste målområdet jeg vil nevne er kanskje også det mest direkte relevante, nemlig "bioteknologi". Dette området går ut på kunnskap om utviklingen av bioteknologiske teknikker og hjelpemidler som har ført til framgang innenfor medisin, produksjon av mat og biologisk forskning (Kunnskapsdepartementet 2008d). I læreplanen heter det:

Hovudområdet handlar om utviklinga innanfor bioteknologi og genteknologi og korleis det har ført til nye hjelpemiddel og teknikkar innanfor medisin, produksjon av mat og biologisk forskning. Etske utfordringar og miljøutfordringar i samband med bruk av bioteknologi inngår i hovudområdet (Kunnskapsdepartementet 2008d:3).

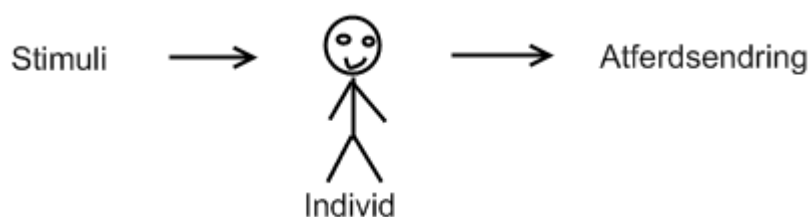
Vi ser at denne delen av området stort sett er en videre fordypning av området "teknologi og design" fra grunnskolen. I tillegg inngår det i dette målområdet vurderinger rundt etiske og miljømessige utfordringer sammenkoblet med bruk av bioteknologi.

1.1.4 Læringsteori

Det er åpenbart at man må ha kunnskap om læreplanene i valg av undervisningstema, og at man begrunner tema for undervisning på bakgrunn av disse. Læreplanene sier også litt om undervisningstrategier man kan ta i bruk, for eksempel ved å kreve praktisk undervisning i visse tema, men læringstrategier og valg av undervisningsopplegg må i hovedsak begrunnes utifra læringsteori. Læringsteori fungerer som et verktøy som gjør læreren i stand til å begrunne og forklare sine valg av undervisning, samtidig som læringsteori også kan gi læreren gode ideer til alternative framgangsmåter og variasjon i undervisningen. I tillegg er kunnskap om læringsteori viktig for å kritisk kunne vurdere sin egen undervisning.

Lyngsnes og Rismark (2007) deler læringsteori inn i to hovedkategorier, tradisjonalistisk og progressivistisk tenkning. Kort sagt kan man si at tradisjonalistene ser på kunnskap som noe som kan overføres fra person til person, mens en progressiv teoretiker vil mene at kunnskap oppfattes forskjellig fra person til person og dermed ikke kan overføres direkte (Lyngsnes og Rismark 2007).

Innenfor tradisjonalismen er det behaviorismen som er mest aktuell. Behavioristene mener at menneskene ved fødselen er en ubeskrevet tavle, som gjennom riktig påvirkning og stimulans kan lære hva som helst (Imsen 2005). Den kanskje mest aktuelle teoretikeren innenfor behaviorismen er Burrhus Frederic Skinner (1904 – 1990). Skinner hadde fokus på det observerbare hos elever, som i følge han er atferden. Endring av atferd oppnås gjennom endring av stimuli (se figur 2). Denne teorien blir kalt operant betinging (Lyngsnes og Rismark 2007).



Figur 2. Skinners teori om operant betinging. Læring kan bare observeres via atferdsendring hos individet. Atferdsendring oppnås via ulik stimulering av individet.

Tradisjonalistiske teorier har per i dag generelt ikke høy status i pedagogiske miljø. Fram til den "kognitive revolusjon" på sekstitallet var imidlertid tradisjonalismen den viktigste læringsteori innenfor skolen, og tradisjonalistiske virkemidler spiller fremdeles viktige roller i dagens skole.

Innenfor progressivismen har vi to aktuelle teorier kalt konstruktivismen og sosiokulturell teori.

Konstruktivistisk teori tar utgangspunkt i hva det vil si å tilegne seg kunnskap, og bygger på prinsippet om at uansett hvordan man vrir og vender på det er kunnskap noe som kun finnes i menneskenes hoder (Imsen 2005). Her var filosofen John Dewey en pioner. Han mente læring kom gjennom individets aktive medvirkning i læringsprosessen, og ikke gjennom ytre stimuli (Imsen 2005). Altså at læring kommer gjennom handling, å gjøre ting, for så å høste erfaringer fra disse handlingene. På denne måten blir læring noe man selv bidrar til gjennom aktivitet og handling. Dewey var den som introduserte uttrykket "learning by doing", som beskriver hans vektlegging på aktivitet i læringsprosessen.

Man kommer heller ikke utenom Jean Piaget (1896 – 1980) og hans kognitive konstruktivisme. Kort sagt kan man si at Piaget mente all stimuli blir tolket gjennom individets gjeldende kunnskaper og forestillinger. Individet velger så ut, tolker og tilpasser stimuleringen til sitt eget system (Imsen 2005). Læringen blir slikt sett et resultat av hva mennesket gjør med stimuleringen, og ikke hva stimuleringen gjør med mennesket. Vi konstruerer vår egen subjektive kunnskap (Imsen 2005). Kort fortalt er dette noe av hovedessensen i konstruktivismen, at individet selv må bygge sin kunnskap og danne sine personlige kunnskapstrukturer i hodet.

Piaget ble med sin teori kritisert for å ikke ta hensyn til læring i forhold til den sosiale sammenhengen. Ut fra denne teorien har det derfor sprunget ut den sosiale konstruktivismen som også søker å ta hensyn til det sosiale aspektet. Her er Lev Vygotsky (1896 – 1934) med sin sosiokulturelle teori, en sentral teoretiker. Vygotsky mente at barnet helt fra det blir født lever i en sosial sammenheng hvor språk og kultur spiller en viktig rolle (Imsen 2005). Hans teori legger derfor stor vekt på utvikling av språket og sosial samhandling i lærings og utviklingsprosesser.

Tabell 1. Oversikt over ulike læringsteorier (tilpasset fra Imsen, 2005).

	Vekt på ytre atferd vs indre prosesser	Drivkrefter i læringen (motivasjon)	Mennesket aktivt eller passivt?	Syn på kunnskap	Lærerens oppgave
Behavioristisk læringsteori	Ytre atferd. Enkle læringsformer.	Ytre belønning. Hedonisme.	Mest passiv læring. "Flaske-påfylling".	Ferdig kunnskap som overføres til individet.	Legge til rette oppgaver. Gi belønning.
Kognitiv læringsteori	Indre hukommelsesprosesser. Komplekse læringsformer.	Finne struktur og mønstre. Indre motivasjon.	Både aktiv og passiv. "Lagre" kunnskap.	Ferdig kunnskap, men preget av individets bearbeiding.	Strukturere, forklare, stimulere gode læringstrategier.
Konstruktivistisk læringsteori	Indre prosesser, "skjemaer".	Nysgjerrighet, trang til å "finne ut av". Indre motivasjon.	Aktivt.	Kunnskap konstruert av individet.	Legge til rette for aktivitet. Samspill mest med ting, men også sosialt.
Sosiokulturell læringsteori	Ytre kultur og indre, mentale prosesser.	Være et sosialt vesen.	Aktivt.	Overlevert fra kulturen, internalisert hos individet.	Strukturere, gi hjelp og støtte, "tøye" eleven, sosialt samspill, vekt på språk.

Innenfor undervisning i naturfag har den amerikanske psykologen Jerome Bruners teorier sterk relevans. I sekstiårene var det sterkt fokus i det amerikanske samfunnet på å heve kunnskapsnivået til befolkningen, særlig i matematikk og naturfag (Imsen 2005). Som en løsning på dette vendte Bruner seg bort fra mer fag og pugg, og ville heller fokusere på fagstoffet som noe som kunne tilpasses elevenes forståelseformer (Imsen 2005). Poenget her var at elevene skulle lære det vesentlige ved fagene, representert ved de ulike fagenes tenkemåte og metode. I naturfag blir således den hypotetisk-deduktive metoden sentral. Denne går ut på å formulere hypoteser, verifisere gjennom eksperimenter og komme fram til gyldige konklusjoner. Denne metoden kalte Bruner "learning by discovery", som er sammenfallende med Deweys "learning by doing" (Imsen 2005). For Bruner bunner denne metoden rundt ideen om at det er noen enkle og grunnleggende ideer for alle fag. Disse grunnleggende ideene kan presenteres både i enkle og mer kompliserte former. Bruner så for seg at de grunnleggende problemene skulle presenteres i enkle former på lavere nivå, for så å la elevene ta del i mer kompliserte problemstillinger etterhvert i utdanningen (Imsen 2005).

Dette prinsippet kalte Bruner for spiralprinsippet.

Motivasjonen i læringen ligger i at elevene på et tidlig stadium oppdager kjernen i problemet, som de så vil ønske å undersøke og nyansere, altså en indre motivasjon.

1.1.4 Motivasjon

Tradisjonismen og konstruktivismen har forskjellige syn på hvordan motivasjon oppnås. En tradisjonist vil mene at motivasjon kommer utenfra, gjennom ulike typer ytre stimuli slik som belønning og straff.

Det konstruktivistiske synet på motivasjon kan beskrives med likevektsprinsippet. Likevektsprinsippet beskrives som en medfødt, selvregulerende prosess som settes igang når mennesker står ovenfor noe de ikke forstår, eller ikke får til å stemme ut ifra sin nåværende kunnskap (Imsen 2005). For å oppnå forståelse av verden drives individet til omstrukturering av gjeldende kunnskap og fører til en ny tolkning og erkjennelse, altså at individet streber for å oppnå "likevekt". Det er altså trangen til likevekt som representerer motivasjonen bak læringsprosessen. Denne trangen kommer innenfra, og vi har det som kalles indre motivasjon (Imsen 2005).

1.1.5 Naturfag i Norge

Naturfag er en viktig ingrediens i den obligatoriske skolen i alle land, men organiseringen av faget varierer. Diskusjonen om fagets organisering bunner ofte i en diskusjon om hva naturfag egentlig handler om (Kjærnsli mfl 2007). Kort sagt kan man si at naturfag handler om hvordan naturen er bygget opp og hvordan den fungerer. Herunder ligger kunnskap om eksisterende lover for naturen, men også naturfag som arbeidsmåte for å skaffe ny kunnskap. Vi snakker gjerne om naturvitenskaplig arbeidsmåte for å tilegne oss ny kunnskap, hvor observasjoner og eksperimenter står sentralt (Kjærnsli mfl 2007). Plomp og Howie (2004) opererer med følgende typer naturfaglig kunnskap:

- Faktakunnskap, å vite at
- Prosedyrekunnskap, å vite hvordan
- Skjemakunnskap, å vite hvorfor
- Strategisk kunnskap, å vite når og hvordan anvende

Et kanskje like viktig spørsmål som hva naturfag er, er spørsmålet om hvorfor skal vi lære det, og hvorfor skal *alle* lære det? Sjøberg (2004) opererer med fire ulike argumenter for naturfag i skolen.

Det første argumentet han presenterer er det økonomiske argumentet. I dette argumentet ligger det at samfunnet er dominert av kunnskapsindustri, og for at en nasjon skal være konkurransedyktig er det nødvendig å ha en befolkning med innsikt i naturfag i tillegg til en elite med spesialkompetanse i faget.

Neste argument er nytteargumentet. Som nevnt regner Sjøberg samfunnet som dominert av kunnskapsindustri. Den innsikten vi tilegner oss gjennom naturfagene er dermed nødvendig for å mestre og forstå den verden vi lever i.

Det demokratiske argumentet baserer seg på at vi lever i en verden hvor mange politiske og etiske spørsmål er av naturfaglig art. Det demokratiske argumentet betyr derfor at naturfag trengs om vi skal ha en befolkning som er i stand til å fatte politiske og etiske beslutninger ut fra rasjonelle argumenter om verden.

Det fjerde argumentet kalles det kulturelle. Herunder ligger et syn som forteller at den vestlige sivilisasjonen per dags dato er farget av framskrittene som er gjort i naturvitenskapen. Naturvitenskaplige framskritt har ikke kun påvirket den teknologiske utviklingen. Vårt opplyste kunnskapssamfunn er resultat av naturvitenskapen, slik at naturfagene må regnes som en viktig del av vår kulturarv (Sjøberg 2005).

1.1.6 Problemstilling

Masteroppgaven i lektorutdanning i realfag er ment å ha både et faglig og et didaktisk aspekt. Jeg har valgt å løse dette ved å gjøre et arbeid innenfor et prosjekt i molekylærbiologi ved Institutt for Biologi. Gjennom arbeidet i dette prosjektet får jeg praktisert mange av metodene som brukes innenfor forskning i molekylærbiologi. Denne kunnskapen ønsker jeg så å nyttegjøre meg i den didaktiske delen av oppgaven.

I dette studiet vil jeg undersøke hvordan undervisning i bioteknologi kan gjennomføres ved videregående skoler. Jeg vil først fordype meg i bioteknologiske metoder gjennom arbeid på laboratorie, før jeg prøver å ta i bruk noen av disse metodene gjennom et undervisningsopplegg for en elevgruppe.

Problemstillingen min er som følgende: Hvordan bør undervisning innenfor bioteknologi gjennomføres med tanke på å gi en oppdatert, nyttig og motiverende kunnskap innenfor feltet?

Hovedfokus blir dermed av didaktisk art, men arbeidet med problemstillingen vil involvere mye rent faglig arbeid innenfor molekylærbiologi. Jeg mener det er viktig å ha nok faglig ballast før man tar fatt på de didaktiske problemstillinger, og at det er viktig med faglig tyngde for å kunne undervise godt i sitt fag. Jeg vil derfor vektlegge det faglige og didaktiske like mye i arbeidet med denne oppgaven.

1.2 Biologisk teoribakgrunn

Laboratoriedelen av oppgaven omhandler karakterisering av trehaloserelaterte gener i *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*).

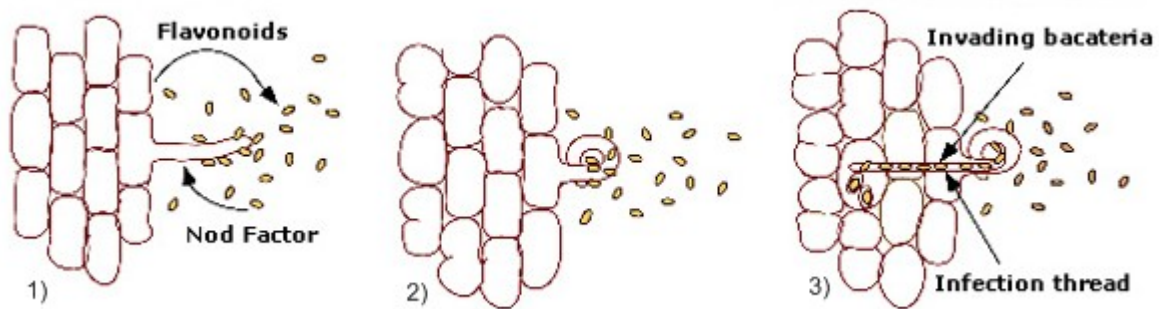
1.2.1 *Agrobacterium tumefaciens* og *Sinorhizobium meliloti*

A. tumefaciens og *Sinorhizobium meliloti* (*S. meliloti*) er begge gram negative jordbakterier og hører til familien Rhizobiaceae.

A. tumefaciens er en spesielt interessant bakterie innenfor forskning, på grunn av dens unike evne til å transformere planter, det vil si at den endrer plantens gensammensetning, gjennom injisering av spesifikke DNA sekvenser (T-DNA) (White og Winans 2007). De injiserte T-DNA sekvenser inneholder onkogenene, og disse onkogenene leder til en sterk økning i celledeling hos de infiserte cellene. Resultatet av slik ukontrollert økning i celledeling er dannelse av såkalte krongaller (crown galls) (Goodner mfl 2001). I tillegg inneholder T-DNA gener for en rekke aminosyrer som nesten utelukkende brukes som nitrogenkilde av *A. tumefaciens* (Tzfira og Citovsky 2006). *A. tumefaciens* er dermed en parasittisk mikroorganisme.

Gjennom å modifisere *A. tumefaciens* T-DNA kan man utnytte bakteriens evne til å transformere planteceller til å injisere ønskede gener inn i planteceller. Dette er en metode som har blitt raskt utviklet og benyttet de siste ti år (Tzfira og Citovsky 2006).

Gjennom fiksering av atmosfærisk nitrogen som vertsplanten kan nyttegjøre seg av, opptrer *S. meliloti* til forskjell fra *A. tumefaciens* i et symbiotisk forhold til sine vertsplanter (Gage 2004). Dannelsen av slike symbioser innebærer at plantene først utskiller substanser, heriblant flavenoider (Raven mfl 1999). Flavenoider fører til indusering av såkalte *nod* gener i bakterien. Utrykk av disse *nod* faktorene fører til deformering, eller krokdannelse i nærliggende planterothår (Gage 2004). Ut fra denne kroken på rothåret starter så dannelsen av en infeksjonstråd, som vokser seg gjennom rothårcellen og penetrerer epidermalt cortex. *S. meliloti* som befinner seg inne i infeksjonstråden vokser og deler seg normalt, slik at infeksjonstråden er full av celler (se figur 3) (Gage 2004).



Figur 3. Stegene i dannelsen av symbiose mellom planter og *S. meliloti*. Planten og bakterien gjenkjenner hverandre ved at planten skiller ut flavonoider og bakterien skiller ut *nod* faktor. Dette fører til deformasjon og krokdannelse av rothårcellen, og startpunkt for infeksjonstråd. Infeksjonstråden vokser seg så gjennom cellen (tilpasset fra <http://www.biochem.duke.edu/assets/444/Fig8.jpeg>).

De tidlige stegene av symbiosedannelsen har store likheter til plante-patogen interaksjoner (Soto mfl 2006). Planten reagerer derfor med samme forsvar som mot patogene mikroorganismer. Dette forsvaret består blant annet i at planten utsetter mikroorganismen for ulike typer stress (Ampomah mfl 2008). Disse belastningene overlever *S. meliloti* blant annet gjennom akkumulering av disakkarider (Spaink 2000), heriblant disakkaridet trehalose.

1.2.2 Trehalose

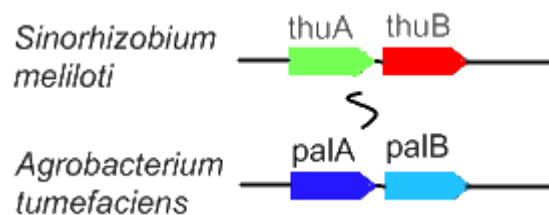
Disakkaridet trehalose [α -D-glucopyranosyl-(1,1)- α -D-glucopyranoside] er et molekyl som er kjent for å beskytte organismer mot osmotisk stress (Elbein 1974). Under normale forhold kan *S. meliloti* ta opp trehalose og bruke substansen som sin primære energikilde (Glenn og Dilworth 1981). Om organismen blir utsatt for stress faktorer, slikt som osmotisk- eller fysiologisk stress, er det derimot detektert syntese og akkumulering av intracellulær trehalose (Smith mfl 1994).

1.2.3 *thuA* og *thuB*

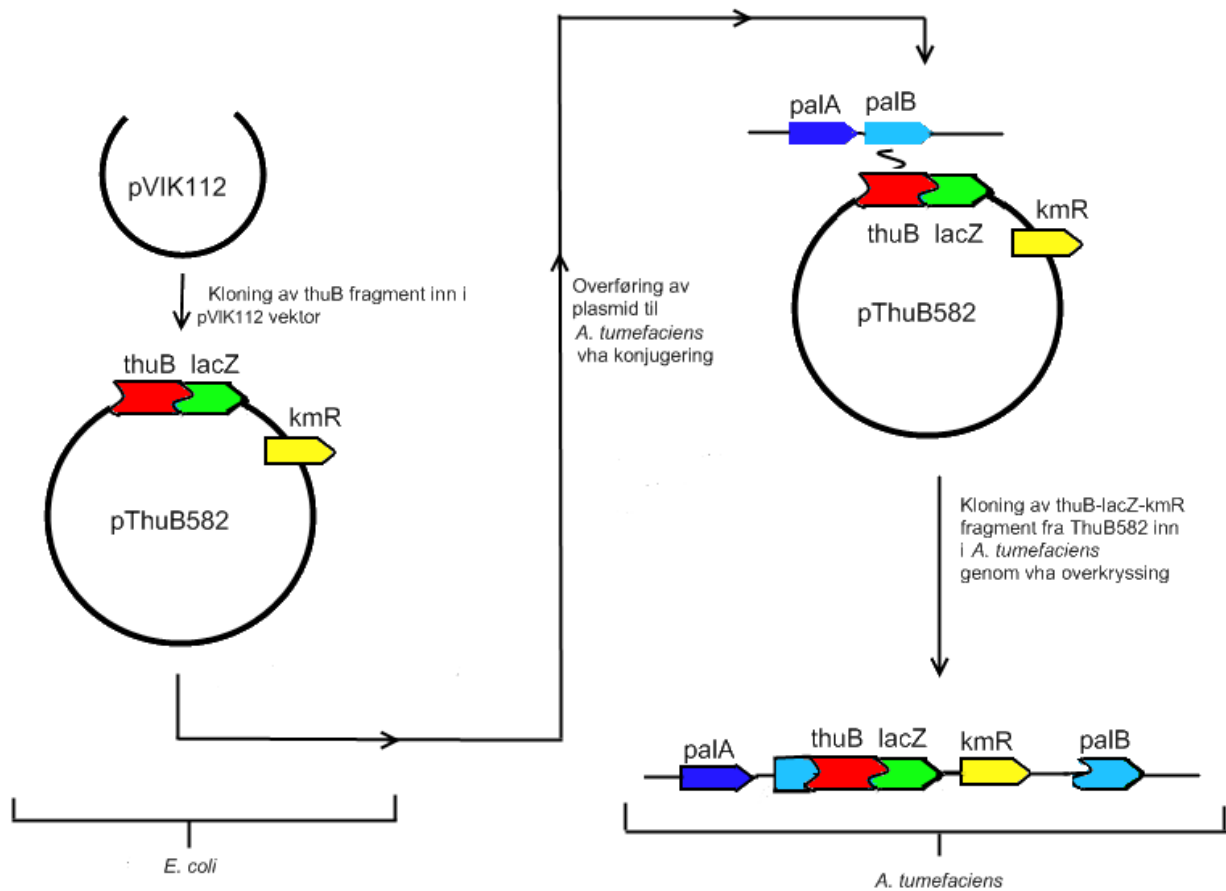
S. meliloti har minst to gener involvert i trehalosemetabolisme, *thuA* og *thuB* (Jensen mfl 2002). *thuB* koder for proteinet ThuB, som antas å kode for en NAD(H) avhengig dehydrogenase (Ampomah mfl 2008). *S. meliloti* med mutasjon i genene *thuA* og *thuB* evner å transportere trehalose, men kan ikke benytte seg av disakkaridet som karbonkilde i samme grad som villtype rhizobium (Jensen mfl 2005). Dette fører til at organismer med mutasjoner i disse genene i større grad akkumulerer trehalose under kolonisering av planterøtter.

thuA og *thuB* hos *S. meliloti* utviser stor grad av homologi til genene *palA* og *palB* hos *A. tumefaciens* (Jensen mfl 2005). På bakgrunn av dette er det interessant å undersøke om *palA* og *palB* hos *A. tumefaciens* kan ha samme funksjon som *thuA* og *thuB* hos *S. meliloti*.

