

HANDS ON BIOTECH

EKSPERIMENT 4

Jagten på proteiner

LONE ALS EGEBO
LARS HAASTRUP PEDERSEN

TEORI
ELEVVEJLEDNING
LÆRERVEJLEDNING

EKSPERIMENT 4

Jagten på proteiner

Hands on Biotech - Jagten på proteiner

© Lone Als Egebo, Lars Haastrup Pedersen, Aalborg Universitet

Forfattere og faglig redaktion:

Lone Als Egebo og Lars Haastrup Pedersen

Illustrationer: Lotte Thorup

Kemiske strukturtegninger og reaktionsskemaer: Hanne Wolff

BioRender-illustrationer: se kildeliste

Omslag: Lotte Thorup

Shutterstock.com: Chokniti-Studio

Grafisk tilrettelægning: Lotte Thorup

1. udgave, 1. oplag 2023

ISBN: 978-87-89383-94-1

Udgivet af Aalborg Universitet – Institut for Kemi og Biovidenskab

Projektet er støttet af Novo Nordisk Fonden.

Kildeliste findes på projektets hjemmeside:

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

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



Ege-Bøger



Indhold

FORORD	5
--------------	---

TEORI **7**

Struktur og funktion af proteinet myoglobin.....	8
Struktur og funktion af ærteproteiner	9
Lysering af celler.....	10
Ionbytterkromatografi vha. FPLC.....	10
Fluorometri	11
Arbejdsspørgsmål	12

ELEVVEJLEDNING **13**

Formål	13
Flow	13
DEL A1 - EKSTRAKTION AF PROTEIN FRA OKSEKØD	14
Materialer pr. gruppe.....	14
Fremgangsmåde	14
DEL A2 - EKSTRAKTION AF PROTEIN FRA ÆRTEPROTEINPULVER.....	15
Materialer pr. gruppe.....	15
Fremgangsmåde.....	15
DEL B - OPRENSNING AF MYOGLOBIN/ÆRTEPROTEIN VHA. SMÅ SØJLER (PILOTFORSØG)	16
Materialer pr. gruppe.....	16
Fremgangsmåde.....	16
DEL C - ANALYSE AF RESULTATER VHA. FLUOROMETRI	18
Materialer	18
Flowdiagram	18
Fremgangsmåde.....	18
DEL D - OPRENSNING AF PROTEIN VHA. FPLC	19
Materialer (fælles)	19
Fremgangsmåde:.....	19
DEL E - ANALYSE AF PROTEINBESTANDDELE	20
Materialer	20
Flowdiagram.....	20
Fremgangsmåde.....	20
Farvning af gel	23
Efterbehandling	24

LÆRERVEJLEDNING **27**

Læreplanen.....	27
Teori.....	27
Flow.....	28
Kommentarer til eksperimentet	28

Forord

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

Materialet er målrettet undervisningen i bioteknologi/biologi i gymnasiet.

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

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

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

Nærværende hæfte knytter sig til hovedområdet 'Separation og oprensning', og består af teori, elevvejledning og lærervejledning til forsøget **Jagten på proteiner**.

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

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

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

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

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

EKSPERIMENT 4

Jagten på proteiner

Proteinrige fødevarer og foder kan blive en mangelvare i fremtiden, hvis der ikke findes nye bæredygtige kilder til fødevarereproduktionen. Hovedparten af proteinerne forventes i fremtiden at kunne komme fra velkendte landbrugsafgrøder som græs, kløver og andre bælglplanter, se figur 1.

Disse afgrøder er kendt for deres høje proteinindhold, og de kan produceres i Danmark og dermed mindske klimaaftrykket fx sammenlignet med import af sojaprotein.

Fremtidens protein kan også udvindes af bl.a. muslinger, insekter, tang og overskud fra fødevarereproduktionen. Samlet kan nye proteinkilder erstatte nogle af de proteinkilder, der typisk anvendes i dag og således medvirke til at mindske klimaaftrykket fra produktion af protein fra drøvtyggere som køer og får.

For at fremstille sunde og mættende fødevarer er det nødvendigt at kunne undersøge præcis, hvilke proteiner en afgrøde indeholder, og hvor stort indholdet er af den enkelte type protein. Til det formål findes forskellige bioteknologiske metoder til oprensning af protein.

I alle industrielle og forskningsmæssige sammenhænge, hvor proteiner er det ønskede produkt, er viden om hvordan protein kan oprenses også vigtig. Det gælder ikke mindst ved fremstilling af medicin (fx insulin til diabetespatienter) eller ved produktion af enzymer til vaskepulver.

I eksperimentet 'Jagten på proteiner' er formålet at afprøve forskellige trin i oprensning af proteiner. Bl.a. oprenses muskelproteinet myoglobin. Det er rødt og dermed let at følge gennem de enkelte oprensningstrin. Proteinet fungerer som transportør af dioxygen og findes i oksekød. Oprensning kan også foretages på proteinholdige produkter fra ærter.

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



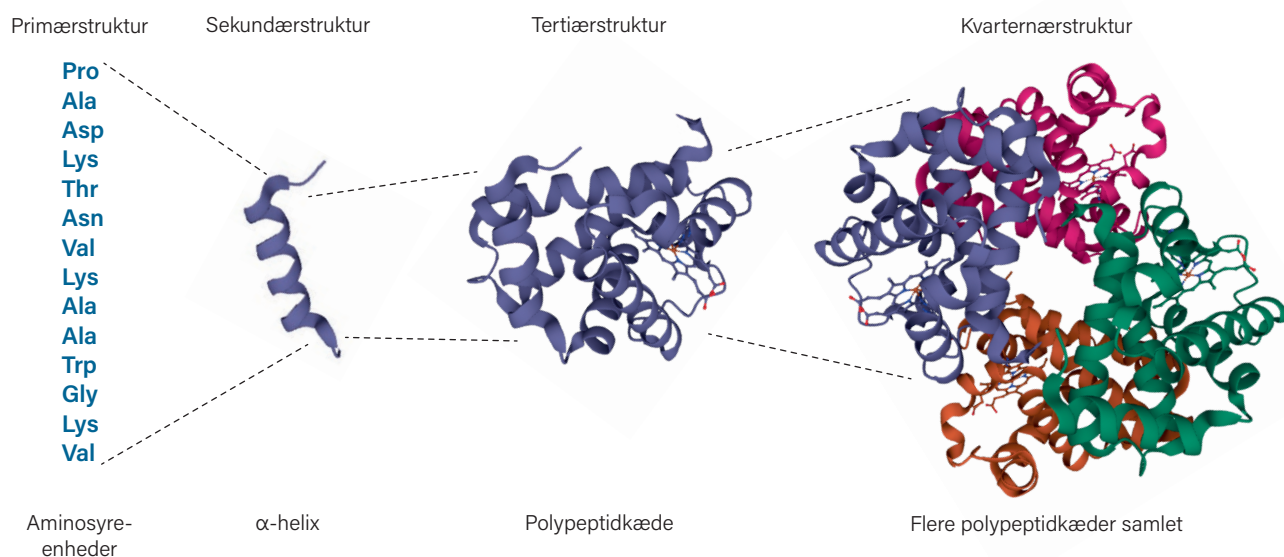
Figur 2. FN-verdensmål der er relevante i forhold til eksperimentet 'Jagten på proteiner'.

Foto ikke tilgængelig. Kan ses i den trykte udgave.

Figur 1. Ærter er proteinrige.

Struktur og funktion af proteinet myoglobin

Proteiners struktur kan betragtes og beskrives på op til fire niveauer der har stigende kompleksitet, se eksemplet med transportproteinet hæmoglobin i figur 3. Proteinet findes bl.a. hos pattedyr, og dets funktion er at transportere dioxygen i blodet, mens myoglobin har den tilsvarende funktion i muskelvæv.



Figur 3. Strukturniveauer i proteiner, her vist for transportproteinet hæmoglobin.

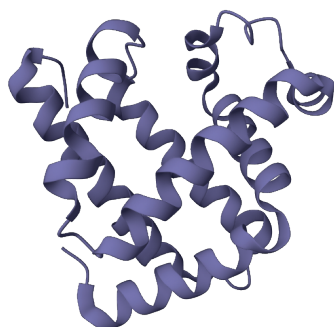
I figur 4 er angivet primærstrukturen for proteinet myoglobin fra kvæg, og det oprenses i forsøget fra oksekød.

Figur 4. Primærstrukturen af myoglobin fra kvæg, *Bos taurus*.

```

10      20      30      40      50
MGLSDGEWQL VLNAWGKVEA DVAGHGQEV L IRLFTGHPET LEKFDKFKHL
60      70      80      90      100
KTEAEMKASE DLKKHGNTVL TALGGILKKK GHHEAEVKHL AESHANKHKI
110     120     130     140     150
PVKYLEFISD AIHVLHAKH PSDFGADAQA AMSKALELFR NDMAAQYKVL
154
GFHG
    
```

De 154 aminosyrer i myoglobin er, som det fremgår af figuren, anført med et-bogstavs-betegnelse. Myoglobin er opbygget af forholdsvis mange aminosyrer med hydrofile sidegrupper (lilla, røde og blå farver). Det passer godt med at proteinets funktion er at oplagre og transportere dioxygen i muskelvævet, og det derfor flyttes rundt i muskelcellernes cytosol, der er et vandholdigt miljø.

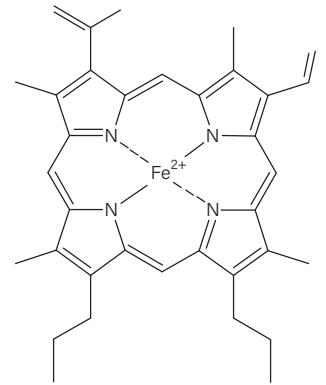


Figur 5. En 3D-model for myoglobin fra kvæg.

Figur 5 viser 3D-strukturen for myoglobin fra kvæg. Proteinet indeholder 8 α -helixer (sekundærstrukturen) der hver er dannet af fra 7 til 23 aminosyrer, og proteinets kæde er foldet til en *globulær* (kugleformet) 3D-form (tertiærstrukturen). Hos myoglobin er de fleste upolære sidekæder placeret, så de peger ind mod proteinets indre. Derved eksponeres de ikke til det vandholdige miljø som proteinet befinder sig i. Myoglobin har ingen kvarternærstruktur.

Myoglobin har en hæggruppe tilknyttet. Det er en organisk gruppe, der har en jern(2+)-ion i midten, se figur 6. Det er jern-ionen i hæggruppen, der giver hægoglobin og myoglobin deres røde farve, så blod og muskelvæv fremstår rødt.

Massen af et myoglobinmolekyle er ca. 17.000 unit. Det er en forholdsvis lille masse for et protein. Masseenheden for proteiner angives dog pr. tradition i *Dalton* (Da). En Dalton svarer til en atommasseenhed, altså 1 unit. Da de fleste proteiner indeholder over 100 aminosyrer, måles størrelsen typisk i kiloDalton (kDa). Myoglobin har således en masse på 17 kDa.



Figur 6. En hæggruppe med kompleksbundet jern i midten.

Struktur og funktion af ærteproteiner

Ærteplanters frø er meget proteinrige. Tørrede ærtefrø indeholder omkring 25 % protein. Af disse er 70-80 % store lagerproteiner. De tre vigtigste er legumin, vicilin og convicilin. De har en globulær form ligesom som myoglobin, men de har kvarternærstruktur. Den overordnede struktur for de tre proteiner er meget ens og minder om en trekantet klods. Vicilin og convicilin er opbygget af tre ens polypeptider (subunits) på hhv. 50 kDa og 70 kDa, som bindes til hinanden og danner en *trimer*. Legumin er opbygget af to typer af mindre polypeptider (α -kæder og β -kæder) på hhv. 20 kDa og 40 kDa, der først samles til subunits. Disse samles derefter tre og tre til en trimer, der igen samles to og to til en *hexamer*.

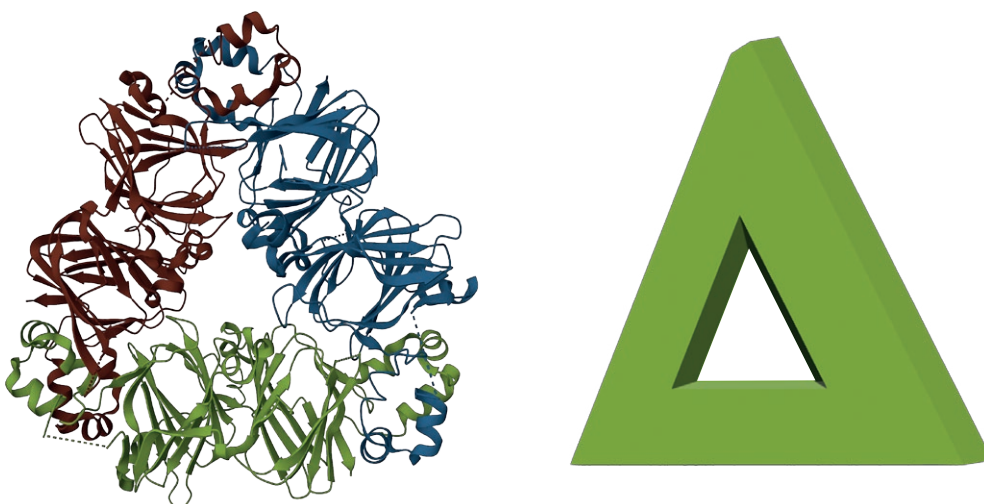
Figur 7 viser en tabel over størrelsen af subunits, trimerer og hexamerer i proteinerne.

Protein	Subunit (kDa)	Trimer (kDa)	Hexamer (kDa)
Vicilin	50	150	-
Convicilin	70	210	-
Legumin	60	180	360

Figur 7. Tabel over størrelsen af subunits, trimerer og hexamerer af tre ærteproteiner.

Figur 8 viser en detaljeret opbygning af en trimer for vicilin. Det ses, at de tre polypeptidkæders sekundærstrukturer både består af α -helixer og β -foldeblade.

Proteinerne er især på grund af deres størrelse uopløselige i vand.



Figur 8. 3D-model af trimer af vicilin. Kvarternærstrukturen har form som en trekantet klods.