For å undersøke dette ønsker vi å slå ut genet *palB* i *A. tumefaciens* ved hjelp av homolog rekombinasjon. Dette ønsker vi å gjøre ved å få *thuB* inn i *A. tumefaciens* via konjugering fra *Escherichia coli* (*E. coli*). For å få til dette skal det benyttes *E. coli* celler transformert med plasmidet pThuB582. pThuB582 er et pVIK112 plasmid med et 582 bp *thuB* fragment klonet inn. De transformerte *E. coli* skal så føre plasmidet over i våre *A. tumefaciens* vha konjugasjon. Inne i *A. tumefaciens* kommer plasmidet til å feste seg til genomet til *A. tumefaciens* på grunn av homologien mellom *thuB* og *palB*. Dette vil gjøre en overkryssning mellom plasmidet og det genomiske DNA hos *A. tumefaciens* mulig (se figur 4 og 5).



Figur 4. Genene *thuA* og *thuB* hos *S. meliloti* har homologi til genene *palA* og *palB* hos *A. tumefaciens*.



Figur 5. Skjema over planlagt progresjon i arbeidet. *thuB* er klonet inn i pVIK112 vektoren ved *lacZ* genet, et stykke oppstrøms for kanamycinresistens (*kmR*) genet, og dette plasmidet er så transformert inn i *E. coli*. Overføring av pThuB582 plasmidet til *A. tumefaciens* skjer så ved konjugering mellom *E. coli* og *A. tumefaciens*. I *A. tumefaciens* vil plasmidet feste seg til genomisk DNA, og dette vil gjøre overkryssning i regionene med *thuB* homologi mulig. Resultatet vil bli at plasmidet har blitt klonet inn i genomet til *A. tumefaciens*.

I arbeidet med å klonere *thuB* fragmentet inn i *A. tumefaciens* må jeg benytte meg av mange molekylærbiologiske metoder, blant annet PCR, kloning, transformering og agarose gel elektroforese. For denne oppgaven er teorien rundt disse metodene viktig fordi metodene skal undervises til elever under elevbesøk her på universitetet, samtidig som arbeidet med disse metodene gir meg dypere kunnskap som vil komme godt med for meg som fremtidig lærer i biologi. I det følgende presenterer jeg derfor metodene jeg har benyttet meg av for å gjennomføre arbeidet med *A. tumefaciens*.

2. Material og metoder

2.1 Material

I dette studiet er alt av vekst og dyrkningsmedier selvprodusert. I det følgende kapittelet presenteres utstyr og ingredienser benyttet i den laboratorietekniske delen av studiet.

Tabell 2. Vekstmedier brukt for å dyrke bakterier.

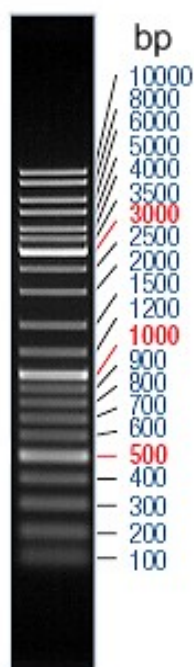
Medium	Formål	Ingredienser	Merknad
TY medie	Dyrkning av <i>A. tumefaciens</i>	5 g trypton 3 g gjærekstrakt 0,87 g CaCl ₂ x2H ₂ O opp til 1000ml dH ₂ O 17 g Bactoagar	Bactoagar tilsettes kun hvis det ønskes fast vekstmedie. Løsningen autoklaveres før bruk.
LB medie	Dyrking av <i>E. coli</i>	10 g Trypton 5 g gjærekstrakt 10 g NaCl opp til 1000 ml dH ₂ O 7g Bactoagar	Baktoagar tilsettes kun hvis det ønskes fast vekstmedie. Løsningen autoklaveres før bruk.
S.O.C medie	Brukes under transformasjon av TOP10 elektrokompetente celler	20 g trypton 5 g gjærekstrakt 0.584 g NaCl 0.186 g Kcl 0.952 g MgCl ₂ 3.603 g Glukose opp til 1000 ml dH ₂ O	Løsningen autoklaveres før bruk.

Tabell 3. Antibiotika og kjemikalier benyttet for å selektre bakterier.

Antibiotika/kjemikalie	Produsent	Fortynning
Kanamycin	Sigma-Aldrich K4000	50 µg/ml
Rifampicin		20 µg/ml (blandes i metanol)
X-Gal	Invitrogen	

Tabell 4. Ingredienser benyttet for agarose gel elektroforese.

Reagens	Produsent/Innhold
1x TBE buffer	10.8 g Tris 5.5 g Borat 0.93 g EDTA opp til 1000 ml dH ₂ O
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

**Figur 6.** GeneRuler DNA Ladder Mix.**Tabell 5.** Reagenser benyttet for PCR og sekvensering.

Reagens	Produsent
Dynazym Polymerase	Finnzymes
10x Dynazym Buffer	Finnzymes
dNTP miks	Finnzymes
BigDye Terminator v3.1 Sequencing kit	Applied Biosystems

Tabell 6. Primere benyttet til PCR og sekvensering.

Primer	Sekvens	Produsent
M13 forward	5'[GTAAAACGACGGCCAG]'3	Invitrogen
M13 reverse	5'[CAGGAAACAGCTATGAC]'3	Invitrogen
AtpalA	5'[AATGTTCCCGTCGACAAGGC]'3	Eurogentec
AtupalA2	5'[CCAATGTCCAGAAGGTCATCA]'3	Sigma
MedR	5'[GGCGATTAAGTTGGGTAAGG]'3	Eurogentec
LacZ1	5'[TTCAC TGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGA]'3	Eurogentec
LacZ2	5'[ATGTGAGCGGTAACAACCCGTCGGATTCT]'3	Eurogentec

Tabell 7. Eksperimentelt utstyr benyttet i arbeidet.

Navn	Produsent/kilde	Beskrivelse
TProfessional thermocycler	Biometra	Thermal Cycler (PCR maskin)
Pulse Controller Gene Pulser	Bio-Rad	Elektroporator
SpectraMAX 250	Molecular Devices	Spektrofotometer (cellekonsentrasjon)
Nano Drop 1000	Thermo Fisher Scientific	Spektrofotometer (DNA konsentrasjon)
Gel Doc 2000	Bio-Rad	Fotosystem (Gelbilder)
3130xl Genetic Analyzer	Applied Biosystems	DNA sekvensering
Chromas Lite	Technelysium	Sekvensanalyse Software
Avanti Centrifuge J-20 XP	Beckman Coulter	Gulvsentrifuge
Centrifuge 5417	Eppendorf	Benksentrifuge
mFold	Rensselaer bioinformatics (http://mfold.bioinfo.rpi.edu/)	Predikering av DNA sekundærstruktur
RNAfold	Institute for Theoretical Chemistry University of Vienna (http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi)	Predikering av DNA sekundærstruktur

Tabell 8. Diverse verktøy benyttet i arbeidet.

Navn	Produsent	Beskrivelse
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN	Rensing av DNA fra agarose gel
TOPO TA Cloning	Invitrogen	Kloning av PCR fragment inn i vektor

Tabell 9. Bakterielle stammer, PCR fragmenter, plasmider og enzymer benyttet i arbeidet.

Navn	Kilde	Beskrivelse
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> MAFF301001		Villtype <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
One Shot <i>Escherichia coli</i> TOP10	Invitrogen	Elektrokompetente celler benyttet ved transformasjon
pCR 2.1 TOPO	Invitrogen	Ulike kloning og promotorseter, antibiotikaresistens og X-Gal seleksjon (se figur 5)
pUC 19	Invitrogen	Plasmid benyttet som positiv kontroll under transformasjon
pThuB582	Jensen mfl 2005	pVIK112, 582bp <i>thuB</i> fragment, kanamycinresistens.

2.2 Laboratorietekniske metoder

I det følgende presenterer jeg prosedyrene for de laboratorietekniske metodene. Metodene forklares omgåelig og detaljert, da det for meg som fremtidig lærer er nødvendig å kunne vise til god forståelse for metodene, både i gjennomføring av elevbesøk her ved universitetet og i mitt kommende arbeid som biologilærer. Jeg har også valgt å presentere prosedyrene punktvis og skjematisk, da denne framstillingen gjør det lettere å forstå å ta i bruk prosedyrene ved senere anledninger. Jeg tenker da spesielt på at denne framstillingen gjør det lettere å ta prosedyrene i bruk ved fremtidig undervisning.

2.2.1 Transformering

Transformering innebærer å genetisk forandre en celle gjennom at cellen tar inn og tar i bruk ukjent DNA (Gerhardt mfl 1994). For å gjennomføre en transformering må man ha kompetente celler. Cellers kompetenthet beskrives ut ifra deres evne til å ta opp deoxyribonukleinsyre (heretter DNA) fra et vekstmedie. Det finnes forskjellige metoder man kan ta i bruk for å gjennomføre transformering i laboratoriet. Jeg beskriver i det følgende to metoder jeg selv har benyttet meg av.

2.2.2 Transformering av *E. coli*

Transformering av *E. coli* ble i dette studiet gjort ved hjelp av TOPO TA klonings kit fra Invitrogen Corporation.

TOPO TA Cloning er designet for å sette inn polymerase chain reaction (heretter PCR) produkter i en plasmidvektor (Invitrogen Corporation 2006). DNA polymerasen som brukes til PCR reaksjonen er en *Taq*-polymerase. *Taq*-polymerase har en spesiell egenskap ved at den uavhengig av hvilket templat man kopierer opp plasserer en enslig deoxyadenosin (heretter A) på 3' endene av PCR produktet (Invitrogen Corporation 2006). Plasmidvektoren som brukes er en TOPO vektor, og denne har thymidin (heretter T) overheng på 3' endene av plasmidet. I tillegg har vektoren enzymet topoisomerase I kovalent bundet til den ytterste basen av T overhenget (Invitrogen Corporation 2006).

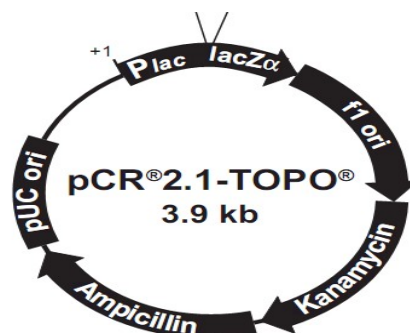
Topoisomerase I er et enzym som i cellen hjelper til med å løse opp supercoils (knuter) i DNA. Måten enzymet gjør dette på er å binde til DNA molekylet og deretter kutter den ene tråden. Samtidig dannes en kovalent binding mellom enzymet og 5' enden på den kuttete tråden. 3' enden av kuttet holdes på plass ved en ikke kovalent binding. Den ukuttete DNA tråden får så passere gjennom kuttet hvorpå topoisomerasen ligerer DNA sammen igjen (Darnell mfl 1999).

Det er topoisomerasens liggeringsaktivitet vi er interessert i ved TOPO kloning. Det *Taq* amplifiserte PCR produktet har som sagt en enslig A på 3' endene, og finner så rett plass i plasmidet på grunn av T overhengene på 5' enden av dette. Topoisomerasen liggerer så plasmidet fast i vektoren (se figur 7) (Invitrogen Corporation 2006)



Figur 7. Prinsippet bak TOPO TA kloning. Vi ser thymidin overhengene fra TOPO vektoren lett innfinner seg med adenosin overhenget på PCR produktet og den kovalent bundne topoisomerasen som sørger for korrekt ligering (Invitrogen Corporation, 2008).

Ved korrekt ligering vil PCR produktet settes inn i *lacZα* genet i vektoren (se figur 8). *lacZ* genet koder for enzymet β -galaktosidase. Dette enzymet er ansvarlig for kløyvingen av derivatet 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-gal), og denne kløyvingen resulterer i derivatene galaktose og 5-bromo-4-kloro-indoksyd. 5-bromo-4-kloro-indoksyd oksiderer spontant til 5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-indigo som avgir en blå farge. Det vil si at ved korrekt ligering vil β -galaktosidase ikke bli dannet, og derfor heller ikke kan kløyve X-gal. Dette gjør at celler med korrekt innsett vil være fargeløse og celler uten innsett vil være blå, og man skiller slik celler med og uten korrekt innsett (Invitrogen Corporation 2006).



Figur 8. Kart over pCR 2.1-TOPO vektoren. Vi ser at innsettet kommer inn i *lacZ* genet, som gjør senere deteksjon av innsett i bakteriene mulig (Invitrogen Corporation 2006).

I dette studiet blir det tatt i bruk elektrokompetente celler og elektroporering for å få *E. coli* cellene til å ta opp plasmidet. Ved elektroporeringsmetoden utsetter man cellene som skal transformeres for et elektrisk felt som akkurat overgår kapasitansen (ladningskapasiteten, F) til cellemembranen. Dette fører til en delvis og reversibel nedbrytning av cellemembranen. Molekyler, slikt som ukjent DNA kan under elektroporeringen passere gjennom den midlertidig ustabile cellemembranen (Gehl 2003).

2.2.3 Prosedyre for ligering av PCR produkt inn i TOPO vektor

1. Reagensene gitt i tabell 10 mikses og inkuberes i 5 minutter ved romtemperatur. Inkubasjonstid kan varieres fra 30 sekunder til 30 minutter, hvor økt inkubasjonstid vil gi økt antall ligerte plasmider (særlig for store PCR produkt).
2. Plasser løsningen på is. Om transformeringen skal foretas ved en senere anledning kan løsningen fryses ned ved -20 °C over natt.

Tabell 10. Reagenser for ligering av PCR produkt inn i TOPO vektor, for senere transformering inn i elektrokompetente *E. coli*. Reagensene medfølger i TOPO TA Cloning kittet.

Reagens	Mengde
PCR produkt	0.5 – 4 µl
Fortynnet saltløsning	1 µl
TOPO vektor	1 µl
dH ₂ O	Opp til sluttvolum på 6 µl

2.2.4 Prosedyre for transformering av TOPO vektor inn i *E. coli*

1. 2 µl av kloningsreaksjonen tilsettes rør med elektrokompetente celler og blandes forsiktig.
2. Løsningen overføres til en 0.1 cm kyvette. Unngå bobler.
3. Prøvene elektroporerer ved bruk av elektroporator (Bio-Rad Gene Pulser). Elektroporer ved 2,5 V, 200 OHMS og 25 µFD.
4. Overfør prøvene til 250 µl S.O.C. Medium.
5. Overfør prøvene til 1.5 ml eppendorfrør og plasser rørene på risting (~200 rpm) i 1 time 37 °C.
6. 2 x 30 µl av hvert rør spres så ut på seleksjonsplater (50 µg/ml kanamycin) tilsatt 20 µl 40

mg/ml X-gal. Rørene spinnes så ned og supernatanten fjernes. Pelleten spres ut på en tredje plate. Inkuber platene ved 37 °C over natt. Platene kan etter dette oppbevares ved 4 °C.

2.2.5 Tillaging av rifampicinresistente *Agrobacterium tumefaciens*

For å gjøre senere selektering fra blandede kulturer mulig ble *A. tumefaciens* først gjort resistent mot rifampicin.

Rifampicin er et antibiotika som binder til og inhiberer aktiviteten til RNA polymerase hos prokaryoter. Inhibering av RNA polymerasen vil hindre proteinsyntesen i cellene, og de vil dermed ikke vokse og dele seg normalt (Baron 1996). Hvilken som helst populasjon av bakterier kan ha svak resistans mot dette antibiotikumet, og denne resistansen utvikles dermed gjennom naturlig seleksjon ved rifampicin behandling (Baron 1996). Resistens hos *A. tumefaciens* ble oppnådd ved å først spre kulturer på plater med 10 µg/ml rifampicin. Etter 3 dager ble så voksende kolonier plukket og spredt utover plater med 20 µg/ml rifampicin. Plukking og utspredding ble så foretatt 2 ganger til, slik at man var sikker på at de voksende kolonier var resistent mot antibiotikaet.

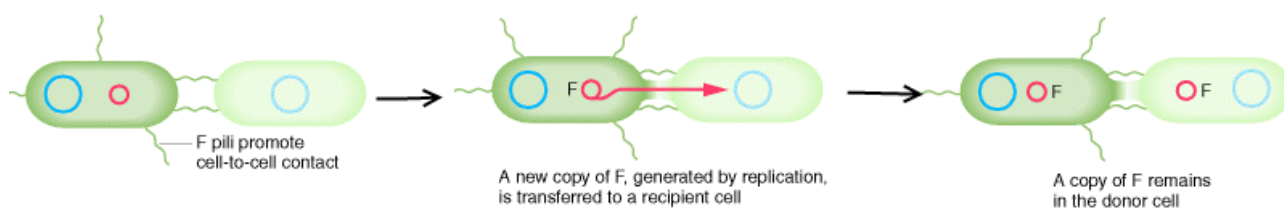
2.2.6 Prosedyre for tillaging av rifampicin resistente *Agrobacterium tumefaciens*

1. TY agar medie blandes som gitt i tabell 2.
2. Fra en 20 mg/ml rifampicin stokkløsning tilsettes 0.5 ml per 500 ml TY medie slik at en rifampicin sluttkonsentrasjon på 20 µg/ml (rif²⁰) oppnås.
3. Løsningen støpes i petriskåler.
4. Frysestokk *A. tumefaciens* strykes ut på petriskål og inkuberes ved 26 °C 3-4 døgn.
5. Kolonier plukkes og spres ut på TY rif²⁰ plater 3-4 ytterligere ganger for å sikre resistens.

2.2.7 Transformering av *Agrobacterium tumefaciens*

Metoden som er brukt for å transformere *A. tumefaciens* forutsetter at man allerede har transformert *E. coli* med plasmid pThuB582, og at man har en *A. tumefaciens* stamme som har antibiotikaresistens som ikke finnes hos de transformerte *E. coli*.

De transformerte *E. coli* ble dyrket sammen med de rifampicin resistente *A. tumefaciens*. Dette for å gjøre konjugasjon mellom de to bakteriene mulig. Konjugering er en prosess der to ulike bakterieceller kobles sammen. Dette gjør utveksling av DNA mulig, om cellene har de nødvendige faktorene for denne prosessen (se figur 9) (Griffiths mfl 2002).



Figur 9. Prinsipp bak konjugering. Cellene finner hverandre vha konjugeringspilier. Det dannes så en bro mellom cellenes cytoplasma, som gjør at arvemateriale kan fraktes igjennom (Hentet fra Griffiths mfl 2002).

Etter konjugering er det viktig at *A. tumefaciens* integrerer plasmidet i sitt eget genom. Dette er fordi plasmidet har ori *A. tumefaciens* ikke kan lese, og blir ikke replikert ved celledeling. Det betyr at plasmidet forsvinner etterhvert som cellene deler seg. Denne inkorporeringen vil skje ved mekanismen homolog rekombinasjon. Denne mekanismen består i at to homologe sekvenser (slik som *thuB* og *palB*) klippes i samme relative posisjon, og deretter bytter plass, uten at noe informasjon går tapt (Griffiths mfl 2002).

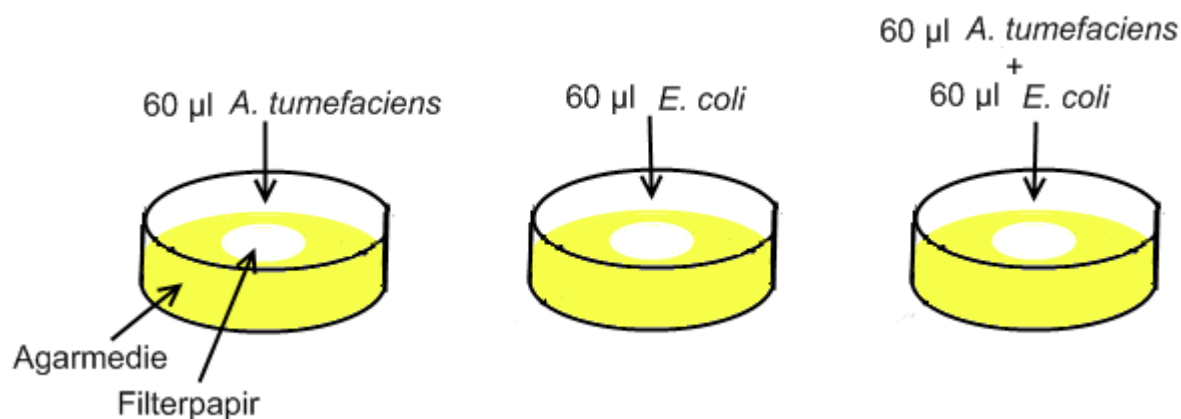
For å selektere transformerte *A. tumefaciens* ble kulturene dyrket i medie med både rifampicin og kanamycin. Kanamycin resistens ligger i plasmidet pThuB582 (se figur 5). Dette betyr at kanamycin selekterer bort uttransformerte *A. tumefaciens*, mens rifampicin selekterer bort *E. coli*. De eneste bakteriene som kan vokse på dette mediet er derfor transformert *A. tumefaciens*.

2.2.8 Prosedyre for transformering av *Agrobacterium tumefaciens*

1. Flytende *A. tumefaciens* kulturer startes 3 dager i forveien. 10 ml TY rif²⁰ medie, 26 °C, risting 250 rpm.
2. Flytende *E. coli* kulturer startes 1 dag i forveien. LB med 50 µg/ml kanamycin medie (LB kan⁵⁰), 36 °C, risting 250 rpm.
3. OD ved bølgelengde 600nm måles for kulturene. Ønskelig med absorbans 0.250 – 0.450.
4. 1.5 ml av hver kultur overføres til eppendorfrør og spennes ned. 4000 rpm, 1 min.
5. Supernatant fjernes, 1 ml 0.9% NaCl tilsettes og spennes ned på nytt. 4000 rpm, 1 min.
6. Gjenta steg 5.
7. Fjern supernatant, tilsett 200 µl 0.9% NaCl.
8. 60 µl av hvert rør tilsettes hver sin TY agarplate med påført filterpapir. Til en tredje plate tilsettes 60 µl av både *A. tumefaciens* og *E. coli* kulturen (se figur 10). Dette inkuberes ved

26 °C i 48 – 72 timer.

9. Filterpapirene vortexes i 3 ml vann. 40 µl av denne løsningen + 10 ganger fortykning av løsningen plates ut på TY rif²⁰ kan⁵⁰ seleksjonsplater.
10. Etter 3-4 dager plukkes kolonier og spres ut på nye seleksjonsplater. Dette gjentas 2-3 ganger.