Lysering af celler

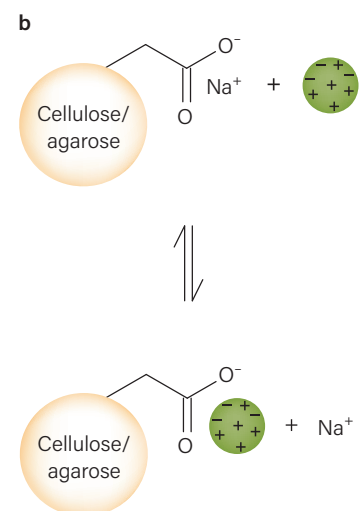
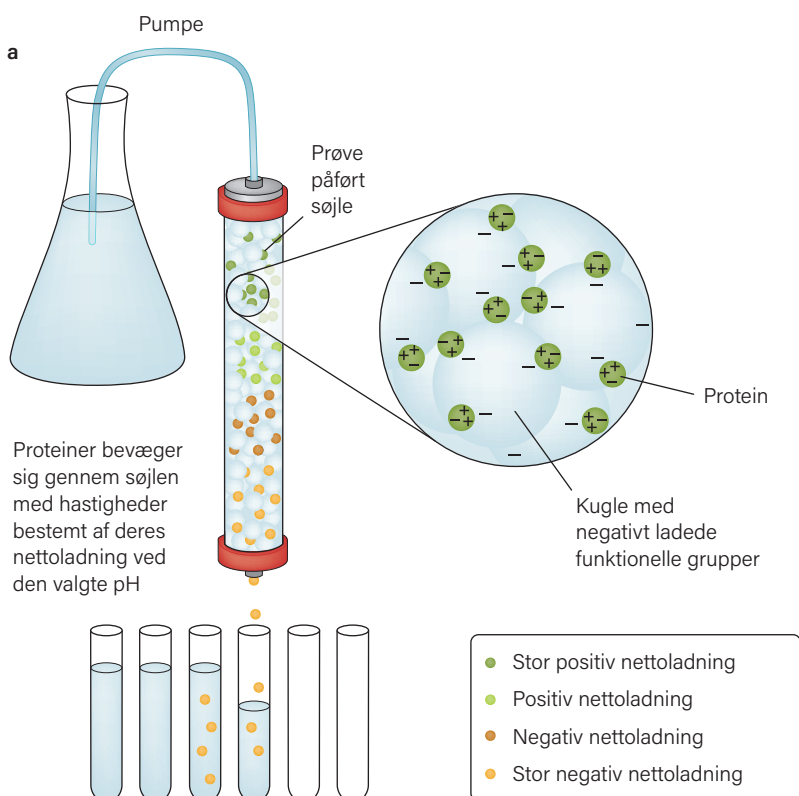
Før et protein kan oprenses, skal det frigøres fra cellerne. Det sker ved at *lysere* cellerne, hvilket vil sige, at de ødelægges. Det kan ske mekanisk, kemisk eller enzymatisk.

Genet for myoglobin udtrykkes kun i muskeltvæv, hvor det forekommer i store mængder. Derfor kan myoglobin frigøres fra muskeltvæv blot ved at skære skært oksekød i meget fine stykker med en skalpel, og derefter overføre det findelste kød til en bufferopløsning. Bufferopløsningen har en pH = 5,5 hvilket ligger under myoglobins isoelektriske punkt. Samtidig indeholder opløsningen NaCl i tilpas lav koncentration til at cellerne sprænges ved osmose. Saltet gør det samtidig muligt at holde myoglobin i opløsning. Således *ekstraheres* myoglobin sammen med andre proteiner fra oksekødet, hvilket vil sige at proteinerne udtrækkes fra muskelceller til vandfasen. Efterfølgende filtreres kødrester fra ved brug af et filter med en meget lille porestørrelse. Processen er illustreret i vejledningen til eksperimentet.

Ærteprotein ekstraheres fra ærteproteinpulver, der kan købes som kosttilskud. Fremgangsmåden for ekstraktion af myoglobin følges, da den også har vist sig at give et tilstrækkeligt udbytte af ærteprotein til videre behandling. De følgende oprensningstrin er også ens for myoglobin og ærteprotein.

Ionbytterkromatografi vha. FPLC

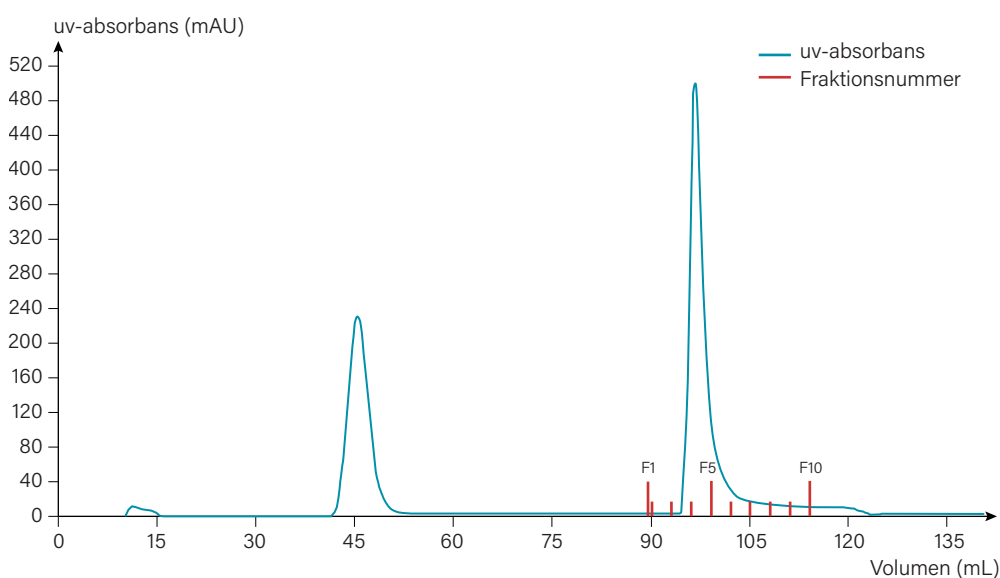
I eksperimentet 'Jagten på proteiner' anvendes en kationbyttersøjle, idet myoglobin har en positiv nettoladning ved den valgte pH = 5,5. Desuden kobles den anvendte ionbyttersøjle til et kromatografiudstyr, der består af en fraktionsopsamler, en detektor og pumper, så kromatografien kan ske hurtigt. Metoden kaldes derved *Fast-Protein-Liquid-Chromatography* (FPLC).



Figur 9.
a. Princippet i en kationbytning.
b. Illustration af ligevægten.

Kolonnen klargøres ved, at den mobile fase pumpes gennem søjlen. Den mobile fase består af en bufferopløsning svarende til ekstraktionsbufferen (der indeholder NaCl), og derved vil de positive ioner, der er bundet til søjlen, udskiftes med Na⁺-ioner. Derefter indføres prøven med det filtrerede råekstrakt til den mobile fase ved hjælp af en sprøjte med en kanyle. Den pumpes gennem søjlen, hvor proteiner med negativ nettoladning blot passerer forbi, mens proteiner der er positivt ladet ved bufferens pH, fx myoglobin, vil bindes til søjlen ved at bytte plads med Na⁺. Jo større positiv nettoladning et protein har, jo stærkere vil det bindes til søjlen. Bindingen er dog reversibel, og proteiner kan elueres i forskellige fraktioner ved gradvist at ændre den mobile fases sammensætning, så saltkoncentrationen stiger, se figur 9.