Figur 10. Oppsett for diparental mating. To av platene tilsettes kun *A. tumefaciens* eller *E. coli*. Til den tredje platen tilsettes begge kulturene.

2.2.9 Plasmidrensing

Plasmidrensing er en teknikk som brukes for å rense ut plasmider fra en bakteriekultur. Plasmid miniprep brukes her for videre å undersøke plasmider som er satt inn i bakterier. Metoden gir nok DNA til å kunne gjennomføre analyser ved hjelp av restriksjonsenzymmer, PCR reaksjon osv. Metoden som er benyttet i dette studiet er Birnboim og Dollys metode for rask opprensing av plasmid DNA. Bakgrunnen for denne metoden er at korte sirkulære DNA sekvenser er mer stabil ved høy pH enn lange sirkulære sekvenser og lineært DNA (Birnboim og Doly 1979).

I denne metoden behandler man først bakteriecellene med lyzosym og deretter SDS og NaOH. Dette fører til lysering av bakteriene. NaOH mengden reguleres slik at en pH på 12- 12,5 oppnås. Ved denne pH denatureres kromosomalt DNA mens plasmid DNA opprettholder sin struktur. Løsningen utsettes så for natrium acetat, som får det kromosomale DNA til å renaturere og forme et uløselig nettverk (Birnboim og Doly 1979). Samtidig danner proteiner og store RNA molekyler kompleks med SDS. Protein-SDS kompleksene og DNA aggregatene kan dermed spinn ned samtidig i en vanlig laboratoriebensentrifuge. Plasmid DNA vil etter dette befinne seg i supernatanten og kan overføres til et nytt rør for videre vasking og undersøkelser (Birnboim og

Doly 1979).

2.2.10 Prosedyre for plasmidrensing fra *E. coli*

1. Sentrifuger 1.5 ml cellekultur ved 11000 rpm i 1.5 min og fjern deretter supernatanten.
2. Resuspender pellet i 100 µl lysisløsning bestående av 50mM Glucose, 25 mM Tris pH8 og 10 mM EDTA pH8. La løsningen stå på is i 5 minutter.
3. Tilsett 200 µl alkalisk SDS løsning bestående av 0,2 M NaOH og 1% (w/v) SDS. La løsningen stå på is i 5 minutter.
4. Tilsett 150 µl 3M Natriumacetat (pH 4.8) og vortex umiddelbart i en kort periode.
5. Sentrifuger i 10 minutter ved 16000 rpm og fjern deretter supernatanten.
6. Vask pellet med 500 µl 70% EtOH og centrifuger 5-10 minutter ved 12000rpm.
7. Fjern supernatanten og la pelleten lufttørke. Tilsett så 20 µl vann, evt tilsatt Rnase A. Oppbevar DNA ved -20 °C.

2.2.11 Opprensing av genomisk DNA

For opprensing av genomisk DNA ble prosedyren gitt i "Preparation of Genomic DNA from Bacteria" benyttet (Wilson 2001). Denne metoden går ut på at man først lyserer cellene ved hjelp av TE buffer tilsatt proteinaseK/SDS. Proteinase bryter ned proteiner og SDS komplekserer med aminosyrer (Wilson 2001). Løsningen blir så tilsatt NaCl. Målet her er å få saltkonsentrasjonen over 0.5M. Dette trengs fordi det i neste steg blir tilsatt en CTAB løsning. CTAB tilsettes fordi den presipiterer polysakkarider, celleveggmateriale og denaturert protein. Om saltkonsentrasjonen er under 0.5 molar vil CTAB også presipitere nukleinsyrer, og dette gjør NaCl tilsetningen nødvendig (Wilson 2001). For å løse ut CTAB-protein/polysakkarid komplekser bruker man så kloroform/isoamyl alkohol og deretter fenol/kloroform/isoamyl alkohol løsning med påfølgende sentrifugeringer. Supernatanten vil etter sentrifugering inneholde genomisk DNA (Wilson 2001).

2.2.12 Prosedyre for rensing av genomisk DNA fra *Agrobacterium tumefaciens*

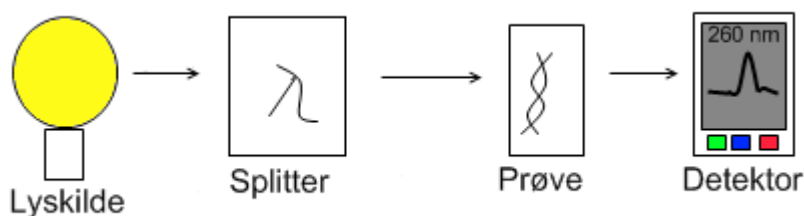
1. 5 ml flytende kulturer startes og inkuberes ved 26 °C i 48-72 timer.
2. 1.5 ml overføres til eppendorfrør og sentrifugeres i 2 min.
3. Fjern supernatant og resuspender pellet i 567 µl TE buffer ved pipettering.
4. Tilsett 30 µl 10% SDS og 3 µl 20 mg/ml proteinase K. Bland godt og inkuber ved 37 °C i 1 time.

5. Tilsett 100 μ l 5 M NaCl og bland godt.
6. Tilsett 80 μ l CTAB/NaCl løsning. Bland godt og inkuber ved 65 °C i 10 min.
7. Tilsett tilsvarende volum (0.7 – 0.8 ml) kloroform/isoamyl alkohol. Bland godt og sentrifuger 5 min.
8. Overfør den flytende viskøse supernatanten til nytt rør.
9. Tilsett tilsvarende volum phenol/kloroform/isoamyl alkohol og sentrifuger 5 min.
10. Overfør supernatant til nytt rør. Tilsett 0.6 ganger volum isopropanol.
11. Vend på røret til et hvitt DNA precipitat blir synlig. Sentrifuger 2 min.
12. Vask DNA med 70% ethanol og sentrifuger så 5 min.
13. Gjenta steg 12.
14. Resuspender pellet i 70 μ l TE buffer.

2.2.13 Bestemmelse av DNA konsentrasjon

Konsentrasjonen av DNA ekstrahert gjennom plasmidrensing og opprensing av genomisk DNA ble i dette studiet målt ved hjelp av NanoDrop ND-1000 Spektrofotometer (Saveen Werner).

Et spektrofotometer er et apparat som kan måle intensitet som en funksjon av bølgelengden på lyset (Gerhardt mfl 1994). Spesifikt består består et spektrofotometer av en lyskilde, en splitter og en detektor (se figur 11). Fra lyskilden går lyset inn i splitteren, som splitter lyset i forskjellige bølgelengder, og sender videre lys kun i en ønsket bølgelengde. Herfra går lyset gjennom den gitte prøven man vil undersøke og til detektoren. Detektoren måler intensiteten til lyset som har sluppet gjennom prøven, og omformer denne mengden til et tall, absorbans (A) eller optisk tetthet (optical density, OD)(Gerhardt mfl 1994). DNA absorberer lys ved bølgelengde 260 nm.



Figur 11. Typisk oppsett for et spektrofotometer. Fra lyskilden går lyset til en splitter som separerer lyset i forskjellige bølgelengder. Herfra går lyset gjennom prøven man undersøker og til detektoren. Detektoren måler intensiteten på lyset og regner dette om til et tall i enheten absorbans (A) eller optisk tetthet (optical density, OD).

2.2.14 Kutting av DNA med restriksjonszymer

Restriksjonszymer er enzymer produsert i bakterier som forsvar mot virus, hvor enzymet kutter virusets DNA og dermed inaktiverer det (Griffiths mfl 2002).

Restriksjonszymer gjenkjenner spesifikke regioner på dobbel trådet DNA (dsDNA) og kutter sekvensen ved disse regionene, kalt restriksjons seter. Restriksjonsenzymet kutter DNA i begge de komplementære trådene. Det finnes ulike typer restriksjonszymer. Noen produserer kutt i sekvensene i form av "sticky ends", det vil si et overheng på den ene DNA tråden etter kutting, mens andre enzymer produserer produkter med "blunt ends", hvor DNA'et er kuttet rett av og ikke inneholder dette overhenget (se figur 12)(Griffiths mfl 2002).



Figur 12. Visualisering av de to typer kutt produsert av restriksjonszymer. Til venstre ser vi et "sticky end" kutt laget av enzymet *EcoRI*, mens vi på høyre side ser et "blunt end" kutt laget av enzymet *SmaI*.

2.2.15 Prosedyre restriksjonskutt

1. Bland sammen komponentene gitt i tabell 11.
2. Inkuber prøvene ved 37 °C i ~2 timer.
3. Prøvene blandes med 2 µl 6xT gel loading buffer og kjørt på en agarosegel.

Tabell 11. Ingredienser for restriksjonskutt.

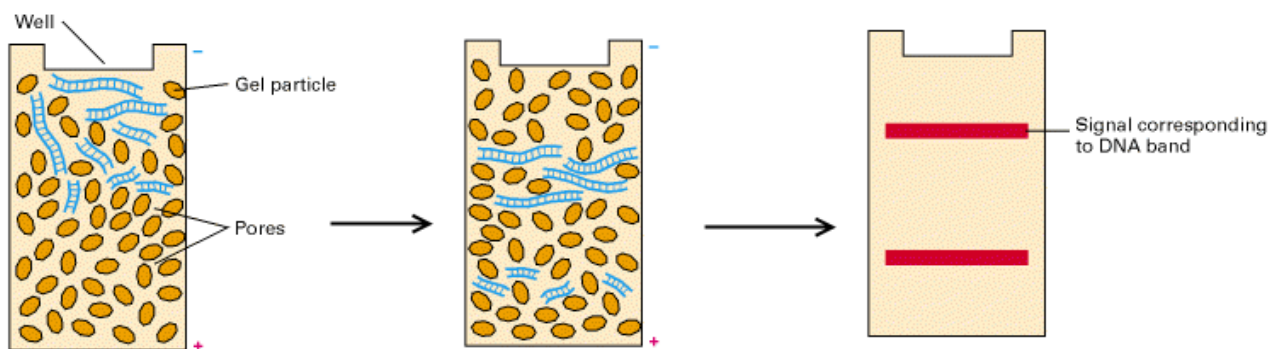
Ingrediens	Mengde
Plasmid	1 µl (200 ng)
Restriksjonsenzym	0.5 µl
10x TA buffer	1 µl
dH ₂ O	Opp til 10 µl

2.2.16 Gel elektroforese

Gel elektroforese er en metode som brukes for å skille både proteiner, DNA og RNA molekyler etter størrelse. I dette studiet ble gel elektroforese brukt for å skille DNA molekyler. Prinsippet bak denne metoden ligger i at DNA er negativt ladet ved nøytral pH (Darnell mfl 1999) Dette kommer av at fosfat gruppen i hvert nukleotid medbringer en negativ ladning. Ved å utsette DNA for et elektrisk felt vil molekylet dermed bli trukket mot den positive pol (Darnell mfl 1999).

Selve gelen man bruket ved gel elektroforese består vanligvis av polyakrylamid eller agarose.

Polyakrylamid og agarose danner såkalte matrix hvor små molekyler kan passere raskere enn store molekyler. Vi bruker dermed elektrisk felt for å trekke DNA molekylene gjennom gel matrix, med det resultat at molekylene skiller seg etter størrelse (se figur 13)(Darnell mfl 1999).



Figur 13. DNA molekyler i en gel elektroforese vandrer med forskjellig hastighet gjennom gel matrix etter hvilken lengde det er på molekylene. Korte molekyler vil vandre raskere enn lange, og dette vises ved forskjellige bånd på gelen (figur modifisert fra Darnell mfl 1999).

For å visualisere DNA molekylene i gelen brukes ethidium bromid. Ethidium bromid binder til DNA ved å plassere seg mellom baseparene i DNA molekylet. Ethidium bromid illuminerer ved utsettelse for ultrafiolett lys, noe som gjør at områder på gelen der det finnes DNA lyser opp (Darnell mfl 1999).

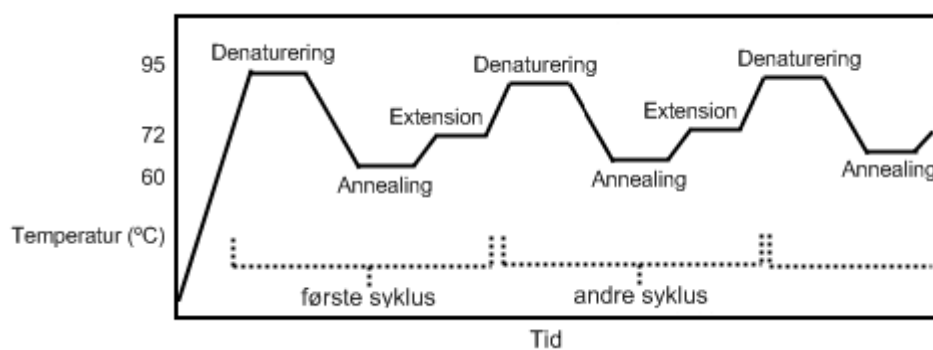
2.2.17 Prosedyre gel elektroforese

1. 1 gram agarose veies ut og blandes med 100 ml 1x TBE buffer.
2. Løsningen varmes opp til den begynner å koke (mikrobølgeovn ~2 minutter).
3. 1 µl Ethidium bromid (0,5 µl/ml) tilsettes.
4. Løsningen helles over i gelstøpeform.
5. Stivnet gel monteres i elektroforesekar.
6. Prøvene tilsettes og gelen kjøres ved 80-100V i ~1 time.

2.2.18 Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR er en metode som brukes for å amplifisere opp spesifikke regioner i en DNA sekvens. Metoden ble første gang beskrevet i 1971 av den norske professoren Kjell Kleppe. Denne publikasjonen ble imidlertid ikke tilstrekkelig anerkjent blant forskere. Senere ble metoden "gjenopdaget" av den amerikanske forskeren Kary Mullis. Mullis mottok i 1993 Nobelprisen i kjemi for oppdagelsen av PCR (Schoch 1994).

Metoden består i at man gjennomfører 25-35 temperatursykluser, hvor hver enkelt syklus består av denaturering, festing til primere (annealing) og elongering ved hjelp av en polymerase (se figur 14) (Gerhardt mfl 1994).



Figur 14. Diagram over temperatursyklusene i en PCR reaksjon. PCR reaksjonen starter med denaturering hvor løsningen varmes opp til ~95 °C med påfølgende annealing som skjer ved ~60 °C og extension ved 72 °C.

Denaturering skjer ved at reaksjonen varmes opp til over ~95 °C. Ved denne temperaturen begynner hydrogenbindingene som holder de to komplementære DNA trådene sammen å bli ustabile, og

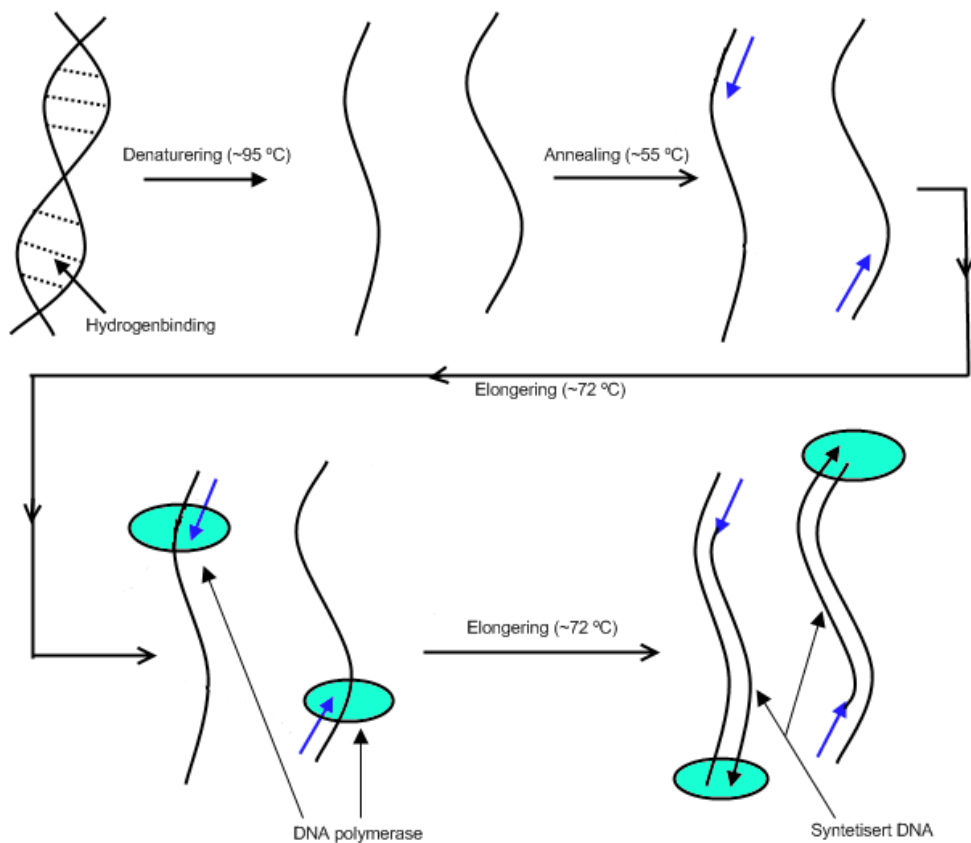
trådene løses fra hverandre (se figur 15). Vanligvis vil ca. 30 sekunder være nok for fullstendig denaturering (Gerhardt mfl 1994).

PCR løsningen går så over i annealingsteget, hvor den blir kjølt ned til 50-65 °C i 20-40 sekunder. Ved denne temperaturen kan hydrogenbindinger redannes. DNA vil ved en korrekt oppsatt reaksjon stort sett bare feste seg til sine respektive DNA primere og ikke sine komplementære DNA tråder. Dette er fordi DNA primerne finnes i større antall i miksturen enn det komplementære DNA (se figur 15) (Gerhardt mfl 1994).

En primer er en kort sekvens av nukleinsyrer. Enzymet som foretar kopieringen av DNA, DNA polymerase, kan bare forlenge eksisterende DNA dobbeltråder med en fri 3'OH ende. For at reaksjonen skal kunne starte trengs derfor DNA primere, som fester seg til komplementære områder på DNA. Områdene der DNA primerne har festet seg danner områder med dobbelt trådet DNA og DNA polymerase kan bare syntetisere nytt DNA herfra.

Til PCR reaksjoner brukes vanligvis primere med lengder på rundt 20 basepar (Gerhardt mfl 1994). Det er viktig at primerne designes for høyest mulig spesifisitet. Hjelpemidler slikt som programmet primer-BLAST kan benyttes for å designe primere for PCR reaksjoner.

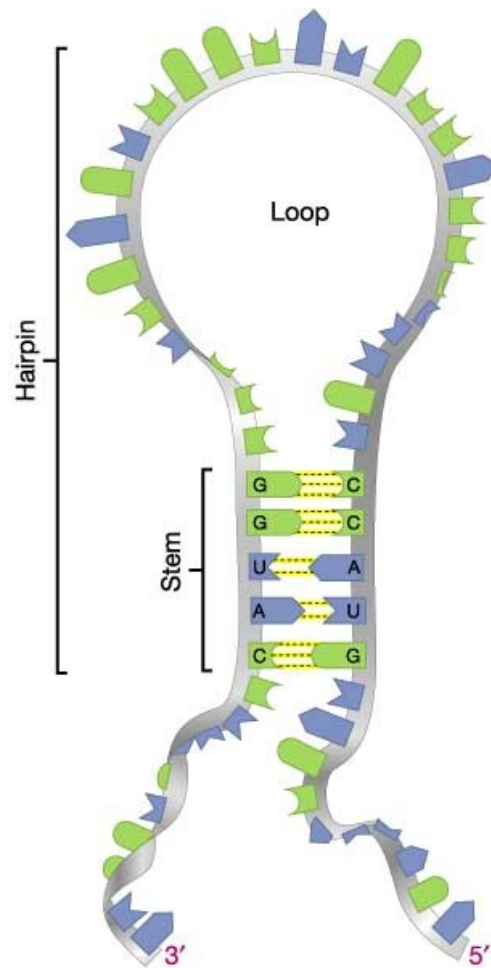
Tredje steg, kalt elongering, varierer litt etter hvilken DNA polymerase man benytter seg av og lengden til sekvensen man skal kopiere. Den vanligste polymerasen som brukes i PCR reaksjoner er *Taq* polymerase. Dette er et enzym som opprinnelig stammer fra den termofile bakterien *Thermus aquaticus*. *Taq* polymerase har en optimal aktivitet på 75-80 °C, og ved bruk av *Taq* polymerasen er 72 °C elongeringstemperatur normalt. Ved elongering fester DNA polymerase seg og syntetiserer nytt DNA av deoksynukleotider (dNTP) molekyler i løsningen (se figur 15). Tommelfingerregelen er at denne syklusen bør være 1 minutt per tusen basepar den ønskede sekvensen er på, men også dette kan variere litt mellom hvilken type DNA polymerase man benytter seg av (Gerhardt mfl 1994).



Figur 15. Oversikt over PCR reaksjonens forskjellige steg. Denaturering skjer ved ~95 °C og fører til at hydrogenbindingen mellom DNA trådene ødelegges og DNA trådene løses fra hverandre. Annealing skjer ved ~55 °C og kjennetegnes ved at primerne fester seg til DNA. Ved elongering fester først DNA polymerase seg til DNA ved primerne. DNA polymerase forlenger så DNA fra primerne.

PCR er en ekstremt effektiv metode. Iløpet av noen få timer kan man kopiere opp flere millioner eksemplarer av sin ønskede DNA sekvens. Dette kommer av at antallet sekvenser øker eksponentielt med hver PCR syklus (2^x kopier hvor x står for antall sykluser) (Darnell mfl 1999).

Noen typer sekvenser kan være vanskelig å kopiere opp ved normal PCR. Dette gjelder for eksempel i tilfeller der man forsøker å amplifisere et område hvor sekundærstrukturer kan dannes. Sekundærstrukturer oppstår når enkelttrådet DNA interagerer med seg selv ved å forme hydrogenbindinger mellom komplementære baser (se figur 16)(Darnell mfl 1999).



Figur 16. Typiske sekundærstrukturer som kan dannes av enkelttrådig DNA (hentet fra <http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/summer2002/rna-loop.jpg>).

Om en DNA sekvens har egenskap for å forme stabile sekundærstrukturer klarer ikke DNA polymerase å kopiere opp sekvensen fullstendig. For å unngå dette kan man tilsette blant annet betain og dimetyl sulfoksid (DMSO) for å optimalisere PCR reaksjonen. DMSO hindrer DNA fra å danne selvkomplementære bindinger, og i dette studiet ble DMSO brukt for problematiske sekvenser.

2.2.19 Prosedyre for PCR reaksjon

1. Komponentene presentert i tabell 12 blandes i PCR rør.
2. Prøvene settes i en "thermal cycler" (PCR maskin) og programmet gitt i tabell 13 kjøres.

Tabell 12. Ingredienser i PCR reaksjon.