Den tid et protein tilbageholdes i kolonnen, kaldes *retentionstiden* (t_R). En uv-detektor måler absorbansen, når proteiner elueres fra søjlen, og der optegnes et *kromatogram*, se figur 10. Kromatogrammet viser toppe for hvert protein der passerer detektoren med angivelse af retentionstiden på x-aksen.



Figur 10. Kromatogram fra FPLC der viser oprensning af myoglobin. mAU står for milli absorbansenheder.

Fluorometri

Inden FPLC udføres, kan mængden af protein kvantificeres ved hjælp af metoden *fluorometri*.

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

Til fluorimetrisk måling anvendes et QubitTM fluorometer, se figur 11. Forud for en måling udføres et *assay*, det vil sige en analytisk procedure. En prøve tilsættes en opløsning, der indeholder et fluorescerende farvestof, der binder sig specifikt til protein. At farvestoffet er *fluorescerende*, betyder at det udsender lys af en bestemt farve, når det selv absorberer lys. Det fluorescerende farvestof er valgt, så det har en ekstrem lav fluorescens, indtil det bindes til et proteinmolekyle.



Figur 11. Qubit™ fluorometer.

Qubit™ fluorometeret udsender lys, og når en klargjort prøve placeres i apparatet, måles intensiteten af fluorescens i prøven. Der er ligefrem proportionalitet mellem intensiteten af fluorescens og koncentrationen af protein i opløsningen. Qubit™ fluorometeret måler prøvens fluorescens og omregner det til en proteinkoncentration ved hjælp af standardprøver med kendte koncentrationer af protein.

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

Arbejdsspørgsmål

1. Hvilke funktioner har proteiner i levende organismer? Kom med eksempler.
2. Nævn nogle gode proteinkilder.
3. Hvordan kan klimaaftrykket fra produktion af protein mindskes?
4. Hvilken funktion har proteinet myoglobin?
5. Beskriv myoglobins opbygning og struktur.
6. Hvilke aminosyrer forekommer hyppigst i myoglobin?
7. Hvilken funktion har ærteproteinerne legumin, vicilin og convicilin?
8. Beskriv vicilins opbygning og struktur.
9. Hvad er et proteins isoelektriske punkt?
10. Hvordan ekstraheres myoglobin fra kød?
11. Hvilken nettoladning har myoglobin ved pH = 5,5?
12. Forklar princippet i ionbytterkromatografi. Inddrag figur 9.
13. Forklar, hvorfor ionbytterkromatografi er velegnet til oprensning af myoglobin.
14. Hvordan ses det på et kromatogram, at myoglobin elueres fra kolonnen i forbindelse med ionbytterkromatografi?

EKSPERIMENT 4

Jagten på proteiner

Formål

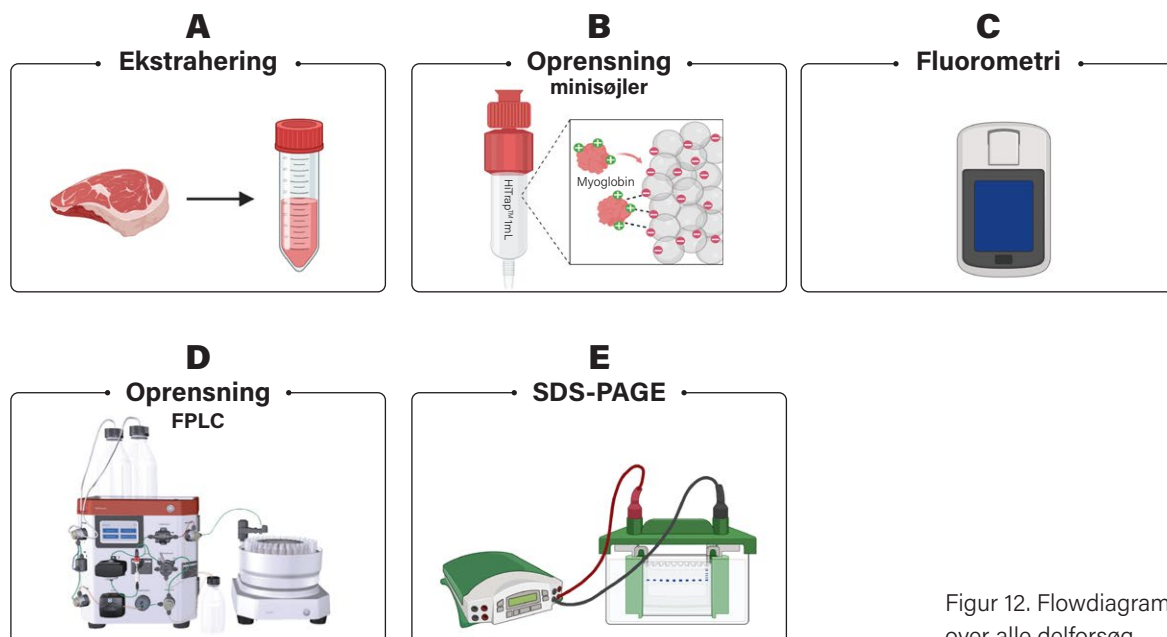
I dette eksperiment er formålet at afprøve forskellige trin i oprensning af proteiner. Det røde muskelprotein myoglobin er udvalgt til oprensning, da det på grund af sin farve er let at følge gennem de enkelte oprensningstrin. Proteinet findes bl.a. i oksekød, men forsøget kan også udføres med andre kødtyper. Alternativt kan eksperimentet udføres ved brug af ærteproteinpulver, hvor proteinerne er farveløse.

Flow

Eksperimentet har følgende flow og tidsforbrug, se figur 12:

- DEL A1 – Ekstraktion af protein fra oksekød – 45 min.
- DEL A2 – Ekstraktion af protein fra ærteproteinpulver – 45 min.
- DEL B – Oprensning af protein vha. små søjler (pilotforsøg) – 90 min.
- DEL C – Analyse af resultater vha. fluorometri – 30 min.
- DEL D – Oprensning af protein vha. FPLC – 90 min.
- DEL E – Analyse af resultater vha. SDS-PAGE – 100 min forberedelse + 30 min elektroforese + 40 min farvning/affarvning.

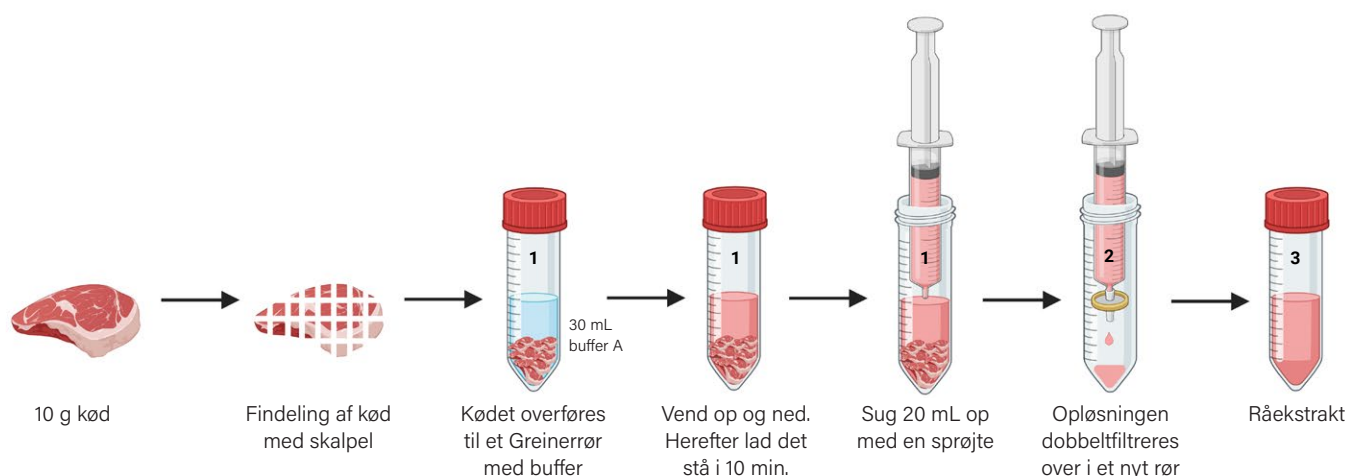
Vælg enten oksekød A1 eller ærteproteinpulver A2.