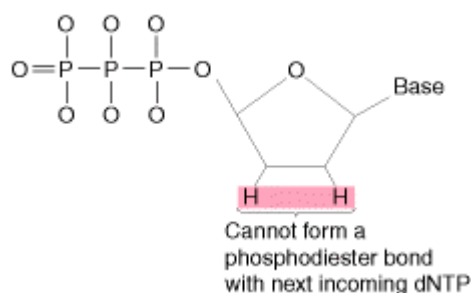
Ingrediens	Mengde
DNA templat	1-10 µl (20 – 50 ng)
dNTP	1 µl (10 mM for hver av basene)
Forward primer	1 µl (0.2 – 1.0 µM)
Reverse primer	1 µl (0.2 – 1.0 µM)
10x Dynazym buffer	5 µl
Dynazym polymerase	1 µl
dH ₂ O	Opp til 50 µl

Tabell 13. Program for PCR reaksjon.

Steg	Temperatur	Tid
1. Initiering	94 °C	4 min
2. Denaturering	94 °C	1 min
3. Annealing	55 °C	1 min
4. Elongation	72 °C	2 min
Tilbake til steg 2, 29 ganger.		
6. Avslutning	72 °C	7 min
7. Pause	4 °C	For alltid

2.2.20 DNA sekvensering

DNA sekvensering benyttes for å finne nukleotidsekvensen på et gitt DNA fragment. Metoden som er brukt her er utviklet av Fred Sanger. Denne metoden går ut på at man gjennomfører en DNA syntese med nærvær av dideoksynukleotider (ddNTP) sammen med dNTP (Griffiths mfl 2002). ddNTP skiller seg fra dNTP ved at de mangler hydroksylgruppen på 3' karbonet (se figur 17). Dette fører til at de ikke kan danne fosfodiesterbånd med innkommende dNTP, og videre syntetisering stoppes (Griffiths mfl 2002).



Figur 17. Dideoxynukleotider mangler 3' hydroksylgruppen og kan dermed ikke forme fosfodiesterbånd (Griffiths mfl 2002).

Ved riktig forhold mellom ddNTP og dNTP i sekvenseringsreaksjonen vil ddNTP vil bli satt inn tilfeldig ved forskjellige steder under syntetisering, og vi vil dermed få dannet DNA fragmenter av forskjellige størrelser. Måten syntetiseringen gjennomføres på er lik PCR reaksjonen, ved at de tre stegene denaturering, annealing og elongering gjennomføres gjentatte ganger. Ved sekvensering har man imidlertid bare en primer per reaksjon.

De fire ulike ddNTP molekylene vil være merket med fluoriserende løsninger av forskjellig farge. Ved å skille DNA båndene med ulik størrelse på en gel kan man så identifisere hvilken base som har terminert syntetiseringen av sekvensen, på bakgrunn av fargen fra den fluoriserende løsningen (Griffiths mfl 2002). Denne analysen ble gjort på en sekvenseringslab ved hjelp av ABI PRISM Genetic Analyser fra Applied Biosystems, og medfølgende Big Dye 3.1 DNA sekvenseringskit.

2.2.21 Prosedyre for sekvenseringsreaksjon

1. Ingrediensene gitt i tabell 14 blandes sammen i PCR rør.
2. Rørene plasseres i en thermocycler og kjøres på program gitt i tabell 15.

Tabell 14. Ingredienser for sekvenseringsreaksjon.

Ingrediens	Mengde
DNA templat	1-10 µl (20 – 50 ng)
Sekvenseringsbuffer	3 µl
Primer	1 µl (0.2 – 1.0 µM)
Big-Dye v3.1	2 µl
dH ₂ O	Opp til 20 µl

Tabell 15. 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. Elongation	60 °C	4 min
Tilbake til steg 2, 24 ganger.		
6. Pause	4 °C	For alltid

2.3 Samfunnsvitenskaplige metoder

De samfunnsvitenskaplige metodene jeg har benyttet meg av i dette studiet er intervju med tre lærere fra videregående skole og et case studie av et elevbesøk ved universitetet. I dette kapittelet tar jeg for meg metodene jeg har benyttet meg av i planleggingen og gjennomføringen i arbeidet.

2.3.1 Kvalitativ og kvantitativ forskning

Kvalitativ og kvantitativ metode er beskrivelser på to ulike tilnærminger til forskningsspørsmål (se tabell 16). I kvantitativ forskning vil man til å begynne med danne en hypotese, som man deretter tester ut ved hjelp av empiriske data. I utprøvingen, eller falsifiseringen av hypotesen fokuserer man på enkelte, utvalgte variabler og beskriver enheter i statistisk representative utvalg (Andersen 1997). Hensikten er å måle og kvantifisere, og data må derfor klassifiseres etter objektive kriterier.

I kvantitativ forskning ligger det gjerne et deterministisk syn til grunn, altså at alle hendelser har en eller flere årsaker. Således leter kvantitative studier etter sammenhenger som kan gjøre oss i stand til å forutse og generalisere fenomener, og resultatene presenteres helst i form av kvantitative data (Johnson og Christensen 2007).

Kvalitative studier på den andre siden brukes oftest i utredninger rundt tema eller fenomen det fra før finnes lite kunnskap om. Man bruker kvalitativ forskning til å beskrive det man ser og ut fra dette komme opp med nye hypoteser og teorier (Johnson og Christensen 2007). Resultater fra kvalitative studier er ikke absolutte påstander om hvordan virkeligheten er, men forslag til hvordan virkeligheten kan beskrives og forstås. Dette vil si at kvalitativ forskning ikke tar sikte på samme grad av generalisering som kvantitative studier. I kvalitativ forskning samles data i form av intervju, observasjon og loggføring, og resultatene presenteres oftest i form av tekst og bilder (Kvale 1997).

Tabell 16. Noen viktige forskjeller på kvalitativ og kvantitativ metode (tilpasset fra Johnson og Christensen 2007).

	Kvalitativ	Kvantitativ
Forskningsmetode	Dynamisk – generering av hypoteser og problemstillinger underveis i arbeidet. "induktiv" metode	Hypotetisk deduktiv – testing av hypotese
Formål	Utforske, oppdage og beskrive	Beskrive, forklare og forutse
Observasjonsgrunnlag	Naturlige omgivelser, mange ulike variabler slik de opptrer naturlig	Kontrollerte omgivelser, kontrollere variabler
Vanlig datamateriale	Ord, bilder	Talldata, variabler

Metodene som er benyttet i dette studiet er i hovedsak kvalitative, gjennom bruk av kvalitative intervju og case studie. Målet med det didaktiske arbeidet er derfor ikke å generalisere, men å få et innblikk i ulike tilnærminger til bioteknologiundervisning, og fordeler og ulemper ved disse.

2.3.2 Case-studie

Et Case-studie er en kvalitativ forskningsform der man tar utgangspunkt i og utforsker et eller flere case (Johnson og Christensen 2007). Som med annen kvalitativ forskning vil et case studie gjerne starte induktivt, ved at dannelsen av hypoteser og teori kommer underveis i studiet (Andersen 1997). Dette står i forskjell til kvantitativ forskning der man har en hypotetisk deduktiv tilnærming, altså man har allerede dannet en hypotese som man ønsker å verifisere/falsifisere.

I dette case-studie kom 6 videregående elever på besøk hit til UiT for å gjennomføre et praktisk opplegg i bioteknologi. Informantene er de besøkende elevene, og data er samlet inn gjennom spørreskjema, intervju og observasjon av elevene (se tabell 17). Spørreskjema ble utsendt til elevene i forkant av besøket, der de fikk svare skriftlig på spørsmål angående forkunnskap og forventning. På slutten av dagen da opplegget var gjennomført fikk så elevene utdelt spørsmål angående dagen. Spørsmålene ble besvart skriftlig av elevene, og i tillegg ble de diskutert i plenum.

Tabell 17. Universitetsbesøk case.

Case: Universitetsbesøk i bioteknologi	
Informanter	Seks besøkende elever
Datainnsamling	Spørreskjema, intervju og observasjon

2.3.3 Kvalitativt forskningsintervju

Et kvalitativt forskningsintervju fortone seg som en samtale hvor forskeren ønsker å få fatt på intervjuobjektets innsikt, tolkning og beskrivelse av tema som ligger til grunn for intervjuet (Kvale 1997). Samtalen er imidlertid ikke mellom likestilte parter, ettersom det er forskeren som definerer og kontrollerer situasjonen. Et slikt intervju vil preges av en viss spontanitet, gjennom at forskeren kritisk følger opp intervjuobjektets svar på spørsmålene (Kvale 1997). Av dette følger det at analysen og refleksjonen av intervjuet starter allerede under intervjuet, gjennom forskerens oppfølgingsspørsmål.

Kvale (1997) deler intervjuforskning inn i sju stadier, og i dette studiet er disse stadiene benyttet i planlegging og gjennomføring av intervju (se tabell 18).

Tabell 18. Intervjuforskningens sju stadier, tilpasset fra Kvale (1997:85).

1. Tematisering	Formuler undersøkelsens formål og beskriv emnet for undersøkelsen.
2. Planlegging	Planlegg undersøkelsens sju stadier, med hensyn til hvilken kunnskap som ønskes.
3. Intervju	Gjennomfør intervjuet ifølge intervjuguiden med en reflekterende tilnærming til den ønskede kunnskapen og de mellommenneskelige relasjonene i intervjusituasjonen.
4. Utskrift	Forbered intervjumaterialet for analyse, altså overføring av resultatene til skriftspråk.
5. Analyse	Avgjør ut ifra undersøkelsens formål hvilke analysemetoder som er nødvendig for intervjuene.
6. Verifisering	Undersøk resultatenes generaliserbarhet, reliabilitet og validitet.
7. Rapportering	Rapporter resultatet av undersøkelsen og de anvendte metodene i en form som innfrir de vitenskapelige kriteriene.

Tematiseringen for intervjuene jeg har gjort er beskrevet gjennom problemstillingen for denne oppgaven. Gjennom lærerintervjuene ønsket jeg kunnskap om hvordan de intervjuede lærerne gjennomfører undervisning i bioteknologi, mens det i elevsamtalen ble fokusert på elevenes

forventninger og opplevelser til universitetsbesøket. Disse to punktene danner grunnlaget for planleggingen av intervjuene.

Det er i dette studiet blitt gjennomført intervjuer med biologilærere ved to ulike videregående skoler. Det ene intervjuet ble gjennomført ved et besøk ved den aktuelle skolen, hvor intervjuet ble gjort parallelt med at jeg fikk en omvisning på skolens fasiliteter og undervisningsmateriell for biologi. Svarene for dette intervjuet ble nedtegnet som stikkord under intervjuet og bearbeidet og skrevet ut like i etterkant av besøket.

Det andre intervjuet ble gjennomført ved at den aktuelle læreren svarte på et spørreskjema via epost, med en påfølgende oppfølgingsamtale over telefon. Også i dette intervjuet ble svarene skrevet ned som stikkord under intervjuet og videre bearbeidet etter samtalen.

Det ble også gjennomført intervju med elevene ved gjennomføringen av universitetsbesøket. Elevsamtalen ble gjennomført på slutten av dagen ved universitetsbesøket. Elevene fikk først svare på spørreskjema skriftlig, før vi gikk gjennom disse spørsmålene muntlig i plenum. Her ble svarene derfor skrevet ned skriftlig av elevene, samtidig som jeg skrev stikkord under intervjuet med elevene.

De videre punktene i intervjuforskningens sju stadier, analyse, verifisering og rapportering er tema i de følgende kapitler i oppgaven. Analysen går ut på å tolke svarene fra intervjuene som er gjort. I min analyse har jeg prøvd å få fram meningen i intervjuene, og denne tolkningen er beskrevet i mine resultater og diskusjon. Underveis er det også fortløpende gjort vurderinger rundt resultatenes reliabilitet og validitet. Kort sagt handler reliabilitet og validitet om en vurdering av i hvilken grad man kan stole på resultatene. Denne vurderingen er også presentert gjennom resultatene og diskusjonen.

Rapporteringen er gjort i form av ren tekst med sitater hentet fra intervjuene. Disse er presentert i resultatdelen.

2.3.4 Observasjon

I tillegg til intervju og spørreskjema ble elevene også observert, og refleksjoner fra denne observasjonen vil ha innflytelse på analysen av resultatene i case-studiet.

I pedagogisk sammenheng er det vanlig å beskrive observasjon som oppmerksom

iakttakelse. Dette betyr at man på en konsentrert måte forsøker å observere noe som har pedagogisk betydning (Bjørndal 2002). Vi kan dele observasjon opp i første og andre orden. I observasjon av første orden er observatørens eneste oppgave observeringen, mens i observasjon av andre orden har observatøren andre roller i tillegg, slik som undervisning eller veiledning (Bjørndal 2002). I dette studiet er det andre ordens observasjon som er gjennomført, gjennom at observasjonene er gjort av meg selv som samtidig stod for opplegget ved elevbesøket.

Det er ulike faktorer som påvirker en observasjons kvalitet. Dette gjelder observatørens egenskaper til å observere ting som de faktisk er, og hans evne til å forstå hvordan han som observatør påvirker selve observasjonen (Bjørndal 2002).

Under elevbesøket her på universitetet var fokuset for observasjonene å vurdere hvordan opplegget fungerte. Forstod og fikk elevene til det de skulle gjøre? I tillegg ønsket jeg å vurdere hvordan motivasjonen til elevene var. Observasjonene ble registrert gjennom en logg som jeg skrev på slutten av dagen etter at elevene var dratt hjem.

2.3.5 Gjennomføring av elevbesøk

For gjennomføringen av skolebesøket kom seks biologi 2 elever hit til universitetet. Disse elevene kom fra to forskjellige skoler i distriktet. Øvelsen som skulle gjennomføres her ved universitetet var en såkalt DNA fingerprinting (genetisk fingeravtrykk) øvelse. Denne øvelsen fortøner seg ved at man først kjører en PCR reaksjon for så å kjøre resultatene av denne på en agarose gel. For å forstå disse metodene trenger man kunnskap om egenskaper til DNA, i tillegg til prinsipper bak PCR og agarose gel. Det trengs også kunnskap om hvorfor DNA egner seg til å skille mellom ulike individer.

Siden elevene kom fra forskjellige skoler, og at det bare var noen få elever fra hver skole som kom på besøk til oss, ble det ikke gjort noen spesifikke forberedelser for besøket på de respektive skolene. Elevene hadde imidlertid det studiespesialiserende faget biologi 2 som programfag, slik at en viss bakgrunnskunnskap om DNA og bioteknologi kunne forventes. Det ble også laget et kort forberedelseskompedium som ble sendt til elevene halvannen uke i forkant av besøket. Dette kompendiet inneholdt bakgrunnskunnskap og internettlinker for de aktuelle metodene vi skulle gjennomføre (se appendiks 1). I tillegg ble det laget et lite spørreskjema med spørsmål rundt elevenes forkunnskaper og forventninger til universitetsbesøket. Disse spørsmålene svarte elevene på i forkant av besøket.

I produksjonen av forberedelseskompediumet ble det lagt vekt på at det skulle være kort og

konsist. Målet var at elevene skulle få en kort presentasjon av tema for dagen, og at de gjennom de oppgitte internettlinkene kunne få en dypere forståelse for temaet.

Videre ble det laget en plan for dagen (tabell 19), en historie rundt fingerprintingøvelsen (appendiks 2) og oppskrift for fremgangsmåtene til arbeidet elevene skulle gjøre (figur 18). Dette ble utdelt til elevene på starten av dagen.

Tabell 19. Dagsplan for elevbesøk.

Klokkeslett	Aktivitet
09.00	Oppmøte
09.15 – 10.00	Foredrag rundt dagens tema
10.15 – 12.00	Labarbeid : Tillaging og start PCR + Støping og start av agarose gel
12.00 – 12.30	Lunsj
12.30 – 13.00	Foredrag om aktuelle tema ved IB
13.15 – 14.00	Vi tar bilde av gel og prøver å finne den skyldige
14.15 – 15.00	Gjennomgang av dagen, besvarelse på spørsmål

Foredraget rundt dagens tema tok sikte på å utdype temaene introdusert i forberedelseskompndiet elevene hadde fått utdelt på forhånd. Dette foredraget ble utarbeidet som et populærvitenskaplig foredrag, hvor dialog mellom meg som foreleser og elevene ble prioritert. På denne måten kunne jeg orientere meg om elevenes forkunnskaper og ytterligere forventninger for dagen.

Det eksperimentelle forsøket ble gjort ved at elevene ble delt inn i tre grupper med to elever i hver gruppe. De fikk så arbeide selvstendig, mens jeg gikk rundt og hjalp til der det trengtes. Elevene arbeidet etter prosedyre gitt i figur 18.

Etter lunsj fikk elevene være med en førsteamenuensis fra Institutt for Biologi for å få informasjon om aktuell forskning ved instituttet, før vi avsluttet arbeidet på laboratoriet.

På slutten av dagen svarte elevene på spørsmål vedrørende besøket, og vi tok en samtale i plenum om hvordan dagen hadde vært og hva de hadde lært.

Fremgangsmåte for elevforsøk**Utdelte rør er merket som følger:**

<u>Jokkes DNA</u>	: DNA1	<u>DNA polymerase</u>	: Poly
<u>Camillas DNA</u>	: DNA 2	<u>dNTP</u>	: dNTP
<u>Beates DNA</u>	: DNA 3	<u>Forward primer</u>	: Forw
<u>Mistenktes DNA</u>	: DNA 4	<u>Reverse primer</u>	: Rev
		<u>Buffer</u>	: Buffer
		<u>dH₂O</u>	: dH ₂ O

PCR oppskrift

Reagens	Per PCR rør
dNTP	5 µl
Forward primer	5 µl
Reverse primer	5 µl
Buffer	5 µl
DNA polymerase	5 µl
dH ₂ O	15 µl
Tilsammen	40 µl

1. Finn fram 4 tomme PCR rør og merk de med 1 (Jokke), 2 (Camilla), 3 (Beate) og 4 (mistenktes DNA).
2. Ha riktig mengde av reagensene fra PCR oppskriften i hvert av de 4 PCR rørene. Hold rørene på is.
3. Tilsett 10 µl DNA til PCR rørene. Jokkes DNA skal i rør nr 1, Camillas DNA skal i rør 2 osv. Her er det viktig at det blir rett, ellers kan feil gjerningsmann bli tatt! Spør om hjelp hvis du er usikker.
4. Pipetter forsiktig litt opp og ned slik at løsningen blandes godt.
5. Sett rørene i PCR maskinen og kjør prøvene på følgende program:
 1. Initierting: 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 35 ganger
 5. Endelig elongering: 72 °C, 16 min
 6. Pause: 8 °C for alltid.
7. Tilsett 1 µl Loading buffer til de ferdige PCR rørene.
8. Tilsett DNA ladder og PCR prøvene i hver sine brønner på agarose gelen.
9. Kjør ved 80V ca. 75 minutter.
10. Ta bilde av gel og forsøk å finne den skyldige i gåten.

Støping av agarose gel

1. Vei opp 1 gram agarose og bland dette med 100 ml 1x TBE buffer.
2. Varm løsningen opp til den begynner å koke (mikrobølgeovn ~2 minutter).
3. Tilsett 1 µl Ethidium bromid.
4. Hell gelen i gelstøpeformen.
5. La gelen stivne og monter den så i gel elektroforese karet.

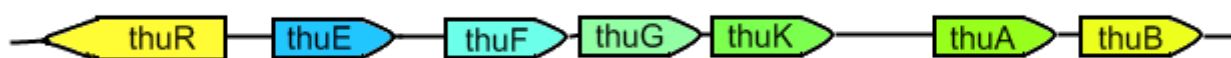
Figur 18. Fremgangsmåte for elevene ved DNA fingerprintingøvelsen.

3. Resultater

I dette kapittelet presenterer jeg først resultatene fra arbeidet med *A. tumefaciens* før jeg går over til resultater av intervjuer og elevbesøk.

3.1 Resultater fra laboratoriearbeidet

Tidligere studier (Jensen mfl 2002; Jensen mfl 2005) har avdekket 7 gener (se figur 19) som koder for proteiner involvert i trehalose transport og katabolisme i *S. meliloti*.



Figur 19. Gener involvert i trehalose katabolisme hos bakterien *S. meliloti*.

I mitt arbeid ble det *thuB* lignende genet *palB* hos *A. tumefaciens* forsøkt slått ut, og det ble arbeidet med karakterisering av *palB* genet.

3.1.1 Transformering av *A. tumefaciens*

I tidligere studier har det blitt isolert et fragment på 582 bp fra *thuB* genet hos *S. meliloti*. Dette fragmentet var så klonet inn i plasmidet pVIK112, og ga opphav til plasmidet pThuB582. pThuB582 ble transformert inn i *E. coli*.

thuB har som beskrevet i teoridelen homologi med genet *palB* hos *A. tumefaciens*. For å slå ut *palB* ble det forsøkt homolog rekombinasjon mellom disse to genene.

Transformert *E. coli* inneholdende pThuB582 ble dyrket sammen med *A. tumefaciens* for overføring av pThuB582 til *A. tumefaciens* via av konjugasjon mellom de to bakteriene. Deretter ble cellene overført til rif²⁰ kan⁵⁰ agar seleksjonsplater for å selekere for transformerte *A. tumefaciens*. *A. tumefaciens* stammen som ble brukt til dette var på forhånd gjort resistent mot rifampicin (se kap 2.2.5 og 2.2.6). Bakterier der den homologe rekombinasjonen var vellykket skulle derfor både ha rifampicin og kanamycin resistens, slik at kun korrekt transformerte bakterier vil ha mulighet til å gro i seleksjonsmediet.

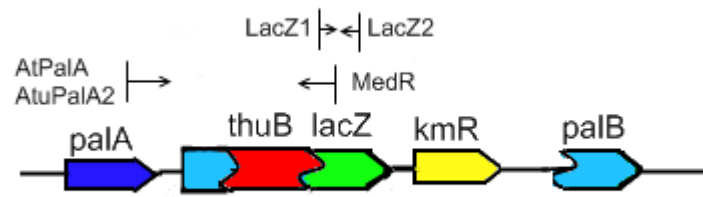
Resultatet av dette ble til sammen 8 kolonier som ble plukket og spredt utover nye seleksjonplater. Kolonier fra disse platene ble så dyrket i flytende seleksjonsmedie, og genomisk DNA fra disse kulturene ble rensset opp. DNA konsentrasjoner ble målt spektrofotometrisk (se tabell 20).

Tabell 20. Målte konsentrasjoner av rensset DNA fra transformert og villtype *A. tumefaciens*.

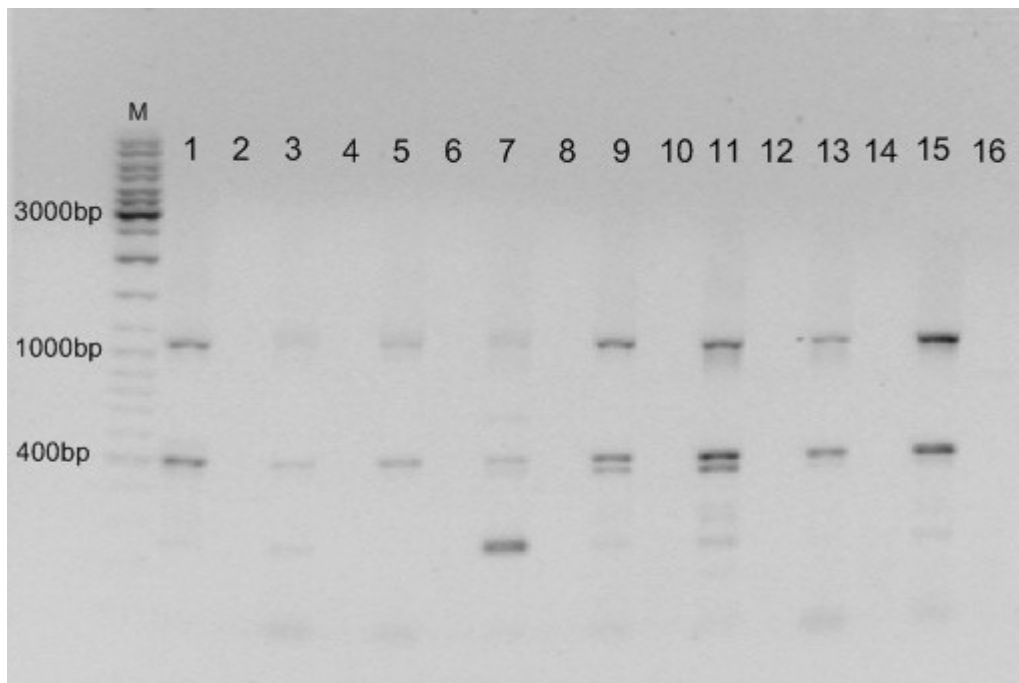
	Prøve	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	ng/ µl
Transformert <i>A. tumefaciens</i>	1	2,14	2091,41
	2	2,15	597,68
	3	2,15	560,22
	4	2,13	600,95
	5	2,16	728,56
	6	2,09	329,21
	7	2,17	913,62
	8	2,15	833,04
Villtype <i>A. tumefaciens</i>	9	2,08	250,69
	10	2,06	232,89

Tabell 18 viser DNA konsentrasjoner av rensset DNA fra transformert og villtype *A. tumefaciens* i ng/µl. Vi ser at konsentrasjonen varierer endel mellom de ulike prøvene, men at forholdet OD₂₆₀/OD₂₈₀ er forholdsvis likt mellom prøvene. DNA absorberer lys ved en bølgelengde på 260 nm, mens proteiner absorberer lys ved 280 nm. Parameteren OD₂₆₀/OD₂₈₀ brukes derfor som en indikasjon på renheten av DNA prøven. Ved OD₂₆₀/OD₂₈₀ verdier >1,5 regnes det rensede DNA for å være tilstrekkelig rent, dvs proteinmengden i prøven er tilstrekkelig lav, og videre analyser av DNA kan gjennomføres. Vi ser av tabell 18 at alle prøvene har OD₂₆₀/OD₂₈₀ verdier godt over denne grenseverdien. Det rensede DNA er derfor tilstrekkelig rent.

Det ble så forsøkt å amplifisere opp det rekombinerte området av genomet ved hjelp av de to primer kombinasjonene AtPalA + MedR og AtuPalA2 + MedR. AtPalA og AtuPalA2 er designet for å feste seg i slutten av *pala* genot mens MedR primeren fester seg i i *lacZ* genot (se figur 20).



Figur 20. Festepunkter til primere brukt av amplifisering for rekombinert sekvens hos *A. tumefaciens*. AtPalA og AtuPalA2 fester seg i slutten av *palA* genet mens MedR primeren fester seg i *lacZ* genet.



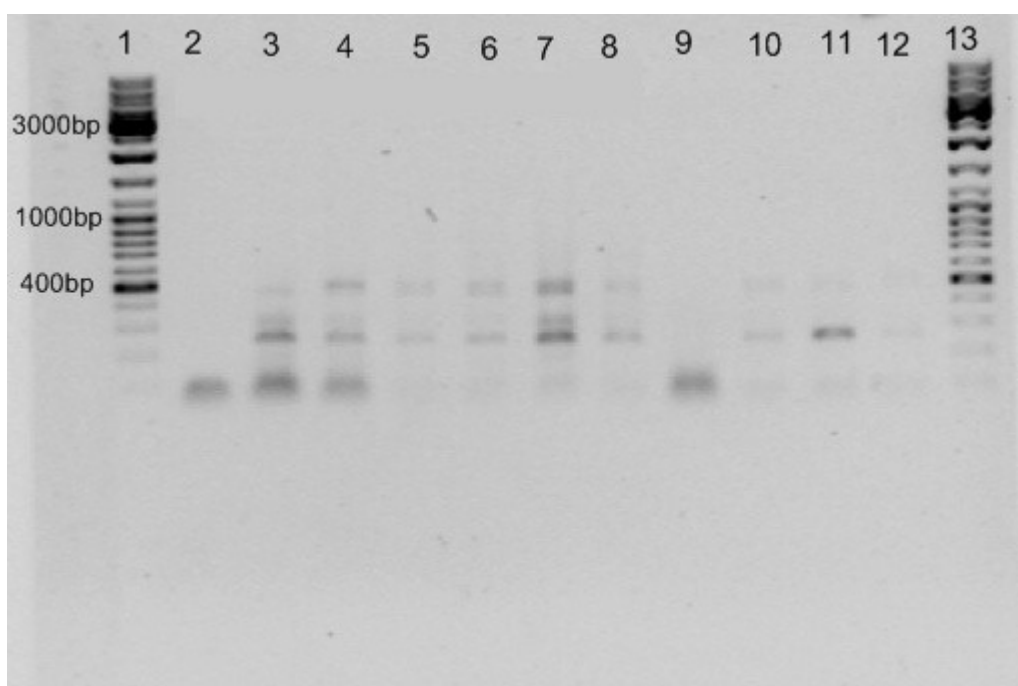
Figur 21. PCR på rensset DNA fra transformerte *A. tumefaciens*. Brønn 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 og 15 ble amplifisert med AtpalA og MedR primere, mens brønn 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 og 16 ble amplifisert med AtuPalA2 og MedR primere. Brønn M: Generuler DNA ladder mix, Brønn 1 og 2: DNA fra koloni 1, brønn 3 og 4: DNA fra koloni 2, brønn 5 og 6: DNA fra koloni 3, brønn 7 og 8: DNA fra koloni 4, brønn 8 og 10: DNA fra koloni 5, brønn 11 og 12: DNA fra koloni 6, brønn 13 og 14: DNA fra koloni 7, brønn 15 og 16: DNA fra koloni 8.

Dataene presentert i figur 21 viser at prøvene amplifisert med AtPalA og MedR primerne genererte DNA fragmenter med størrelser ~1000 bp og ~400 bp. Siden vi ikke kan vite nøyaktig hvor i *palB* genet pThuB582 er satt inn, vet vi ikke nøyaktig forventet størrelse av reaksjonen. Det eneste vi kan si er at fragmentet må være over 582 bp. Det er derfor mest sannsynlig at båndene rundt 1000 bp er

det ønskede fragmentet.

I tillegg kan vi se antydning til fragmenter av enda mindre størrelser i noen av brønnene, spesielt brønn 7. Prøvene som ble amplifisert med AtPalA2 og MedR primere inneholder ingen bånd. AtPalA2 ble derfor ikke benyttet videre i studiet.

På grunn av at det ble amplifisert opp flere bånd i alle prøvene ble det antatt at det skjedde uspesifikk binding mellom primere og DNA. Forsøket ble derfor gjentatt flere ganger med variasjon i annealingtemperatur mellom 55 og 60 °C, i et forsøk på å unngå uspesifikk binding av primere.

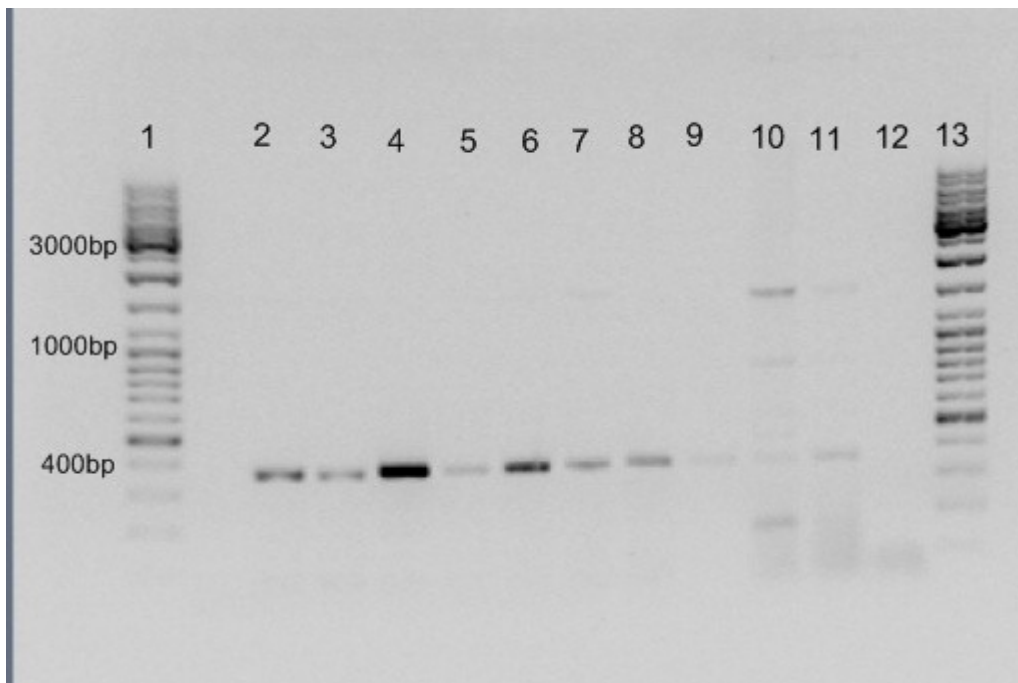


Figur 22. PCR på opprensket DNA ved 60 °C annealingtemperatur. Brønn 1 og 13: GeneRuler DNA ladder mix, Brønn 2-9: Opprensket DNA fra transformert *A. tumefaciens* amplifisert med AtPalA og MedR primere. Brønn 10 og 11: Opprensket DNA fra villtype *A. tumefaciens* amplifisert med AtPalA og MedR primere. Brønn 12: Negativ kontroll.

Figur 22 viser at økt annealing temperatur fører til at vi mister båndet på ~1000 bp og kun bånd fra 400 bp og nedover observeres på gelen. Vi ser at noen av de mindre båndene også genereres med DNA fra i villtype *A. tumefaciens* (brønn 10 og 11). Båndene på ~400 bp er imidlertid spesifikk for transformert *A. tumefaciens* (brønn 2-9), bortsett fra brønn 2 og 9 hvor det ikke har blitt dannet produkt i det hele tatt. Forventet størrelse er som sagt usikker, men over 582 bp. Det var derfor forventet at båndet på 1000 bp fra figur 21 skulle vedvare med økt annealingtemperatur. Resultatene fra PCR reaksjonene er derfor vanskelig å tolke.

Lignende problemer med PCR amplifisering av *palB* fragmentet er observert i tidligere studier (Ampomah, upublisert data), og bakgrunnen for disse problemene er undersøkt nærmere i kapittel 3.2.1.

Bakteriene var dyrket på seleksjonsplater, slik at vi var sikre på at vi hadde transformanter. Men siden ingen av PCR reaksjonene som ble gjennomført ga noen klare svar valgte vi å gjennomføre en PCR reaksjon med primere for å amplifisere opp *lacZ* regionen (se figur 5) av det transformerte DNA. Primerne vi brukte for å gjøre dette var LacZ1 og LacZ2 (se figur 20), som amplifiserer opp et fragment på ~350 bp av *lacZ* genet.



Figur 23. Amplifisering av *lacZ* region fra genomisk DNA av transformerte *A. tumefaciens*. Brønn 1 og 13: Generuler DNA ladder mix, brønn 2-9: rensket DNA fra transformert *A. tumefaciens*, brønn 10 og 11: rensket DNA fra villtype *A. tumefaciens*, brønn 12: Negativ kontroll.

I figur 23 ser vi at brønnene 2-9 inneholder sterke bånd i underkant av 400bp. Forventet størrelse var 350bp, slik at dette stemmer bra med forventningene. Vi ser også antydninger til uspesifikk binding, men allikevel en stor forskjell mellom villtype og transformert *A. tumefaciens*. Denne uspesifikke bindingen kan komme av at *A. tumefaciens* naturlig har et β -galaktosidase gen med lignende sekvens som i pThuB582 plasmidet. Vi kan allikevel fra dette med rimelig sikkerhet si at transformasjon har skjedd.

3.1.2 Karakterisering av *palB* fragmentet

I tidligere studier av *palB* har sekvensen vist seg vanskelig å amplifisere ved hjelp av PCR. De samme erfaringene ble gjort i dette studiet etter gjennomføring av mange PCR reaksjoner. Tidligere arbeid (Ampomah, upublisert data) har resultert i et ~1000 bp isolert *palB* fragment, men dette fragmentet har også vist seg vanskelig å karakterisere ved hjelp av sekvensering.

Det ble derfor bestemt å jobbe videre med dette fragmentet, for å undersøke bakgrunnen for problemene med PCR og sekvensering, og dermed også problemene med å verifisere transformantene. *palB* og *thuB* er som sagt homologe sekvenser, og egenskapene til de to sekvensene regnes derfor å være de samme.

palB sekvensen (Ampomah, upublisert data) ble klonet inn i TOPO vektor og transformert inn i elektrokompetente One Shot TOP10 *E. coli* celler ved hjelp av Invitrogen TOPO TA kloningsverktøy for å undersøke om amplifisering direkte fra dette plasmidet kunne gi resultater.

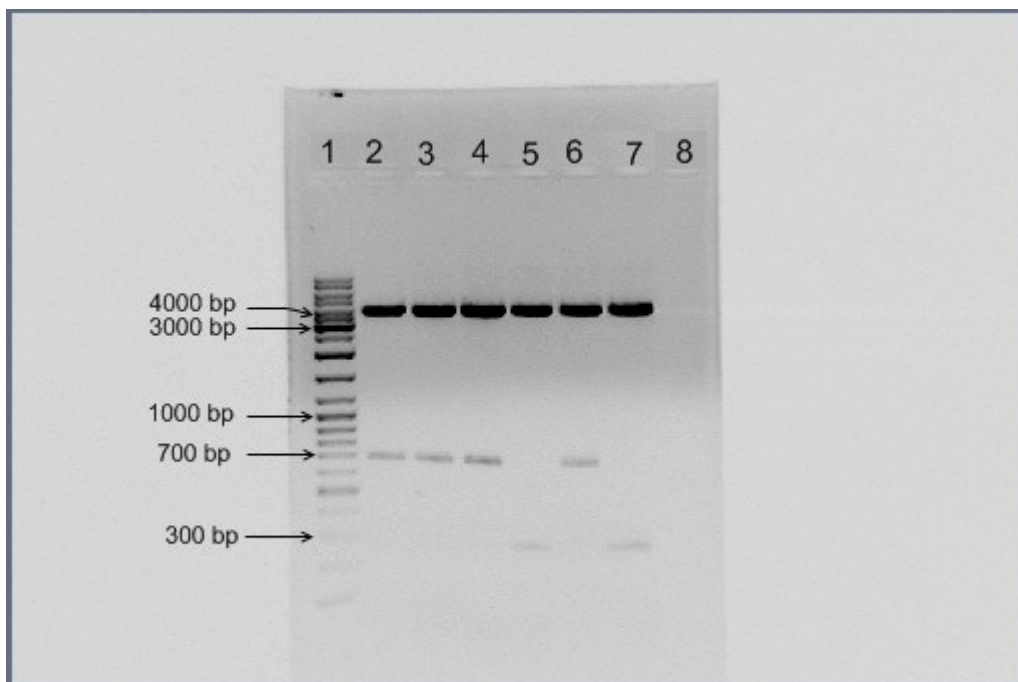
Transformasjon av *E. coli* med TOPO plasmid med innsatt *palB* fragment resulterte i ~400 kolonier på hver plate, hvor rundt 30 kolonier per plate var blå (se tabell 21). Blåfarge indikerer at cellene ikke har fått riktig innsett, siden korrekt innsett vil slå ut *lacZ* genet som er opphav til den blå fargen ved dyrking i nærvær av X-gal (se kapittel 2.5.5). Vi ser også at det har oppstått henholdvis 14 og 6 kolonier på platene der *palB* fragmentet ikke var tilstede, og null kolonier på negativ kontroll. Den positive kontrollen resulterte i teppevekst i mediet. Den positive kontrollen ble gjort for å verifisere at våre celler er kompetente og at elektroporeringen fungerer.

Tabell 21. Resultater transformasjon av elektrokompetente *E. coli* celler.

	Plate	Antall	Antall blå
1.	TOPO + <i>palB</i> fragment	401	32
2.	TOPO + <i>palB</i> fragment	379	27
3.	TOPO (selvligering)	14	9
4.	TOPO (selvligering)	6	4
5.	Negativ kontroll	0	0
6.	Positiv kontroll (pUC)	>1000	>1000

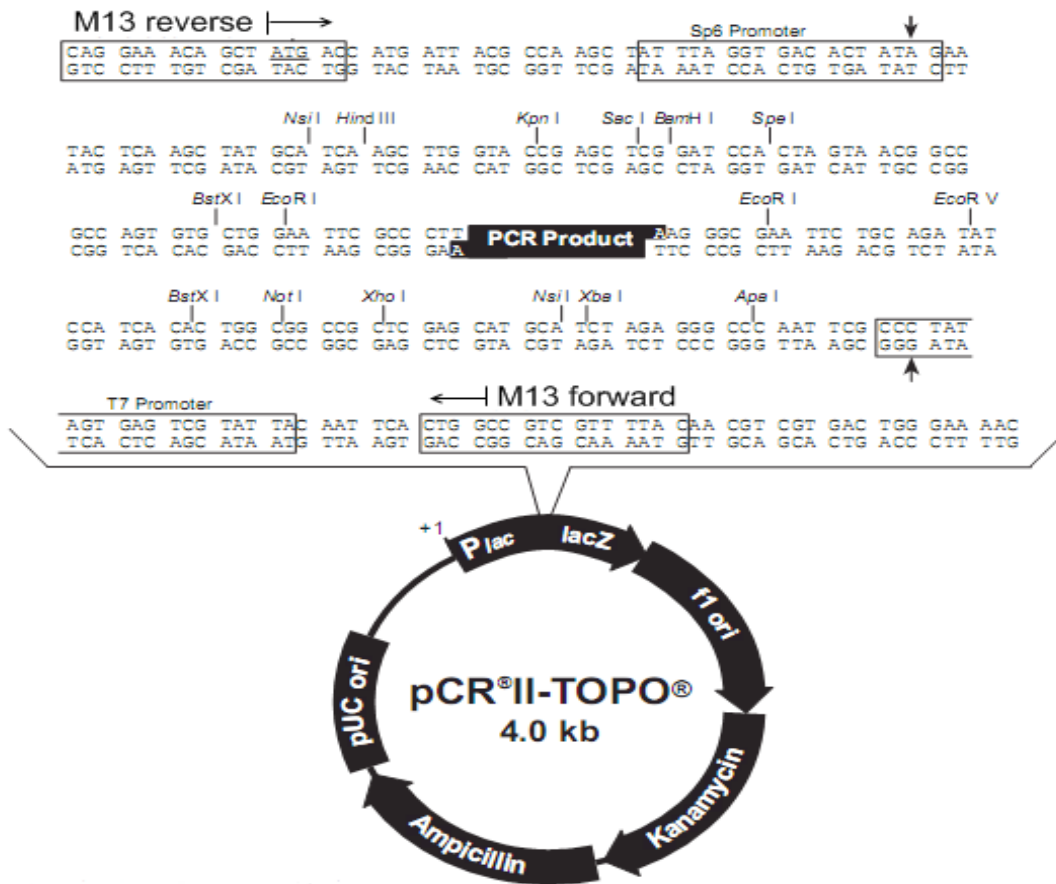
6 kolonier fra plate 1 og 2 ble plukket og dyrket opp i flytende LB kan⁵⁰ medie. Plasmider fra disse

kulturene ble rensed ifølge Birnboim og Doly metoden (Birnboim og Doly 1979). Det rensede DNA ble så restriksjonskuttet ved hjelp av *EcoRI*. TOPO plasmidet inneholder *EcoRI* seter direkte foran og bak setet hvor PCR fragmentet ble klonet inn (se figur 25). I tillegg har *palB* et *EcoRI* sete 199bp nedstrøms for 5' enden av fragmentet. Vi forventer dermed å få kuttet ut et DNA fragment på ~800 bp ved *EcoRI* restriksjonskutting. TOPO plasmidet har en størrelse på 3,9 kbp, og vi ser av figur 24 at alle prøvene inneholder plasmidet representert ved de sterke båndene på ~4 kbp. Vi ser videre at alle prøvene unntatt prøve 5 og 7 også inneholder bånd på ~700 bp. Ved sekundærstrukturdannelse vil DNA fragmenter bevege seg lettere i gel matrix, og dermed vandre lengre enn antatt under gel elektroforese. Dette kan forklare båndet på 700 bp istedenfor den forventede størrelsen 800 bp. 700 bp båndet regnes derfor for å stamme fra fragmentet på 800 bp. Brønn 5 og 7 har bånd i underkant av 300 bp, og det kan dermed tyde på at disse plasmidene ikke har korrekt innsett.