Figur 12. Flowdiagram over alle delforsøg.

DEL A1 - Ekstraktion af protein fra oksekød

Formålet med DEL A1 er at få ekstraheret proteiner fra kød. Arbejdsgangen for ekstraktion fra oksekød er illustreret i figur 13.



Figur 13. Fremgangsmåde for ekstraktion af protein fra oksekød.

Materialer pr. gruppe

- Skært oksekød (fersk oksekød giver de bedste resultater), 10 g
- Skalpell/køkkenknive + skærebrætter
- Buffer A (20 mM CH_3COONa , 20 mM NaCl, pH 5,5), ca. 30 mL
- Målebæger (50 mL), 1 stk.
- Greinerrør (50 mL), 3 stk.
- Engangssprøjter uden kanyle (20 mL), 1 stk.
- Engangsfiltre (0,45 μm), 4 stk.
- Mikropipetter + spidser (20-100 μL)
- Eppendorfrør (1,5 mL), 1 stk.
- Sprittusch
- Vægt

Fremgangsmåde

Klassen inddeles først i seks lige store grupper. Hver gruppe følger fremgangsmåden.

1. Afvej 10 g oksekød, og findel kødet med en skalpel eller køkkenkniv. Obs: Kødet skal stadig være småkød, så det skal ikke moses eller hakkes.
2. Overfør kødet til et rent 50 mL Greinerrør mærket med gruppenavn.
3. Tilsæt 30 mL Buffer A til Greinerrøret med oksekød.
4. Sæt låg på røret, og vend det forsigtigt nogle gange.
5. Lad opløsningen stå i 15 minutter. Vend røret forsigtigt hvert tredje minut. For oksekød ses en tydelig rødfarvning af væsken.
6. Sug ca. 20 mL af opløsningen op i en engangssprøjte. Undgå at suge partikler med op.
7. Et 0,45 μm engangsfiltre placeres på sprøjtens spids (skrues fast), og væsken presses igennem filteret og ned i et rent Greinerrør. Gentag filtreringen med et nyt filter og nyt rent Greinerrør, hvorpå der noteres 'proteinekstrakt' samt gruppe-

navn. Det dobbeltfiltrerede ekstrakt kaldes herefter proteinekstraktet, og der skal være mindst 10 mL ekstrakt.

- Udtag med en mikropipette 50 μ L af proteinekstraktet, og overfør dette til et Eppendorfrør. Røret markeres med teksten 'råekstrakt' samt gruppenummer og skal anvendes i DEL E.
- Tag et foto af Greinerrøret med proteinekstrakt, og gem det til DEL B og C.
- Greinerrør samt Eppendorfrør med proteinekstrakt kan opbevares på køl eller frost indtil anvendelse.

DEL A2 - Ekstraktion af protein fra ærteproteinpulver

Formålet med DEL A2 er at få ekstraheret proteiner fra ærteproteinpulver.

Materialer pr. gruppe

- Ærteproteinpulver 25 %, 2 g
- Buffer A (20 mM CH_3COONa , 20 mM NaCl, pH 5,5), ca. 20 mL
- Målebæger (50 mL), 1 stk.
- Greinerrør (50 mL), 3 stk. + 1 stk. (modvægt).
- Engangssprøjter uden kanyle (20 mL), 1 stk.
- Engangsfiltre (0,45 μ m), 2 stk.
- Mikropipetter + spidser (20-100 μ L)
- Eppendorfrør (1,5 mL), 1 stk.
- Sprittusch
- Vægt
- Centrifuge til Greinerrør

Fremgangsmåde

Klassen inddeles først i seks lige store grupper. Hver gruppe følger fremgangsmåden.

- Afvej 2 g 25 % ærteproteinpulver.
- Overfør ærteproteinpulveret til et rent 50 mL Greinerrør mærket med gruppenavn.
- Tilsæt 20 mL Buffer A til Greinerrøret med ærteproteinpulver.
- Sæt låg på røret, og vend det forsigtigt nogle gange. Ærteproteinet har tendens til at sidde fast på bunden af røret, så man kan med fordel kortvarigt vortexe prøven. Undgå dog så vidt muligt at danne for meget skum under sammenblandingen.
- Lad opløsningen stå i 15 minutter. Vend røret forsigtigt hvert tredje minut.
- Prøven med ærteproteinpulveret skal nu centrifugeres i 5 min ved 20.000 rcf (max speed). Husk modvægt, hvis der er et ulige antal prøver.
- Sug ca. 20 mL af opløsningen op i en 20 mL engangssprøjte. Undgå at suge partikler med op.
- Et 0,45 μ m engangsfiltre placeres på sprøjtens spids (skrues fast), og væsken presses igennem filteret og ned i et rent Greinerrør. Gentag filtreringen med et nyt filter og nyt rent Greinerrør, hvorpå der noteres 'proteinekstrakt' samt gruppenavn. Det dobbeltfiltrerede ekstrakt kaldes herefter proteinekstraktet, og der skal være mindst 10 mL ekstrakt.
- Udtag med en mikropipette 50 μ L af proteinekstraktet, og overfør dette til et Eppendorfrør. Røret markeres med teksten 'råekstrakt' samt gruppenummer og skal anvendes i DEL E.

10. Tag et foto af Greinerrøret med proteinekstraktet, og gem det til DEL B og C.
11. Greinerrør samt Eppendorfrør med proteinekstrakt kan opbevares på køl eller frost indtil anvendelse.

DEL B - Oprensning af myoglobin/æртеprotein vha. små søjler (pilotforsøg)

Formålet med DEL B er at undersøge hvilke betingelser der er de mest optimale til oprensning af myoglobin/æртеprotein fra proteinekstraktet fra DEL A.

Materialer pr. gruppe

- Buffer A (20 mM CH₃COONa, 20 mM NaCl, pH 5,5)
- Buffer B (20 mM CH₃COONa, 1000 mM NaCl, pH 5,5)
- Ethanol 20 %
- ELGA- eller Milli-Q-vand (ultrarent vand)
- Engangssprøjte uden kanyle (12 mL og 1 mL), 1 stk. af hver
- Eppendorfrør, (1,5 mL), 10 stk.
- Kationbytterkolonne (af typen HiTrap Sepharose Fast Flow) med kolonnevolumen på 1 mL, se figur 14, 1 stk.
- Måleglas, (10 mL), 1 stk.
- Bægerglas, 2-3 stk.
- Engangspipetter
- Stativ (eller andet der kan fastholde de små søjler)
- Greinerrør med proteinekstrakt fra DEL A



Figur 14. HiTrap Sepharose Fast Flow kationbytter-kolonne.