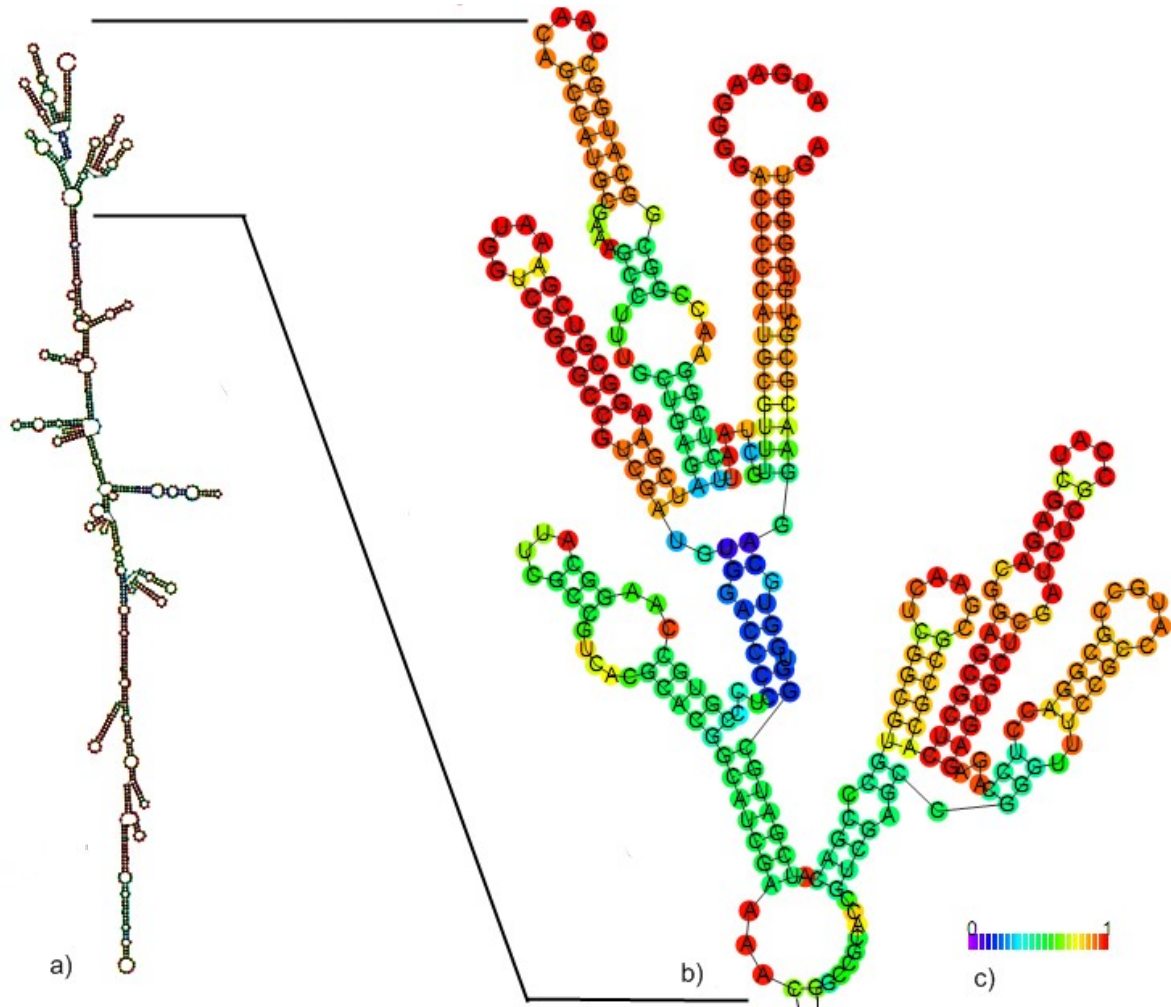
Figur 24. Restriksjonskutt av opprensede plasmider fra transformerte *E. coli*. Brønn 1: GeneRuler DNA ladder mix, brønn 2-7: Renset plasmid fra 6 forskjellige kolonier kuttet med *EcoRI*, brønn 8: negativ kontroll.

Det ble også gjennomført en PCR reaksjon med M13 forward og revers primere (se figur 25) for ytterligere verifisering av korrekt transformasjon, men disse reaksjonene ga i likhet amplifiseringene fra *A. tumefaciens* genom uklare resultater (data ikke vist).



Figur 25. Skjematisk beskrivelse av pCRII-TOPO plasmidet, med restriksjonsenzymseter og festepunkter for primere. M13 primerne fester seg om lag 100 bp foran og bak PCR insettet (tilpasset fra (Invitrogen Corporation 2006).

For å finne grunnen til de dårlige resultatene fra PCR amplifiseringene, ønsket vi å undersøke *palB*'s evne til å danne sekundærstrukturer. Dannelse av hairpin og stem loops (se figur 16) kan forstyrre effektiviteten til PCR reaksjoner. Vi ønsket derfor å undersøke om *palB* har potensiale til å danne slike sekundærstrukturer. For å gjennomføre dette ble dataprogrammene mFold og RNAfold benyttet. Disse programmene predikerer sekundærstruktur ut i fra en lineær DNA eller RNA sekvens.

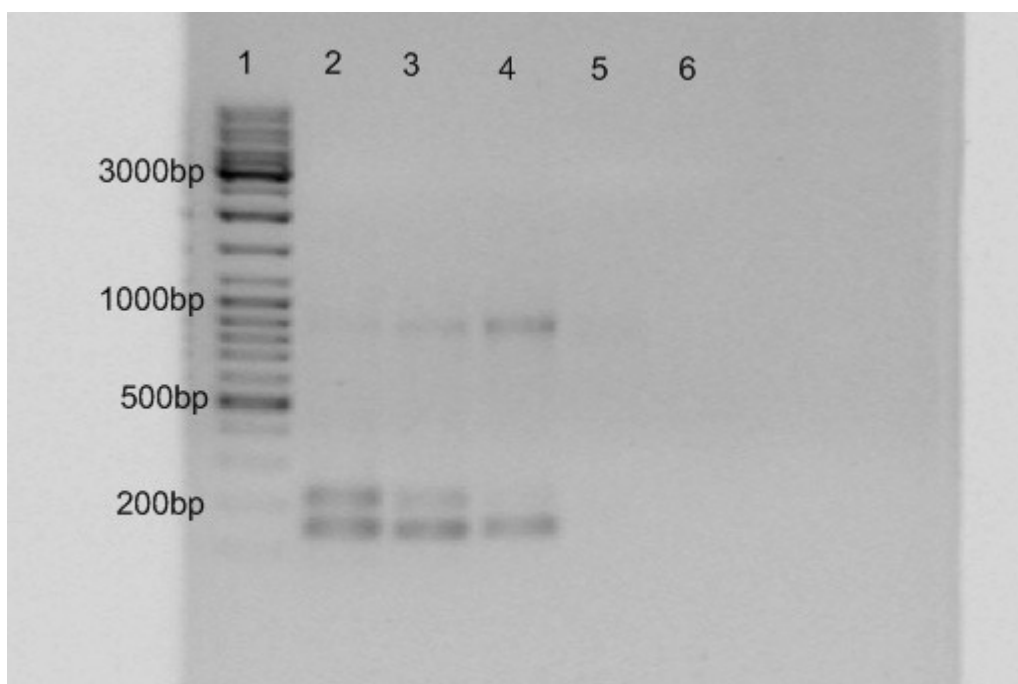


Figur 26. Predikering av sekundærstruktur til *thuB* ved hjelp av programmet RNAfold. a) Predikering av *thuB* fragmentet i sin helhet. b) Forstørret utsnitt av den øverste delen av figur a). c) Skala for fargekoder. Lilla (0) betyr at det er lite sannsynlig med baseparing mens rødt (1) betyr stor sannsynlighet for paring.

Sekundærstrukturen gitt i figur 26 er den som ifølge predikeringsprogrammene gir den minste dannelsesentalpien. Programmene er også istand til å danne et stort antall andre sekundærstrukturer av sekvensen, men jeg har valgt å kun ta med denne siden den er den teoretisk mest sannsynlige om man følger den teoretiske entalpiendringen. Av figuren ser vi at det er dannet et stort antall både hairpin og stem loops, særlig i de GC rike områdene, hvor fargen rød symboliserer stor sannsynlighet for sekundærstruktur dannelse. *palB* og *thuB* er homologe sekvenser slik at det er rimelig å tro at de to sekvenser har lignende egenskaper til å danne sekundærstruktur.

På bakgrunn av dette ble det bestemt å gjennomføre PCR reaksjoner med tilsetning av forskjellige

konsentrasjoner DMSO. DMSO forbedrer utbyttet av PCR reaksjoner hos noen typer sekvenser, ved å hindre sekundærstrukturdannelse. Dataene presentert i figur 27 viser at ved 2% DMSO (brønn 2) genereres bånd på ~200 bp. Ved 5% DMSO (brønn 3) har andelen av ~200 bp blitt redusert, mens produkter på ~900 bp kan observeres. Dette båndet representerer sannsynligvis *palB* fragmentet, som har en forventet størrelse på 900 bp. Ved 10% DMSO har ~900 bp produktet økt, mens båndene rundt 200 bp er betydelig svakere. Ved 15% DMSO har alle båndene forsvunnet.



Figur 27. PCR amplifisering av *palB* fragment med M13 forward og reverse primer og ulike konsentrasjoner DMSO. Brønn 1: Generuler DNA ladder mix, brønn 2: 2% DMSO, brønn 3: 5% DMSO, brønn 4: 10% DMSO, brønn 5: 15% DMSO, brønn 6: Negativ kontroll.

På bakgrunn av disse resultatene kan vi med rimelig sikkerhet si at vanskelighetene med å amplifisere *palB* og *thuB* ved hjelp av PCR skyldes sekundærstrukturdannelse. Denne sekundærstrukturdannelsen kan inhiberes ved bruk av DMSO, men selv med maks konsentrasjon DMSO får vi ikke ett rent produkt.

For å forsøke å frambringe et rent PCR produkt til sekvensering ble derfor *palB* fragmentet amplifisert opp ved bruk av M13 forward og revers primere og 10% DMSO, og fragmentene fra

denne reaksjonen ble separert ved hjelp av gel elektroforese. M13 primerne fester seg til TOPO vektoren ~100 bp foran og bak PCR insettet (figur 25).

Båndet som representerte det 900 bp *palB* produktet ble kuttet ut av gel og DNA ble rensset opp med Qiagen gel extraction kit. Dette DNA ble så sekvensert både med og uten tilsetning av DMSO. DMSO synes imidlertid ikke å forbedre resultat av sekvensering, da reaksjonene med DMSO ikke ga resultater. Sekvensering med M13 forward primer uten DMSO resulterte i en 250 bp sekvens. Denne sekvensen ble kjørt i sekvensdatabasen BLAST. Dette søket ga sekvensen 90% likhet *thuB* genet fra *S. meliloti*. Dette viser at de første 280 bp av *palB* genet lar seg sekvensere under normale betingelser, men at polymerasen videre trolig blir hindret av sekundærstrukturer (se figur 28).

```

Features in this part of subject sequence:
  ThuB

Score = 270 bits (146), Expect = 2e-69
Identities = 169/187 (90%), Gaps = 3/187 (1%)
Strand=Plus/Plus

Query    98      CGACAAGGCGCATCACCCnnnnnnnnCTTGGCGCTCATCGCCGCCGGCAAGCATGTGCTGT
          |||
Sbjct   333513  CGACAAGGCGCATCACCC-GACAACCTTGGCGCTCATCGCCGCCGGCAAGCATGTGCTGT
333571

Query    158     GCGAAAAGCCGCTGGCCGAAAACCTATGAGAAGGCCGCCNANATGGNGGNCGCAGNCGAGC
          |||
Sbjct   333572  GCGAAAAGCCGCTGGCCGAAAACCTATGAGAAGGCCGCCGAGATGGCGGCCGCAGCCGAGC
333631

Query    218     GGGCCGGCCTCGTCACCATGGTCAATCTGACCTATCGNANCGTC-CNNCCGCTGCAGAAG
          |||
Sbjct   333632  GGGCCGGCCTCGTCACCATGGTCAATCTGACCTATCGCAACGTCGCC-CCGCTGCAGAAG
333690

Query    277     GNGCGTG   283
          | ||||
Sbjct   333691  GCGCGTG   333697

```

Figur 28. Utsnitt av BLAST resultat. Sekvenseringsresultatet ga 90% likhet med *thuB* genet i *S. meliloti*. I figuren er sekvensen fra sekvenseringen parett (alignment) med matchende del av *thuB*.

3.2 Resultater fra det didaktiske arbeidet

3.2.1 Intervju av lærere

For å få et innblikk i hvordan bioteknologiundervisning blir gjennomført ved skolene, ble det tatt kontakt med lærere i videregående som hadde undervisning til og med Biologi 2. Dette resulterte i intervju med to lærere fra det jeg fra nå av kaller skole1, og en lærer fra det jeg nå kaller skole2.

Det viste seg raskt at de to skolene la opp bioteknologiundervisningen ganske forskjellig. Mens skole1 hadde lagt mye ressurser til innkjøp av utstyr for å gjøre bioteknologiske forsøk på skolen, hadde skole2 over flere år samarbeidet med universitet og høyskole i gjennomføring av denne typen undervisning. I det følgende vil jeg presentere hva som kom fram gjennom mine samtaler med faglærerne fra disse to skolene.

Ved skole1 var det altså gått til innkjøp av utstyr for å gjennomføre den praktiske undervisningen innenfor bioteknologi på skolen. Helt spesifikt var det kjøpt inn gel elektroforesekar og annet nødvendig utstyr for å gjennomføre øvelser i DNA fingerprinting. Midlene for dette hadde skolen mottatt i forbindelse med realfagssatsingen, og læreren jeg snakket med anslo at skolen hadde brukt rundt 50000 kr på dette utstyret.

På spørsmål angående samarbeid med universitet kunne læreren fortelle at skolen tidligere hadde samarbeidet med universitet, men at de helst gjennomfører undervisningen på egen skole. *"Vi har tidligere hatt samarbeid med universitet, men foretrekker å ha undervisningen på egen skole (...) Ved å gjennomføre alt på skolen kan vi planlegge over flere dager slik at vi slipper å vente på resultater"*. Ved de tidligere besøkene ved universitetet hadde lærerne opplevd at det ble mye venting, dvs man måtte blant annet vente på at PCR reaksjon og gel elektroforese skulle bli ferdig (kan ta flere timer). Ved å gjennomføre øvelsen på skolen kunne de begynne på øvelsen en dag, og så fortsette en annen. Altså man kunne planlegge for flere dager, og unngå venting på resultater før man kan gå videre.

En annen fordel med å holde undervisningen på skolen nevner læreren de logistiske utfordringene et universitetsbesøk medfører. *"Det tar lengre tid å komme seg til og fra enn man skulle tro"*. Man skal for eksempel komme seg til og fra universitetet, og man må sette av en hel dag til besøket. Alt dette krever mye planlegging og arbeid, og tar tid av elevenes skoledag. Dette mente lærerne ved skole1 også påvirket deres valg med å holde undervisningen på skolen.

Videre hadde tidligere besøk ved universitetet vist seg å bli for krevende for elevene. Dette kom av at det manglet forkunnskaper hos elevene, og at det dermed ble for mye nytt på en og

samme tid. *"Vi kunne være på universitetet i mange timer, og få masse nyttig informasjon, men du kunne se på elevene at det gikk inn det ene øret og ut det andre. Det ble for mye nytt".*

Læreren ved skole1 ser imidlertid ikke helt mørkt på samarbeid mellom skole og universitet. Blant annet ble det trukket fram verdien i at elevene får oppleve og bli kjent med universitetet.

"universitetsbesøk lærer elevene litt om hva det arbeides med på et universitet (...) noen elever synes det er spennende og motiverende med slike besøk".

I lys av dette kom det fram at læreren gjerne ønsket et samarbeid med universitet i en eller annen form, men at selve undervisningen og læringsoppleggene skulle foregå på skolen. Som forslag nevner læreren at omvisning og/eller et kort foredrag på universitetet kunne fungert godt.

Ved skole2 har den intervjuede læreren som sagt en annerledes tilnærming til undervisning i bioteknologi. Også ved denne skolen ble det gjennomført endel praktisk undervisning på skolen, blant annet nevner læreren øvelser i genetikk slik som øvelser om arvelige egenskaper og blodtypering. De har tidligere også gjennomført forskjellige gel elektroforese forsøk ved skolen, men de siste årene er denne typen øvelse blitt gjennomført via samarbeid med en høyskole. Dette samarbeidet har fungert slik at læreren har tatt med seg elevene til høyskolen, hvor de har fått gjennomført en praktisk øvelse i DNA fingerprinting. Øvelsen har blitt utarbeidet av ansvarlige ved høyskolen, og innebærer et foredrag hvor elevene har fått en innføring i tema for øvelsen samt gjennomføring av det praktiske arbeidet.

Læreren uttrykker stor takknemlighet over dette opplegget, og sier kvaliteten av opplegget er i en helt annen dimensjon enn hva de kan få til ved skolen. Som begrunnelse trekker hun fram kunnskapen de ansvarlige ved høyskolen sitter inne med. Denne kunnskapen har gjort at foredraget i forkant av øvelsen har belyst tema på en helt annen måte enn hva lærerne selv kunne få til på egenhånd. *"... et helt fantastisk foredrag og forsøk for elevene som har ført til økt rekruttering innenfor bioingenørstudiet. Ellers er det viktig for skolen at opplegget er gratis siden skolen ikke har penger til utflukter".* Læreren mente som vi ser, at høyskoleekskursjonene har ført til økt rekruttering av elever fra sine klasser til bioingeniørstudiet, uten at dette kunne bevises i form av tall. Det var imidlertid helt sikkert at interessen for denne typen studier hadde økt som følge av høyskolebesøkene. Det at besøkene ved høyskolen var gratis ble også trukket fram som positivt, da penger ofte kan være en begrensende faktor i praktisk arbeid innenfor bioteknologi.

Det ble også trukket fram vinklingen på opplegget, hvor DNA fingerprinting ble lagt opp

som en kriminalsak med mistenkte, der den skyldige skulle pekes ut ved hjelp av DNA analyser. Læreren mente dette var en problemstilling elevene kunne relatere seg til, da de gjennom nyheter og ulike krimserier har hørt om bruken av DNA som bevis i straffesaker. *"Det som har vært bra med besøkene ved høyskolen har blant annet vært vinklingen som har gjort elevene ekstra interesserte (...) Elevene klarer å relatere seg til en slik problemstilling siden de følger med på krimserier på tv, følger litt med på nyheter osv"*. Det at den ansvarlige ved høyskolen selv hadde erfaring fra bruk av denne metoden innenfor rettsmedisin ga også opplegget ekstra troverdighet.

Av andre grunner til å gjennomføre ekskursjoner trakk læreren ved skole2 fram lærernes kunnskapsbegrensinger. Særlig etter at deler av bioteknologi og genetikk pensum fra det gamle 2BI faget med kunnskapsløftet ble flyttet ned til første år naturfag ved videregående skoler. Ved deres skole var det endel lærere i naturfag som ikke hadde tilstrekkelig kunnskap om bioteknologi til å gjennomføre tilfredsstillende undervisning i dette på egenhånd.

På spørsmål om de negative sidene ved klasseeksursjoner til høyskole/universitet ser læreren ved skole2 de samme ulempene som læreren ved skole1. Læreren ved skole2 virker imidlertid å ikke tillegge disse problemene like stor tyngde som læreren ved skole1, og synes i alle fall at de positive effektene overgår de negative.

3.2.2 Elevbesøket

For å undersøke fordeler og ulemper ved samarbeid mellom skole og universitet gjennomførte jeg et praktisk program her ved universitetet med 6 elever fra 2 ulike videregående skoler (merknad: ikke fra de samme skolene som de intervjuede lærerne). Alle disse elevene var elever med andre års biologifordypning, biologi2, og sammensetningen var to gutter og fire jenter.

Forberedende spørsmål

I forkant av besøket ble elevene bedt om å skriftlig besvare spørsmålene gitt i figur 29.

1. Beskriv kort hva du forbinder med bioteknologi?
2. Ved besøket på universitetet skal det gjennomføres en øvelse i DNA fingerprinting som vil si genetisk fingeravtrykk. Vet du noe om hva dette er og hva denne metoden går ut på?
3. Er et universitetsbesøk motiverende for deg som elev? Prøv å begrunn svaret kort.
4. Har du forberedt deg på noen måte foran universitetsbesøket?

Figur 29. Spørsmål besvart av elever før universitetsbesøket.

I det første spørsmålet ble elevene bedt om å beskrive hva de forbinder med bioteknologi. Svarene fra de forskjellige elevene på dette spørsmålet varierte litt i omfang. De fleste forbinder bioteknologi med forskning innenfor biologi, og genmodifisering av planter og dyr: "*Tenker forskning på planter, dyr og mennesker, og hva man kan bruke denne forskningen til*". En av elevene viser imidlertid en litt dypere innsikt i temaet, ved å trekke fram spesifikke temaer som stamcelleforskning, kunstig befruktning, kloning og fosterdiagnostikk. Denne eleven trekker også fram DNA fingerprinting som verktøy innenfor både kriminaletterforskning og slektskapsundersøkelser. I tillegg skriver denne eleven at hun tenker bioteknologi også handler om å bruke levende organismer til å fremstille nyttige produkter. Det kommer tydelig fram allerede her at denne eleven har lagt mer arbeid i besvarelsene sine i forhold til de andre elevene. Jeg vil fra nå av kalle denne eleven for Trine.

I det andre spørsmålet ble elevene spurt om de visste hva DNA fingerprinting er, og hva metoden går ut på. Alle elevene har fått med seg at dette er noe som kan brukes i etterforskning, gjennom sammenligning av DNA fra ett åsted med forskjellige mistenkte. Trine svarer også her litt mer inngående enn de andre elevene. "*Ved DNA fingerprinting analyserer man det genetiske arvematerialet (...) Ut fra resultatene kan man bestemme individ, kjønn, og hvem man er i slekt med. Eller man kan bruke DNA fingerprint resultatene for å finne en gjerningsmann i rettsak*" Vi ser at denne eleven viser innsikt i hva DNA fingerprinting kan brukes til.

Tredje spørsmål spurte elevene om de så på et universitetsbesøk som en motiverende faktor i skolehverdagen. Samtlige elever forteller her at universitetsbesøket er noe de gleder seg til. Som begrunnelse nevner alle elevene at det skal bli spennende å se hva det jobbes og forskes på ved universitetet *"... man får ei lita fordypning i, og får en annerledes opplevelse av faget. Dessuten vil det bli interessant å være på universitetet og se hva som gjøres og hvordan ting gjøres der"*.

To andre elever påpeker at et slikt besøk kan få betydning for deres valg av utdanning etter videregående. *"Ja. Det at dere viser interesse for oss elever er kjempemotiverende! Det er mange gang ikke lett å vite hva man skal bli, så et besøk ved universitetet vil forhåpentligvis gi et innblikk i studenttilværelsen som venter oss"*. Gjennomgående var altså et universitetsbesøk motiverende for elevene, og noe de alle så fram til. Verdt og merke seg var at noen av elevene brukte dette besøket som en kartlegging for deres framtidige valg av utdanning.

Siste spørsmål spurte helt enkelt om elevene hadde forberedt seg på noen måte i forkant av besøket. Det kom her fram at bare to av de seks elevene hadde lest gjennom kompendiet og gått inn på linkene som ble utgitt der.

Målet med disse forberedende spørsmålene var å få et innblikk i elevenes forestillinger og forkunnskap til bioteknologi, og redegjøre for deres innstilling til universitetsbesøket. Svarene til elevene bar preg av at de ikke hadde brukt veldig mye tid på besvarelsen av spørsmålene, slik at svarene kanskje ble noe generelle. Det viste seg ingen direkte vrangforestillinger fra deres besvarelser, men ut ifra at de fleste svarene var veldig kort kunne heller ikke elevene vise til noen dypere forkunnskap innenfor tema. Eleven jeg har kalt Trine skiller seg i så måte ut ved å svare lengre, og dermed kunne vise bredere kunnskap enn de andre elevene. Om dette kommer av at hun faktisk vet mer enn de andre, eller at hun bare har tatt seg bedre tid til å besvare spørsmålene er imidlertid vanskelig å bedømme.