Fremgangsmåde

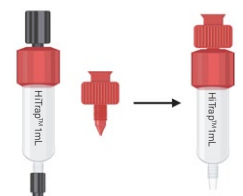
Der fortsættes i grupperne fra DEL A.

1. Forbered 10 mL elueringsbuffer ved at blande Buffer A og B i forskellige forhold i hver gruppe, så der arbejdes med forskellige saltkoncentrationer, se skema i figur 15.

Gruppe	Buffer A (mL)	Buffer B (mL)	c(NaCl) (mM)
1	9	1	118
2	8	2	216
3	7	3	314
4	0	10	1000

Figur 15. Skema med voluminer af buffer A og B samt koncentration af NaCl.

2. Gør en kolonne klar ved at skruede sorte låg i toppen og bunden af. Derefter skrues et rødt låg på i toppen, se figur 16. Obs: For at forhindre luftbobler i kolonnen er det vigtigt at til-sætte et par dråber væske (gerne Buffer A) til hullet i kolonnen hvor det røde låg skrues i, inden man skrues det røde låg på. Hver gang væske køres igennem kolonnen, skal en 12 mL



Figur 16. Klargøring af kolonne.

sprøjte skrues på det røde låg med undtagelse af ved loading af prøve, hvor der anvendes en 1 mL sprøjte. Inden sprøjten skrues på, er det en god idé at tilsætte et par dråber væske til hullet i toppen af det røde låg, således at der undgås at tilføre luft til kolonnen. Dette gøres også hver gang, der skiftes sprøjte.

3. Kolonnen fastgøres til et stativ.

Den følgende fremgangsmåde er vist i figur 17 nederst på siden. Samme figur er også vist på side 25 i hæftet i et større format.

4. Udtag 1 mL proteinekstrakt fra Greinerrør (DEL A), og tilsæt 1 mL Buffer A, så et volumen på 2 mL opnås. **Note: Dette gøres kun for råekstraktet fra oksekød.**
5. Sug det fortyndede proteinekstrakt op i en 1 mL sprøjte, og påfør 0,5 mL prøve på kolonnen. Undgå luft i sprøjten og på søjlen.
6. Vask derefter kolonnen med 5 mL Buffer A. Forsøg at påføre bufferen med en hastighed på 1 mL/min. Eluatet opsamles i et bægerglas, og der kan evt. gemmes en smule i et Eppendorfrør til DEL E (SDS-PAGE).
7. Opsæt en række med ti Eppendorfrør, og giv dem numre fra 1-10 samt gruppenummer. De skal anvendes til at opsamle proteinfraktionerne fra oprensningen.
8. Eluér med 5 mL elueringsbuffer-blanding (fra pkt. 1), hastighed 1 mL/min. Eluatet opsamles i de fem første Eppendorfrør, som fyldes til ca. 0,5 mL.
9. Eluér det sidste protein med 5 mL buffer B, hastighed ca. 1 mL/min. Eluatet opsamles i de fem sidste Eppendorfrør.
10. Tag foto af de opsamlede fraktioner.

Rørene med proteinfraktionerne kan nu gemmes på køl indtil evaluering, mens kolonnen renses og regenereres, som beskrevet i det følgende:

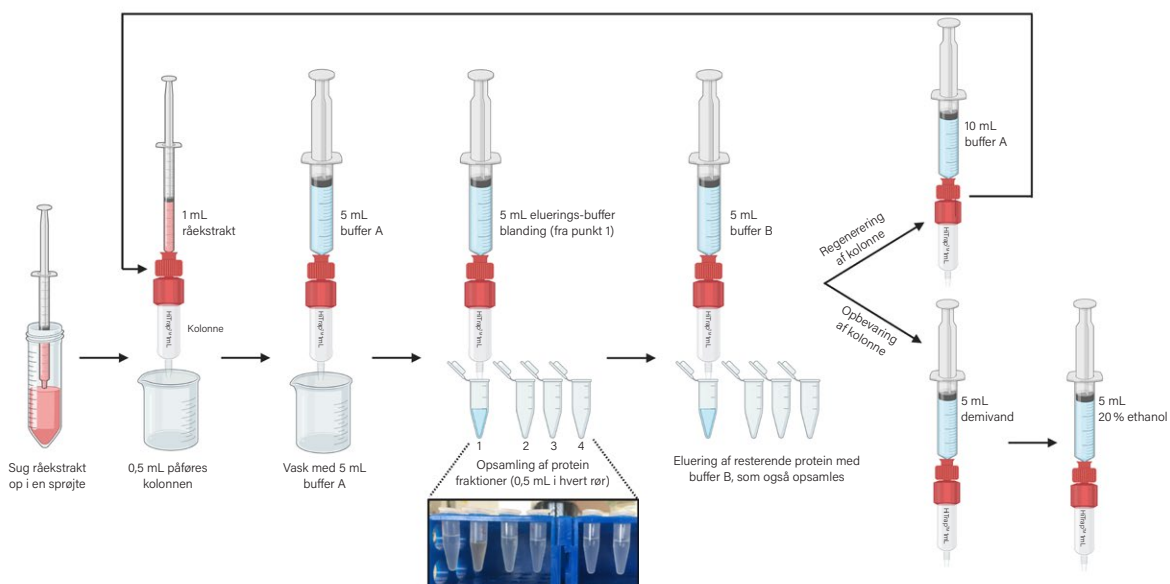
11. Regenerér med 5 mL Buffer B og derefter 10 mL Buffer A, hastighed 1 mL/min. Eluatet opsamles i et bægerglas.

Kolonnen er nu klar til næste runde.

Opbevaring:

1. Skyl med 5 mL ELGA/Milli-Q-vand og derefter med 5 mL 20 % ethanol.
2. Det røde låg skrues af, og de sorte låg skrues på henholdsvis toppen og bunden.

Figur 17. Fremgangsmåde for oprensning af proteiner fra oksekød ved brug af HiTrap Sepharose Fast Flow kolonne.



DEL C - Analyse af resultater vha. fluorometri

Formålet med DEL C er at måle proteinkoncentrationen i de opsamlede fraktioner fra DEL B. Arbejdes der med myoglobin, kan man nøjes med at vælge fraktionerne med den rødbrune farve. Arbejdes der med ærteprotein, kan man med fordel måle på alle elueringsfraktionerne, idet disse proteiner er farveløse.