Angående elevenes motivasjon er det positivt at samtlige faktisk så fram til universitetsbesøket. Det er også verdt å merke seg at noen av elevene trakk fram et slikt besøk som en påvirkende faktor for hvilken utdanning de kommer til å søke på til etter videregående. Dette var også noe som var lett å observere på elevene da de kom til universitetet. Elevene viste interesse gjennom hele besøket ved at de stilte spørsmål og fulgte med på informasjon som ble gitt. En enkel ting som det å pipettere, noe jeg på forhånd ikke tenkte på som en spesielt spennende aktivitet, var

noe elevene aldri hadde arbeidet med før og dermed syntes de det var gøy.

Under foredraget på starten av dagen ble det gjennomgått litt grunnleggende teori for det praktiske arbeidet. Inntrykket jeg fikk fra denne gjennomgangen var at elevene hadde lite forkunnskaper i tema. Elevene kunne vise til en viss kunnskap rundt oppbygging av DNA, men i metodene vi skulle gjennomføre hadde elevene ingen forkunnskap. Dette var forventet. Siden skolen ikke gjennomførte noen forberedelser for besøket.

Avsluttende spørsmål

På slutten av dagen fikk elevene så utdelt fem nye spørsmål (se figur 30) som de først fikk svare på skriftlig, før vi gikk igjennom disse muntlig.

1. Kan du nevne 3 ting du synes har fungert godt/vært positivt ved denne dagen på universitetet?
2. Kan du nevne 5 ting vi har gjort iløpet av denne dagen som du tror du kommer til å huske?
3. Hvordan tror du undervisningen ved universitetet skiller seg fra hvordan skoleundervisningen ville vært innenfor samme tema?
4. Har du noen forslag til endringer som du tror ville forbedret utbyttet av skolebesøk på universitetet?
5. Kan du nevne 3 ting du synes kunne vært forbedret ved denne dagen på universitetet?
6. Hvordan synes du dagen har vært i forhold til hva du forventet deg på forhånd?

Figur 30. Spørsmål besvart av elever etter besøket.

I første spørsmål ble elevene spurt hva de synes har fungert godt ved universitetsbesøket. Her er det stort sett de samme poengene som kommer fram hos elevene. Spesielt har elevene likt at de fikk arbeide praktisk. *"det var positivt at vi fikk gjøre noe praktisk, og at vi gjennomførte DNA-analysen*

selv". I gjennomgangen snakket elevene mye om at de har fått gjøre ting de aldri har prøvd før, og at det derfor har vært spennende. De trakk også fram at det var fint med en kort teorigjennomgang på forhånd: *"planlegginga på forhånd og informasjonen har vært god. Bra at det ikke var for mye teori"*. Ellers mente elevene at de har fått en hyggelig mottagelse, og at dette har gitt dem et positivt inntrykk av universitetet. *"Alle har vært veldig hyggelig, og jeg har fått et godt inntrykk"*.

Det ble videre spurt om hva elevene tror de ble å huske fra universitetsbesøket. Her nevner alle elevene de forskjellige metodene som ble gjennomført, slik som pipettering av reagenser, tillaging av gel og oppsett av PCR program i PCR maskin. I tillegg har de fleste elevene nevnt foredraget om forskning ved Institutt for Biologi. To av elevene nevner dette foredraget med tanke på følgende studier. *"Jeg kommer til å huske foredraget om forskningen ved IB, hva man kan studere, muligheter"*. Vi ser igjen at noen av elevene bevisst bruker universitetsbesøket som en slags kartlegging for fremtidig valg av studier.

I tredje spørsmål ble elevene spurt hvordan de mener undervisningen de har fått skiller seg fra hvordan de tror skoleundervisningen hadde blitt i samme tema. Svarene fra elevene beskrives godt av følgende sitat: *"I skoleundervisningen får man mest teori. Her på universitetet får man prøvd ut mer, og her er det bedre utstyr en hva det er på den videregående skolen"*. I tillegg sier en elev: *"Jeg tror de som underviser her på universitetet er mer engasjert, i og med at de er interessert i tema. Dette smitter over på oss elever"*. Vi ser at utstyret og mer praktisk arbeid trekkes fram som forskjeller. Gjennom at universitetet har større tilgang på oppdatert utstyr er det åpenbart at det er større rom for å planlegge praktiske oppgaver her. Angående sitatet om engasjement blant lærerne, så tror jeg det finnes mange naturfaglærere som også har stort engasjement i bioteknologi. Jeg tok derfor ikke med sitatet for å stigmatisere naturfaglærere. Sitatet viser imidlertid at engasjement er noe som legges merke til hos elevene, og derfor er en viktig faktor i undervisningen.

Fjerde spørsmål spurte elevene hva de syns kunne vært forbedret med dagen på universitetet. Elevene kom her med ingen direkte forslag, men en elev syntes det hadde blitt litt mye nytt på en gang. Ellers var elevene enige om at en omvisning på universitetet hadde vært fint, noe som viser at elevene var nysgjerrige, og denne nysgjerrigheten gjenspeiler seg i deres innstilling og motivasjon for besøket.

Videre nevner to elever at større forberedelser ville økt utbyttet av besøket. *"Det ble ganske mye nytt. Om vi elever gjorde flere forberedelser på forhånd, og snakket mer om besøket i klassen"*

ville vi kanskje lært enda mer".

Som avslutning ble det tatt opp hvordan besøket hadde vært i forhold forventningene elevene hadde på forhånd. Følgende sitat oppsummerer elevenes synspunkter: *"Jeg er positivt overrasket. Jeg har lært mer enn jeg hadde trodd. Også fint at det ikke var for mye teori. Bra opplegg"*. Samtlige elever syns besøket hadde vært spennende og at de hadde lært noe.

Avsluttende bemerkninger

Under hele dagen sammen med elevene ble jeg som underviser forbløffet over elevenes innstilling og fascinasjon over det som ble sagt og tingene som ble gjort på laboratoriet. Elevene var nysgjerrige og lærevillige, slik at det trengtes lite anstrengelse for å holde arbeidstrykket og fremgangen i opplegget gående. Elevene snakket om at det positive engasjementet hos meg smittet over på dem, men på meg følte det som dette var noe som virket begge veier. Med så positivt innstilte elever var det lett å være engasjert lærer.

4. Diskusjon

4.1 Diskusjon av laboratorieresultatene

4.1.1 Transformering av *A. tumefaciens*

I dette studiet ble genet *palB* i *A. tumefaciens* forsøkt slått ut gjennom transformering. Transformeringen ble gjennomført ved å overføre plasmidet pThuB582 til *A. tumefaciens* via konjugasjon med *E. coli*. Plasmidet ble så forsøkt klonet inn i *A. tumefaciens* genom ved hjelp av overkrysning. Denne overkrysningen kunne skje gjennom homologien mellom *palB* og *thuB* (Jensen mfl 2005). Transformasjonen resulterte i 8 bakteriekolonier som kunne vokse i seleksjonsmediet, og ble derfor antatt som transformanter.

Karakterisering av transformantene viste seg å være vanskelig, siden det forventede innsett av pThuB582 vanskelig lot seg amplifisere ved hjelp av PCR. Det ble derfor gjennomført en kontrollreaksjon med amplifisering av en del av *lacZ* genet for å få en bekreftelse på at transformasjonen var gått igjennom. Denne reaksjonen ga oss en klar indikasjon på vellykket transformering.

Opphavet til vanskelighetene med PCR amplifiseringene kan være flere. En grunn kan være at temperaturene i PCR syklusen ikke er egnet for den benyttede sekvens og primere. For eksempel vil for lav annealingtemperatur øke muligheten for primerne til å feste seg til uspesifikke steder av sekvensen, noe som vil resultere i bånd av ulike lengder. I dette studiet ble det tatt høyde for dette, og derfor kjørt flere PCR reaksjoner med varierende annealingtemperaturer. Vi kan allikevel ikke utelukke at uspesifikk binding er opphav for de dårlige PCR resultatene.

En annen mulig årsak er sekundærstrukturdannelse i amplifiseringssekvensen. For eksempel vil sekundærstruktur i festepunktene til primerne hindre disse fra å feste seg og dermed gjøre amplifisering umulig (Fredman mfl 2004). I tillegg kan sekundærstrukturer i selve DNA sekvensen føre til at polymerasen foretar "sprang" under replikasjonen, og dermed utelater områder av amplifiseringssekvensen (Viswanathan mfl 1999). Sekundærstrukturdannelse kan derfor medføre både minsket utbytte og reduserte lengder på amplifiserte sekvenser.

I den videre karakteriseringen av våre transformanter vil det være interessant å undersøke de transformerte bakterienes egenskaper opp mot villtype. Som beskrevet i teoridelen er *thuB* en viktig komponent i trehalosenedbrytning hos *S. meliloti*, og at *S. meliloti* bakterier hvor dette genet er slått

ut har sterkt svekket evne til å katabolisere trehalose (Jensen mfl 2005). Ved å undersøke de transformerte *A. tumefaciens* evner til å vokse på trehalose kunne man få en indikasjon på om de homologe genene *thuB* og *palB* har lignende funksjoner i de to organismene. *S. meliloti* med slått ut *thuB* har utvist økt evne til infisering av planterøtter, på grunn av økt akkumulering av intracellulær trehalose (Jensen mfl 2005). Det vil være interessant å undersøke om dette også er tilfellet for de transformerte *A. tumefaciens*. Da vi fikk problemer med verifiseringen av selve transformasjonen ble det ikke tid til å gjennomføre disse eksperimentene i dette studiet, men dette vil være naturlige steg videre i arbeidet.

4.1.2 Karakterisering av *palB*

Tidligere studier hadde påvist lignende vanskeligheter som i dette studiet med PCR amplifisering av genet *thuB*. Det ble derfor gjort antagelsen om at det var sekundærstrukturdannelse i disse genene som var opphavet til problemene. Vi ønsket å undersøke dette nøyere og benyttet derfor bioinformatikk til å modellere mulige sekundærstrukturer for *thuB*. Denne modelleringen ga oss en klar indikasjon på at *thuB* danner sekundærstrukturer. Videre ble det forsøkt å amplifisere genet med forskjellige konsentrasjoner av DMSO i PCR reaksjonen. DMSO ga oss økt utbytte av PCR reaksjonen opp til en konsentrasjon på 10%. Det som er problematisk med en så høy DMSO konsentrasjon, er at mutasjonsraten øker ved økende DMSO konsentrasjoner, og ved 10% DMSO reduseres også *Taq* polymerases aktivitet med 50%. Ved ytterligere studier kan det være interessant å forsøke andre agenter for økt PCR resultat, for eksempel betain og formamidin for å oppnå mer produkt av korrekt størrelse i PCR reaksjonen.

Det ble også foretatt sekvensering av *palB* fragmentet. Resultatene av dette strakk seg til en ~250 bp sekvens. Grunnen til manglende resultater av sekvenseringen er nok den samme som for PCR reaksjonene, nemlig sekundærstrukturdannelse. Primeren som ga ~250 bp sekvensen var M13 forward, og det er derfor rimelig å foreslå at denne primeren fester seg i et området av sekvensen som ikke er i umiddelbar nærhet med sekundærstrukturer. M13 reverse primeren ga ingen meningsfulle sekvenser. I fremtidig sekvensering vil det derfor være interessant å konstruere en ny revers primer, for å undersøke om dette kan forbedre resultatet. Det kan også bli nødvendig å konstruere primere for flere steder av *palB*, slik at man kan få satt sammen en fullstendig sekvens ved hjelp av resultater fra ulike sekvenseringer.

4.2 Diskusjon av det didaktiske arbeidet

4.2.1 Diskusjon av lærerintervju

De to videregående skolene jeg var i kontakt med i dette studiet hadde to ulike tilnærminger til undervisning i bioteknologi. Skole1 fokuserte på å samle undervisningen på egen skole, mens skole2 samarbeidet med universitetet i bioteknologiundervisningen. Skole1 hadde tidligere samarbeidet tettere med universitetet, men hadde mer eller mindre avsluttet dette. I mitt intervju med de to lærerne fra skole1 ble det dermed fokus på de negative sidene med universitetssamarbeid, altså det som hadde fått skole1 til å holde undervisningen på egen skole. Blant de negative sidene med universitets samarbeid/besøk trekker lærerne ved skole1 blant annet fram logistiske og tidsmessige utfordringer. Planlegging og gjennomføring av transport til og fra universitet, tidsbruk i timene i forkant av besøket og at man måtte sette av en hel dag til selve besøket ble sett på som for mye tid å bruke på et slikt besøk.

Tidsbruk er en viktig problemstilling som medfølger ekskursjoner slikt som et universitetsbesøk. Klette med flere (2008) har i prosjektet PISA+, studert undervisningen i norske klasserom med fokus på hvor mye av skoletiden som faktisk brukes til undervisning. Gjennom å studere videoopptak av klasseromsundervisning fant man at en relativt stor del av undervisningstiden gikk med til ikke faglige ting slikt som administrasjon og at læreren forteller hva som skal skje (Klette mfl 2008). Det er naturlig at gjennomføring av et universitetsbesøk vil kreve endel skoletid til nettopp disse tingene.

Ved skole2, ble fokuset for intervjuet i større grad det positive ved universitetsamarbeid. Den intervjuede læreren ved skole2 har i flere år samarbeidet med høyskole om et opplegg i DNA fingerprinting. Dette opplegget hadde ifølge læreren en vinkling som elevene kunne forholde seg til. Øvelsen de gjennomfører ved høyskolen er lagt opp som en kriminalsak, der elevene skal finne en skyldig ved hjelp av bioteknologiske metoder. Dette er en metode elevene gjennom tv og media vet anvendes også utenfor klasserommet. Øvelsen har altså et helt klart anvendelsesaspekt. I PISA 2006 kommer undervisning med vekt på anvendelser som eneste undervisningsform svakt positivt ut i forhold til naturfagskåre. I tillegg ser fokus på anvendelser utenfor klasserommet ut til å fremme både verdsettelsen og interessen for naturfag (Kjærnsli mfl 2007).

Læreren ved skole2 peker også på at kunnskapen og erfaringen til den ansvarlige for opplegget på høyskolen spilte en stor rolle for troverdigheten til kriminalsak vinklingen. Denne personen hadde selv jobbet innenfor rettsmedisin og hadde derfor kunnskap rundt tema en lærer

ikke har mulighet til å matche. At det er en fagperson med tyngde innenfor feltet som er ansvarlig kan derfor se ut til å medføre mer troverdighet rundt anvendelsesaspektet i undervisningen.

Læreren bygger opp under verdien av anvendelsesaspektet gjennom sin observasjon at ekskursjonene har ført til økt interesse og rekruttering til bioingeniørstudiet. Det har i det seneste vært en bekymring innenfor ingeniørrettede foretak rundt problemet med å få fatt i kompetente fagfolk (Kjærnsli mfl 2007). Om universitet, høyskoler og næringsliv kan oppnå økt rekruttering gjennom samarbeid med skole bør dette være en viktig del av disse institusjonenes langsiktige rekrutteringsarbeid.

Et annet og viktig aspekt som læreren ved skole2 trekker fram er at høyskolebesøkene er gratis. Ved skole1 var det brukt relativt store ressurser på innkjøp av utstyr for å gjennomføre undervisningen ved egen skole. Det er rimelig å spørre seg hvor mye penger man bør bruke innenfor undervisning i bioteknologi, særlig om man har mulighet til å unngå disse utgiftene gjennom samarbeid med høyskoler, universitet eller næringsliv. Et særlig problem angående dette kan oppstå ved at det stadig kommer nye og bedre hjelpemidler innenfor bioteknologi, som vil føre til vedvarende kostnader hvis skolene skal kunne tilby en oppdatert utstyrspark.

Lærerne må også inneha kunnskap om nytt utstyr og nye metoder innenfor faget. Som jeg har beskrevet i teoridelen ser mange lærere sin egen kunnskap som hinder for sin egen undervisning i eksperimentelle arbeidsformer (Grønmo mfl 2004). Dette er også et aspekt læreren ved skole2 trekker fram, særlig etter omstruktureringen til mer bioteknologi ved første år på videregående skole. Det vil være lite nytte i dyrt utstyr ved skolene om lærerne ikke har kompetanse til å benytte seg av dette effektivt i undervisningen.

Det var også interessant å observere at de to skolene på mange måter så de samme fordeler og ulemper i samarbeid med universitet kontra å holde undervisningen på skolen, men at de altså vektla disse problemene vesentlig ulikt. Det er tydelig at de har oppfattet verdien av slike ekskursjoner svært forskjellig. Som bakgrunn for dette kan det spekuleres i om kvaliteten på de ulike oppleggene de hadde deltatt på var av ulik kvalitet. Skole2 hadde tydeligvis vært på et godt planlagt og gjennomført opplegg, med en inspirerende foreleser. Dette krever at den ansvarlige ved institusjonen legger ned det arbeidet som trengs for å organisere besøket på en god måte. Skole1 har kanskje ikke vært like heldig, og dermed kommet til et opplegg som ikke har truffet elevene på samme måte.

Dette vil være et usikkerhetsaspekt ved universitetsbesøk. Man kan ikke på forhånd vite om de ansvarlige ved institusjonen har lagt ned det forarbeidet, eller har den undervisningskompetansen som trengs for å gjennomføre et godt opplegg for elever.

4.2.2 Diskusjon av elevbesøk

I spørsmålene elevene besvarte skriftlig i forkant av universitetsbesøket dreide de to første spørsmålene seg om elevenes forkunnskaper og forestillinger om bioteknologi og DNA fingerprinting. De fleste kunne vise til helt generelle oppfatninger i svarene på disse spørsmål, men ingen dypere forkunnskap rundt tema. Da elevene generelt svarte ganske kort på spørsmålene ble det vanskelig å identifisere eventuelle misoppfatninger blant elevene. Barn, unge, og voksne danner seg sine egne forestillinger som forklaringer på ulike fenomener i hverdagen. Slike hverdagsforestillinger består ofte av uriktige oppfatninger som kan "sabotere" tilegnelsen av den "korrekte" kunnskapen. Det kunne vært interessant å ytterligere undersøke elevenes hverdagsforestillinger innenfor bioteknologi, i forkant av besøket. Dette ble imidlertid ikke gjennomført i denne omgang.

Av de forberedende spørsmålene kom det også fram at alle elevene så universitetsbesøket som en motiverende faktor i skolehverdagen. Elevene var nysgjerrige på hva som foregikk på universitetet, og flere av elevene mente et slikt besøk vil påvirke hvilken utdanning de kommer til å velge etter videregående. Det at noen elever faktisk er bevisste på framtidige studievalg ved et slikt universitetsbesøk, bør være særlig interessant for realfaglige institusjoner som sliter med dårlig rekruttering.

I de avsluttende spørsmålene til elevene kommer det fram at elevene synes det var spennende å arbeide med de praktiske metodene vi gjennomførte. De mente at samme undervisning ved skolen ville være mer preget av teorigjennomgang. Elevene hadde ellers mye positivt å si om opplegget, særlig har elevene lagt merke til at opplegget er godt planlagt på forhånd, og at de har blitt godt mottatt her på universitetet. Dette har trolig smittet over på elevene og gjort at de tok sin del av ansvaret for at gjennomføringen av opplegget gikk så bra.

Andre faktorer som har påvirket elevenes engasjement kan ha vært at det meste som ble gjort var nytt og spennende. Blant annet var utstyret som ble brukt ukjent for dem. I tillegg hadde de aldri før vært på besøk på universitetet slik at elevene kanskje var ekstra nysgjerrig på hele

situasjonen.

Ting som kunne vært forbedret ved besøket nevner elevene blant annet økt forarbeid. Elevene hadde som beskrevet svært få forkunnskaper om de metoder vi benyttet i opplegget. Dette ble forsøkt imøtekommet med teorigjennomgangen i starten av dagen. Det mest ideelle hadde nok allikevel vært at besøket var forberedt sammen med læreren ved skolen, da metodene som ble brukt er ganske kompliserte. Dette betyr at en 45 minutter gjennomgang trolig er for lite for å gi elevene tilstrekkelig bakgrunn, og at forarbeid ved de aktuelle skolene bør prioriteres for å få tilstrekkelig utbytte av universitetsbesøket.

4.3 Avslutning

4.3.1 Perspektiver

I arbeidet med denne oppgaven har jeg benyttet flere ulike molekylærbiologiske laborieteknikker. Arbeidet med disse har vært spennende i seg selv, men hovedformålet med den eksperimentelle delen har vært å lære metodene godt for således å finne måter disse kan brukes i undervisning innenfor bioteknologi i videregående skole.

Dette betyr at jeg har en praktisk tilnærming til problemstillingen, siden jeg ønsker å trekke bioteknologiske metoder som brukes i forskning inn i undervisningen. En praktisk tilnærming til stoffet kan begrunnes ut ifra læreplanmålene "forskerspiren" i naturfag og "den unge biologen" i biologifagene. Som beskrevet i teoridelen heter det blant annet at elevene i disse områdene skal kunne bruke naturvitenskaplig metode og biologifaglige arbeidsmåter i laboriet. Naturvitenskaplig metode begrunnes ut ifra Bruners teorier hvor kunnskapen om de ulike fagenes tenkemåte og metoder er vesentlige elementer i læringsprosessen. I naturfag blir derfor den hypotetisk-deduktive, eller naturvitenskaplige metode sentral. Metoden Bruner kaller *learning by doing* er en måte å gjennomføre denne tilnærmingen på (Imsen 2005), og det er dette grunnlaget arbeidet med denne oppgaven bygger på.

Gjennom arbeidet i laboriet har jeg lært forskjellige prosedyrer for transformering av bakterier og arbeid med antibiotikaresistens hos bakterier. I tillegg har jeg arbeidet med opprensing og analyser av DNA vha restriksjonskutting, PCR, sekvensering, gel elektroforeser og noe bioinformatikk.

I målområdet cellebiologi i biologi, er tema blant annet oppbygging, formering og funksjon av bakterier og eukaryote celler (Kunnskapsdepartementet 2008d). Gjennom arbeid med transformering av bakterier, og kunnskap om hvordan bakterier kan oppnå egenskaper som for eksempel antibiotikaresistens tilegner man seg kunnskap som svarer til dette området. Spesielt vil jeg trekke fram metoden jeg benyttet for å oppnå resistens mot antibiotikaet rifampicin i *A. tumefaciens*. Dette er en svært enkel metode, som illustrerer virkningen antibiotika har på bakterievekst. Samtidig viser metoden at bakterier spontant kan bli resistent mot antibiotika. Denne problemstillingen er svært aktuell, da den økende bruk av antibiotika innenfor medisin og matproduksjon kan føre til resistente bakterier som er vanskelig å bli kvitt og dermed kan gjøre stor skade.

Metoden jeg benyttet for å transformere de samme *A. tumefaciens* er også en metode av

relativt enkel natur. Her ble to bakterier dyrket sammen, noe som førte til konjugering og overføring av arvemateriale mellom de to organismene. Denne metoden krever heller ikke kostbart utstyr, og kan derfor gjennomføres i skolelaboratoriet.

Begge disse metodene illustrerer på en enkel måte litt om mekanismer og prosesser bakterier har for å tilpasse og formere seg i forskjellige miljø. Metodene krever også svært lite materielle ressurser og vil derfor enkelt kunne gjennomføres i skolelaboratorier.

Transformasjon som metode kan også bli benyttet for å få forståelse av hvordan man kan genmanipulere organismer slik at de oppnår nye egenskaper. Dette er noe som blir gjort for eksempel i matproduksjon hvor man for eksempel kan endre ulike frukt og grønnsakers evne til å tåle kulde. Slik sett kan man lære om cellers egenskaper gjennom praktisk arbeid samtidig som man har en aktuell problemstilling på temaet.

I målområdet genetikkk dreier det seg blant annet om oppbyggingen og funksjon til DNA (Kunnskapsdepartementet 2008d). Her er DNA metodene PCR, restriksjonskutting, sekvensering og gel elektroforese som jeg har benyttet, aktuelle metoder man kan trekke inn i undervisningen. Metodene PCR og gel elektroforese tok jeg også i bruk under min gjennomføring av opplegget for elevene her på universitetet, i konteksten å identifisere en gjerningsmann ved hjelp av DNA fingerprinting. Gjennom den korte teoretiske presentasjonen i forkant og i gjennomføringen av laboratorieforsøket, fikk elevene i denne øvelsen god kunnskap om oppbyggingen og de ulike kjemiske egenskapene ved DNA molekylet, Responsen fra elevene var etter opplegget svært god, særlig at de fikk ta praktisk del i problemstillingen ble godt likt. Øvelsen jeg utformet ble laget i lys av intervjuet med læreren fra skole2, som hadde positive opplevelser med lignende opplegg. Ut ifra dette virker denne vinklingen av tema som en fruktbar tilnærming med tanke på læring, motivasjon og rekruttering i biologi.

Målområdet bioteknologi kan på mange måter flettes inn i alle metodene jeg har nevnt ovenfor, siden det handler om hvordan utviklingen av bioteknologi har ført til nye teknikker og hjelpemiddel i medisin, produksjon av mat og biologisk forskning. Problemet, som jeg har vært inne på tidligere er at flere av metodene krever kostbart utstyr, og lærere som har tilstrekkelig kunnskap om metodene og utstyret som benyttes. Særlig øvelser som innebærer PCR, gel elektroforese, sekvensering og transformasjon krever at man har tilgang på utstyr de fleste skoler ikke har midler

til å anskaffe. Som en løsning på dette vil samarbeid med universitet, høyskole og næringsliv være mulige veier å gå. Samarbeid mellom disse institusjonene var noe som ble vektlagt i strategiplanen for realfag i 2002 (Kunnskapsdepartementet 2006a). I lys av denne planen ble blant annet Naturfagsenteret dannet i 2003 for å fremme samarbeid mellom ulike institusjoner. Innenfor undervisning vil slike samarbeid være nødvendig for å kunne gjennomføre spekteret av metoder som er mulig i bioteknologi.

Intervjuet med lærerne fra skole1 viste imidlertid at det til en viss grad er mulig å få tak i utstyr til å gjennomføre ihvertfall en del av de nevnte metodene ved den enkelte skole. Skole1 hadde fått midler via realfagsatsingen til innkjøp av gel elektroforesekar og målepipetter. Dette gjorde det mulig for dem å gjennomføre øvelser i restriksjonskutt og analyse av kuttet DNA på skolen. For noen skoler er det derfor mulig å skaffe endel midler om det er ønskelig at undervisningen blir holdt innenfor skolens fire vegger. Det går også an å finne fram til andre måter å gjennomgå de nevnte målområdene, hvor man ikke behøver å benytte seg av så kostbart utstyr. Gjennomgangen vil da imidlertid bevege seg bort fra *learning by discovery* og få en mer teoretisk form. Jeg stiller spørsmål ved om en slik tilnærming vil føre til samme motivasjon og interesse for bioteknologi i lik grad som en praktisk tilnærming.

Elevene jeg gjennomførte DNA fingerprinting opplegget med her på universitetet utviste stor glede over det å få komme til universitetet. De var nysgjerrige på hva som foregikk her, og flere av elevene synes et slikt besøk var interessant med tanke på høyere utdanningsmuligheter. I tillegg synes de selve opplegget var spennende både med tanke på vinklingen som ble gjort og utstyret som ble brukt. Læreren jeg intervjuet ved skole2 kunne fortelle om lignende opplevelser ved sine høyskolebesøk, og at hennes elever hadde økt interesse for faget også i etterkant av besøket. Slikt sett har skolene utbytte av universitetsbesøk ved at de får gjennomført metoder for elevene de ikke har samme mulighet til på egenhånd. Universitetene på sin side bør se på slike besøk som en måte å øke rekrutteringen til sine aktuelle utdanninger.

4.3.2 Svar på problemstilling

Min problemstilling for oppgaven lød som følgende: Hvordan bør undervisning innenfor bioteknologi gjennomføres med tanke på å gi en oppdatert, nyttig og motiverende kunnskap innenfor feltet?

Som svar på denne har jeg argumentert for en praktisk tilnærming på undervisningen i bioteknologi. For å få en mest mulig oppdatert undervisning mener jeg samarbeid med universitet, høyskole eller næringsliv vil være nødvendig for å få tilgang til oppdatert utstyr. I tillegg har jeg funnet indisier på at slike besøk er en motivasjonsfaktor for elevene.

Jeg mener imidlertid ikke at slike samarbeid fullstendig kan erstatte skoleundervisningen innenfor bioteknologi. Det vil fortsatt være nødvendig med undervisning i klasserommet og eksperimenter på skolelaboratoriet. Jeg har derfor trukket fram metoder som ikke krever dyrt eksperimentelt utstyr som gode alternativer for skoleundervisningen i bioteknologi. Universitetsbesøk kan imidlertid fungere godt som innslag i undervisningen innenfor emnet. Måter dette kan gjennomføres på er for eksempel ved at innføring i teori og bakgrunn, samt gjennomføring av enklere laboratorieøvelser gjøres som forarbeid og etterarbeid til universitetsbesøk. Forarbeid er noe elevene i dette studiet påpekte ville øke deres utbytte av opplegget.

Slik blir universitetsbesøk et nyttig supplement til skoleundervisningen, som fyller inn de aspektene ved bioteknologi som skolen ikke kan tilby alene. Universitetsbesøk vil sørge for økt variasjon i undervisningen, og utstyrsituasjonen ved universitetene vil føre til en helt annen dimensjon i den praktiske undervisningen. Samtidig er universitet i seg selv spennende for elevene, og vil dermed også være en ekstra motivasjonsfaktor i deres arbeid med bioteknologi.

5. Referanser

- Ampomah, O.Y., Jensen, J.B, og Bhuvaneshwari, T.V.**, "Lack of trehalose catabolism in Sinorhizobium species increases their nodulation competitiveness on certain host genotypes." *The New Phytologist* (April 17, 2008)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18422894> (aksessert Oktober 17, 2008,).
- Andersen, S.S.**, *Case-studier og generalisering: forskningsstrategi og design*. (Bergen: Fagbokforlaget, 1997).
- Baron, S.**, *Medical Microbiology*. 4th edn (University of Texas Medical Branch, 1996).
- Birnboim, H.C., og Doly, J.**, "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." *Nucleic Acids Research* 7, no. 6 (November 24, 1979): 1513-23.
- Bjørndal, C.R.P.**, *Det vurderende øyet: observasjon, vurdering og utvikling i undervisning og veiledning*. (Oslo: Gyldendal akademisk, 2002).
- Bungum, B., og Jorde, D.**, *Naturfagdidaktikk: perspektiver, forskning, utvikling*. (Oslo: Pensumtjeneste).
- Cold Spring Harbor Protocols**, *Cold Spring Harbor Protocols* <http://cshprotocols.cshlp.org/> (aksessert November 6, 2008,).
- Plomp, T., og Howie, S.J.**, *Contexts of learning mathematics and science: lessons learned from TIMSS*, (London: Routledge, 2006).
- Darnell, J., Matsudaira, P., Zipursky, L., Lodish, H., Berk, A., og Baltimore, D.**, *Molecular Cell Biology*. 4th edn (W. H. Freeman, 1999).
- Elbein, A. D.**, "The metabolism of alpha,alpha-trehalose." *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* 30 (1974): 227-56.
- Fischer, H-M.**, "Environmental regulation of rhizobial symbiotic nitrogen fixation genes." *Trends in Microbiology* 4, no. 8 (August 1996): 317-320.
- Fredman, D, Jobs, M., Strömqvist, L., og Brookes, A.J.**, "DFold: PCR design that minimizes secondary structure and optimizes downstream genotyping applications." *Human Mutation* 24, no. 1 (Juli 2004): 1-8.
- Gage, D.J.**, "Infection and Invasion of Roots by Symbiotic, Nitrogen-Fixing Rhizobia during Nodulation of Temperate Legumes." *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, no. 2 (Juni 1, 2004): 280-300.
- Gehl, J.**, "Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research." *Acta Physiologica Scandinavica* 177, no. 4 (April 2003): 437-47.

- Gerhardt, P., Willis, R.G.E.M., Wood, A., og Krieg, N.R.,** *Methods for General & Molecular Bacteriology*. (Washington DC: American Society for Microbiology, 1994).
- Glenn, A.R., og Dilworth, M.J.,** "The uptake and hydrolysis of disaccharides by fast-and slow-growing species of *Rhizobium*." *Archives of Microbiology* 129, no. 3 (Mai 1, 1981): 238-239.
- Goodner, B., Hinkle, G., Gattung, S., Miller, N., Blanchard, M., Quorollo, B., mfl,** "Genome Sequence of the Plant Pathogen and Biotechnology Agent *Agrobacterium tumefaciens* C58." *Science* 294, no. 5550 (Desember 14, 2001): 2323-2328.
- Griffiths, A.J.F., Gelbart, W.M., Lewontin, R.C. og Miller, J.H.,** *Modern Genetic Analysis: Integrating Genes and Genomes*. 2 edn (W. H. Freeman, 2002).
- Grønmo, L.S., Bergem, O.K., Kjærnsli, M., Lie, S. og Turmo, A.,** *Hva i all verden har skjedd i realfagene?: norske elevers prestasjoner i matematikk og naturfag i TIMSS 2003*, (Oslo: Institutt for lærerutdanning og skoleutvikling, Universitetet i Oslo, 2004), 5/2004.
- Imsen, G.,** *Elevens verden: innføring i pedagogisk psykologi*. (Oslo: Universitetsforlaget, 2005).
- Invitrogen Corporation,** "TOPO TA Cloning" (Invitrogen Corporation, 2006).
- Jensen, J.B., Ampomah, O.Y., Darrah, R., Peters, N.K., og Bhuvanewari T.V.,** "Role of trehalose transport and utilization in *Sinorhizobium meliloti*--alfalfa interactions." *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI* 18, no. 7 (Juli 2005): 694-702.
- Jensen, J.B., R., Peters, N.K., og Bhuvanewari T.V.** "Redundancy in Periplasmic Binding Protein-Dependent Transport Systems for Trehalose, Sucrose, and Maltose in *Sinorhizobium meliloti*." *J. Bacteriol.* 184, no. 11 (Juni 1, 2002): 2978-2986.
- Johnson, R.B, og Christensen, B.L.,** *Educational Research: Quantitative, Qualitative, and Mixed Approaches*. 3rd edn (Sage Publications, Inc, 2007).
- Klette, K., Lie, S., Ødegaard, M., Anmarkrud, Ø., Arnesen, N., Bergem, O.K., mfl,** "Rapport om forskningsprosjektet PISA+." <http://www.hio.no/content/download/87229/691072/version/1/file/Sluttrapport+NFR++PISA%2B2008.pdf> (aksessert August 23, 2008,).
- Kunnskapsdepartementet (a),** "'Realfag, naturligvis'." http://www.regjeringen.no/nb/dep/kd/dok/rapporter_planer/rapporter/2002/Realfag-naturligvis.html?id=105788 (aksessert September 5, 2008,).
- Kunnskapsdepartementet (b),** "Kunnskapsløftet." <http://www.regjeringen.no/nb/dep/kd/tema/andre/Kunnskapsloeftet.html?id=1411> (aksessert Oktober 30, 2008,).

- Kunnskapsdepartementet (c)**, "Udir.no - Fastsatte læreplaner." http://udir.no/templates/udir/TM_UtdProgrFag.aspx?id=2103 (aksessert Oktober 28, 2008,).
- Kunnskapsdepartementet (d)**, "Udir.no - Læreplan i biologi - programfag i studiespesialiserende utdanningsprogram." http://udir.no/templates/udir/TM_L%C3%A6replan.aspx?id=2100&laereplanid=170703 (aksessert Desember 9, 2008,).
- Kunnskapsdepartementet (e)**, "Udir.no - Læreplan i naturfag." http://udir.no/templates/udir/TM_L%C3%A6replan.aspx?id=2100&laereplanid=117461 (aksessert Desember 9, 2008,).
- Kvale, S.**, *Det kvalitative forskningsintervju*. (Oslo: Ad notam Gyldendal, 1997).
- Lyngsnes, K.M. og Rismark, M.**, *Didaktisk arbeid*. (Oslo: Gyldendal, 2007).
- PISA**, "OECD-PISA i Norge." <http://www.pisa.no/> (aksessert Oktober 29, 2008,).
- Raven, P.H., Evert, R.F. og Eichhorn, S.E.**, *Biology of Plants*. 1 edn (W. H. Freeman, 1999).
- Schoch, R.**, "Q&A - A Conversation with Kerry Mullis." *California Monthly* 105, no. 1 (September 1994): 20.
- Sjøberg, S.**, *Naturfag som almindannelse: en kritisk fagdidaktik*. (Århus: Klim, 2005).
- Smith, L.T., Smith, G.M., D'Souza, M.R., Pocard, J-A., Rudulier, D., og Madkour, M.A.**, "Osmoregulation in *Rhizobium meliloti*: Mechanism and control by other environmental signals." *Journal of Experimental Zoology* 268, no. 2 (1994): 162-165.
- Soto, M.J., Sanjuán, J., og Olivares, J.**, "Rhizobia and plant-pathogenic bacteria: common infection weapons." *Microbiology (Reading, England)* 152, no. Pt 11 (November 2006): 3167-74.
- Spaink, H.P.**, "Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria." *Annual Review of Microbiology* 54 (2000): 257-88.
- Kjærnsli, M., Lie, S., Olsen, R.V. og Roe, A.**, *Tid for tunge løft: norske elevers kompetanse i naturfag, lesing og matematikk i PISA 2006*, (Oslo: Universitetsforl.).
- TIMSS**, "TIMSS Norge." http://www.timss.no/timss05_om.html (aksessert Oktober 29, 2008,).
- Tzfira, T. og Citovsky, V.**, "Agrobacterium-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology." *Current Opinion in Biotechnology* 17, no. 2 (April 2006): 147-154.
- Viswanathan, V.K, Krcmarik, K, og Cianciotto, N.P.**, "Template secondary structure promotes polymerase jumping during PCR amplification." *BioTechniques* 27, no. 3 (September 1999): 508-11.

White, C.E. og Winans, S.C., “Cell-cell communication in the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens*.” *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 362, no. 1483 (Juli 29, 2007): 1135-48.

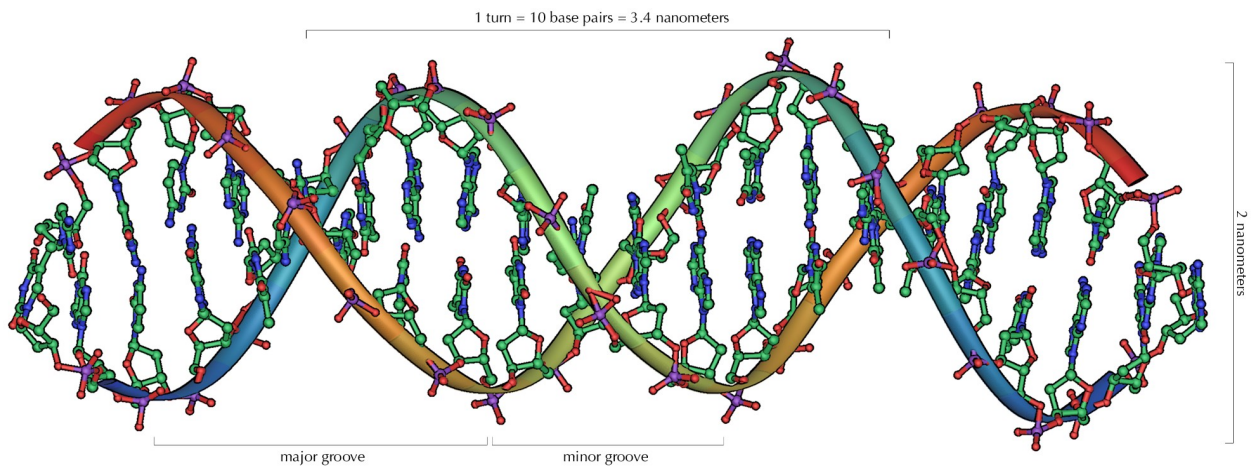
Wilson, K., “Preparation of genomic DNA from bacteria.” *Current Protocols in Molecular Biology* / Edited by Frederick M. Ausubel ... [et Al Chapter 2 (November 2001): Unit 2.4.

Appendiks 1. Forberedelseskompndiet.

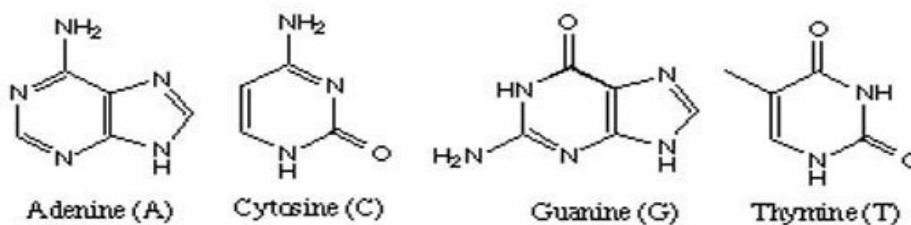
Genetic fingerprinting – en kort introduksjon

- Genetisk fingerprinting (fingeravtrykk) er en metode der man kan skille forskjellige individer fra hverandre på bakgrunn av deres DNA.
- Det er altså som å ta et fingeravtrykk, bare at man gjør det med DNA fra cellene istedet for mønsteret på fingertuppene!

Deoxyribonucleinsyre (DNA)



- DNA inneholder den genetiske informasjonen som er nødvendig for utvikling og funksjon av levende organismer
- Informasjonen er lagret i form av basene adenin, cytosin, guanin og thymin



- Basene opererer i basepar, Adenin med Thymin (A-T) og Guanin med Cytosin (G-C)
- Noen områder av DNA'et er svært forskjellig mellom individer av samme art, og det er disse områdene man bruker i DNA fingerprinting.

For en animasjon av oppbyggingen til DNA sjekk ut:

<http://www.youtube.com/watch?v=qy8dk5iS1f0>

Polymerase Chain Reaction

- Metode for å kopiere opp mange kopier av en ønsket DNA sekvens
- Metoden består av 3 viktige steg
 1. Denaturering: DNA trådene skilles fra hverandre
 2. Annealing: Primere(korte DNA sekvenser) fester seg til hver av de skilte trådene
 3. Elongation: DNA polymerase kopierer opp nytt DNA dra der primeren festet seg
- Om man bruker PCR til å kopiere den delen av DNA som er ulik mellom individer, vil PCR produktene for hvert individ bli av forskjellig størrelse

Disse linkene forklarer deg nærmere om PCR:

<http://www.dnalc.org/ddnalc/resources/pcr.html>

<http://www.youtube.com/watch?v=v4L7rvmBXbY>

Gel elektroforese

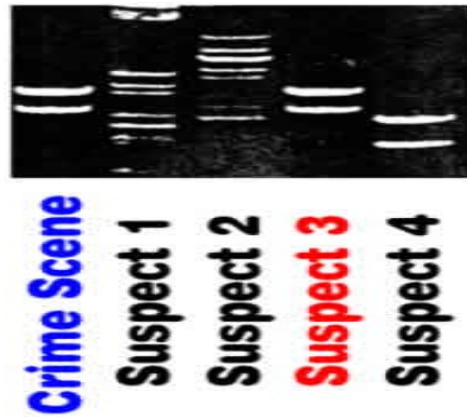
- Gel elektroforese er en laboratoriemetode som brukes for å skille molekyler av forskjellige størrelser fra hverandre, vi skal bruke metoden til å skille DNA tråder med forskjellig lengde fra hverandre
- Vi skiller molekylene fra hverandre ved å la de passere gjennom en gel som lar små molekyler passere raskere enn store.
- DNA er negativt ladet, vi kan derfor bruke elektrisk ladning til å trekke DNA molekylene gjennom gelen.

For en interaktiv gjennomgang av gelelektroforese gå til:

<http://learn.genetics.utah.edu/content/labs/gel/>

- Når du så har kjørt din gel kan du se forskjellige bånd på din gel. Disse båndene er DNA molekylene som du har separert

- DNA fra forskjellige mennesker vil vises som forskjellige bånd på en slik gel, og det er disse båndene man bruker for å separere menneskene i DNA fingerprinting



Appendiks 2. Kriminalgåten

Mysteriet på baren Pondus

På baren Pondus har det oppstått kaos etter at en ukjent gjerningsmann ved å beskrive Pondus hovedinteresse i livet, Liverpool, i særdeles nedsettende ordelag på uteplassens toalett.

Pondus selv er knust, men bombesikker på at det må være hans bestevenn Joke som har utført udåden, og truer kompisen med livsvarig utestengelse fra baren.

Joke på sin side er mildt sagt sjokkert over beskyldningene Pondus kommer med, og uttaler at "man har da fortsatt litt stolthet, de helligste tingene i livet kødder man bare ikke med!". Joke mener heller det må være sin ekskjæreste Camilla som har vært ute med pennen. Hun var innom baren rundt tidspunktet de obskøne uttalelsene på toalettet dukket opp. Camilla er også som kjent en svoren Manchester United fan, noe som gir henne en sikker plass på mistenktlisten.

Jokes forsvar roer Pondus temperament en smule, og han kommer plutselig på enda en mulig gjerningskvinne i saken. Pondus kone Beate sverget nylig hevn etter en krangel som oppstod da sendetiden til programmet "Sex og singelliv" tilfeldigvis falt på samme tidspunkt som fotballkampen mellom Norge og Nederland, hvorpå Pondus lurte til seg fjernkontrollen og Beate dermed måtte stå over sin faste TV stund.

Pondus har tatt saken såpass tungt at han har leid inn selveste Horatio Caine for å løse gåten. Horatio har selvfølgelig på ekstraordinært vis klart å skaffe seg DNA bevis av det som må være gjerningsmannen og de tre mistenkte i saken.

Nå har han sendt DNA prøvene til laboratoriet hvor det er du som har fått oppdrag å analysere hvem som er skyldig i saken. Som Horatio sier det, "let the evidence speak".

Lykke til!