Materialer

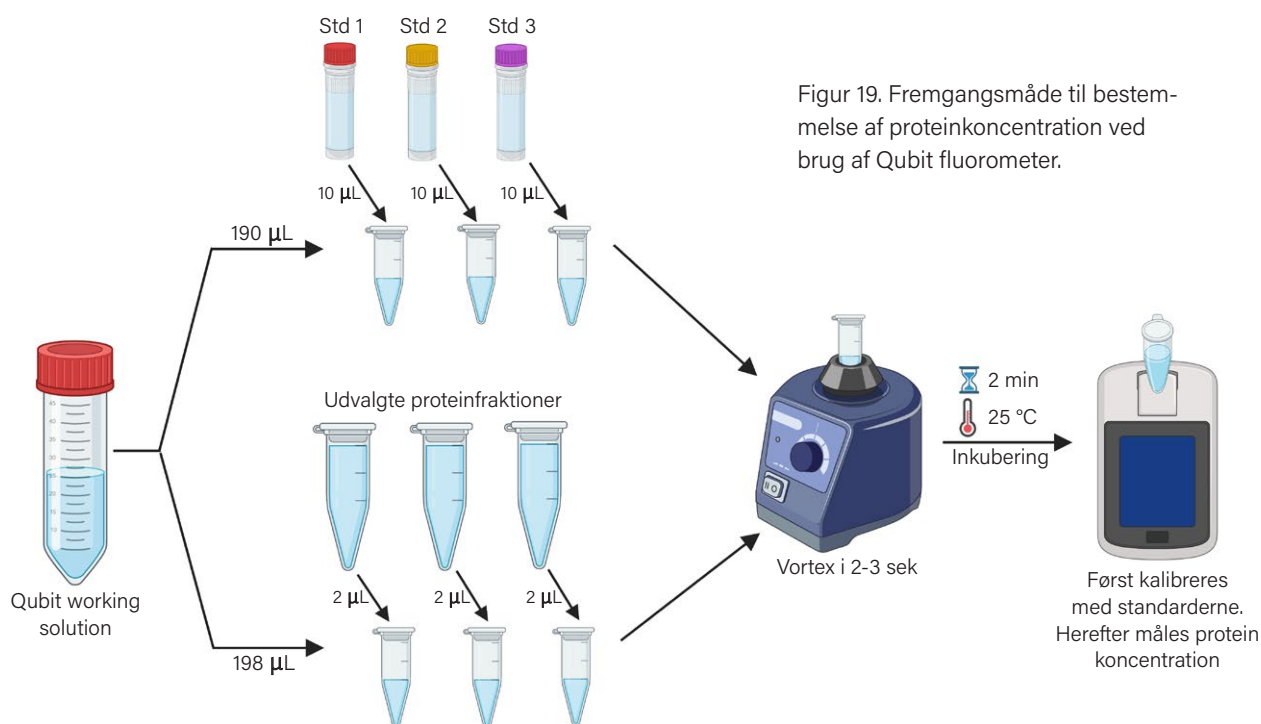
Qubit™ Protein Assay kit der indeholder følgende:

- Qubit™ protein Standard 1 (0 ng/μL)
- Qubit™ protein Standard 2 (200 ng/μL)
- Qubit™ protein Standard 3 (400 ng/μL)
- Working solution (fremstillet af Qubit™-reagens og buffer i forholdet 1:199)
- Qubit™ Assayrør, 0,5 mL
- Qubit™ fluorometer (figur 18)
- ELGA vand (ultrarent vand)



Figur 18. Qubit™ fluorometer.

Flowdiagram



Figur 19. Fremgangsmåde til bestemmelse af proteinkoncentration ved brug af Qubit fluorometer.

Fremgangsmåde

1. Proteinfraktioner (Eppendorfrør med prøver fra DEL B) udvælges til at bestemme proteinkoncentration (maks. 5 prøver pr. gruppe).
2. Klargør tre assayrør for standard 1, 2 og 3 samt et assayrør for hver prøve (figur 19).
3. Overfør 190 μL working solution og 10 μL af standarderne til hver deres rør.
4. Overfør 198 μL working solution og 2 μL prøve i et assayrør.

5. Vortex alle rør i 2-3 sek.
6. Lad prøverne hvile i 2 min. ved stuetemperatur.
7. Klik på 'Protein' på fluorometeret.
8. Vælg herefter 'Read standards' på fluorometeret.
9. Indsæt Standard 1 i fluorometeret efterfulgt af standard 2 og 3. Fluorometeret er nu kalibreret og klar til brug.
10. Indsæt prøven, og aflæs koncentration.
11. Fortynd prøven, hvis skærmen viser 'Sample concentration too high'. Lav eksempelvis en 1:10 fortynding (1 µL prøve og 9 µL ELGA vand). Gentag trin 4-8 med denne fortynding.

DEL D - Oprensning af protein vha. FPLC

Formålet med DEL D er at oprense myoglobin/æртеprotein fra proteinekstraktet fremkommet i DEL A. Her kan man vælge at køre forsøget af to omgange eller blot udvælge den ene proteinkilde.

Materialer (fælles)

- FPLC (ÄKTastart), se figur 20
- Fraktionsopsamler (Frac 30)
- Kationbytterkolonne (af typen HiTrap Sepharose Fast Flow) med kolonnevolumen på 5 mL
- Greinerrør med proteinekstrakt fra DEL A
- USB-stik



Figur 20. FPLC (ÄKTastart) koblet til fraktionsopsamler.

Fremgangsmåde

FPLC'en har display og forprogrammeret gradientprogram til oprensningen, som anvendes.

1. Placer slangen fra prøveventilen i prøven (figur 21).
Note: Hav altid mindst 1 mL ekstra prøve, således at der ikke kommer luftbobler med når prøven loades på FPLC'en.
2. Indsæt USB-stik.
3. Klik på 'Method run'.
4. Tryk 'Quick start'.
5. Tryk 'IEX gradient 5 mL HiTrap' (side 2 af 3).
6. Følgende indstilles:
Sample from = Pump
Sample volume = 5.0 mL
Markér afkrydsningsfeltet 'Save result to USB', og husk navnet der står på skærmen fx 'IEX01'.
7. Tryk 'Run'.



Figur 21. Udsnit af ÄKTastart FPLC'en, som viser prøveventil (sample valve).

Oprensningen tager ca. 40 min.

Ønskes der at oprense igen, gentages punkt 3-7.

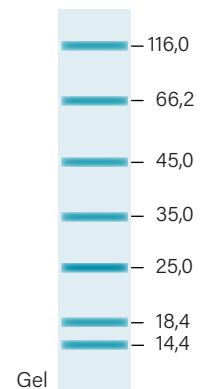
8. USB-stikket udtages fra FPLC'en, og data (kromatogrammet) ses på en PC. Ses der peaks (toppe) på kromatogrammet eller forskel i farve på de opsamlede fraktioner, udvælges disse fraktioner til analyse på SDS-PAGE (DEL E). Husk at gemme kromatogram til efterbehandlingen side 24.

DEL E - Analyse af proteinbestanddele

Formålet med DEL E er at analysere proteinbestanddelene vha. SDS-elektroforese.

Materialer

- Råekstrakt fra DEL A og proteinfraktioner fra DEL B og D
- Pipetter (1-10 μL , 20-200 μL , 100-1000 μL)
- Eppendorfrør (1,5 mL)
- Handsker
- Gel elektroforesesystem (Bio-Rad Mini-protean lodret elektroforesekar)
- Strømforsyning
- Varmeblok eller varmebad
- Vandbad med is
- Bordcentrifuge
- Farvebakke (plastikboks)
- Mikrobølgeovn
- Vippebord
- Grønt adskillelsesværktøj til gel
- Papirservietter
- Evt. plastiklomme og skanner
- SDS-gel
- Prøvebuffer (ddH₂O, dithiothreitol (DTT))
- Løbebuffer (Tris base, MOPS, SDS, EDTA) (husk at genbruge)
- Proteinvægtmarkør (Thermo Fisher #26610), se figur 22
- Coomassie Brilliant Blue (farver proteiner)
- Affarvningsbuffer (EtOH, AcOH, ddH₂O)
- ELGA eller Milli-Q-vand



Figur 22.
Proteinvægtmarkør.

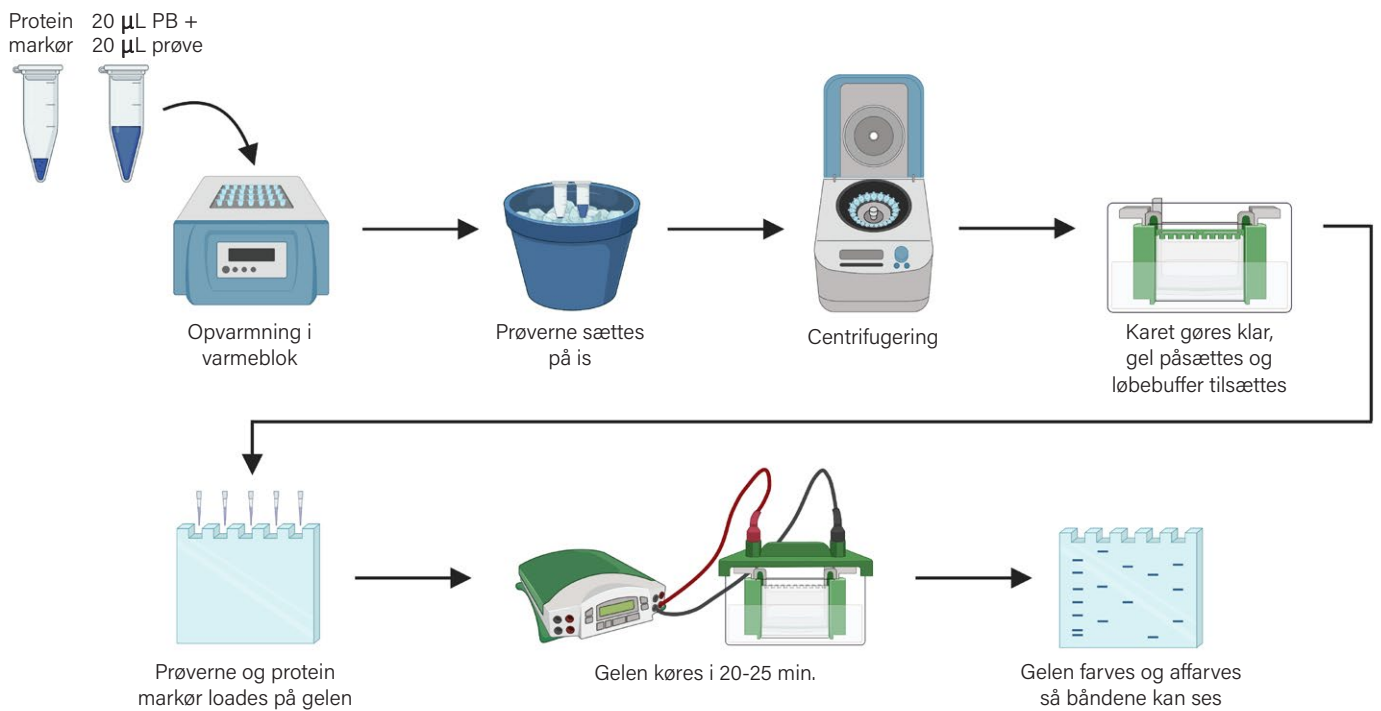
Flowdiagram

Se figur 23, side 21.

Fremgangsmåde

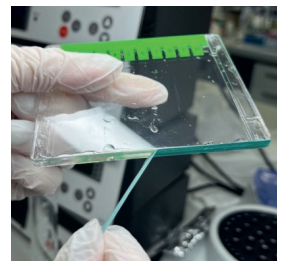
En oversigt over fremgangsmåden er vist i figur 23.

1. Råekstrakt i Eppendorfrør fra DEL A samt fire proteinfraktioner fra minisøjler (DEL B) og fire fra FPLC'en (DEL D) udvælges til analyse på SDS-PAGE. Fra hver udvalgt fraktion overføres 20 μL af hver til separate Eppendorfrør. Husk at markere de forskellige Eppendorfrør (f.eks. 'Rå ekstrakt', 'Eluering 1', 'Eluering 2' osv.).
2. Tilsæt 20 μL prøvebuffer (PB) til hvert af Eppendorfrørene med prøverne. Husk ren pipettespids til hver pipettering.

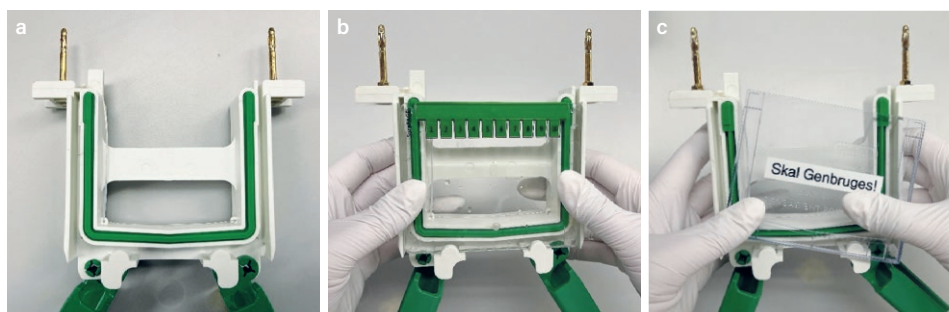


Figur 23. Fremgangsmåde til udførelse af SDS-PAGE.

- Alle prøver samt proteinvægtmarkør opvarmes i 5 min ved 95 °C (i vandbad eller varmeblok). Imens prøverne varmes og i punkt 4 nedkøles, gøres SDS-PAGE klar (punkt 5).
- Herefter sættes prøverne på is i 5 min, hvorefter de centrifugeres kort i en bordcentrifuge på max speed (fx 14.500 rpm i 20 sekunder).
- Tag et par handsker på, og pak gelen ud.
- VIGTIGT! Fjern det grønne stykke tape i bunden (se figur 24).**
- Tjek at den grønne gummiring ved gelmodulet vender rigtigt, se figur 25a. Hvis det er gelen, som skal påsættes modulet, skal indhakked i gummiringen vende indad. Anvendes der en plastikbufferdam, skal indhakked ved den grønne gummiring vende udad, se figur 25b og c. Det er vigtigt, at indhakked i plastikbufferdammen og hakket ved gummiringen presses tæt sammen.
- Rummet imellem gelerne fyldes først helt op med løbebuffer (figur 26). Tjek om der siver løbebuffer ud af beholderen, før der fyldes løbebuffer i resten af karet. Holder rummet imellem gelerne ikke tæt, skal hele indsatsen skilles ad og sættes ordentlig sammen. Karret tørres af, inden der forsøges igen.



Figur 24. Fjernelse af det grønne stykke tape fra bunden af gelen. Dette er vigtigt at huske for at sikre det elektriske felt gennem gelen.



Figur 25. a. Siden med indhakked ved gummiringen vender indad. b. Gelen påsættes ved gummiringen med siden uden hakket. c. Plastikbufferdammen placeres ved gummiringen med hakket.



Figur 26. Rummet, som er tæt mellem gelerne, er fyldt med løbebuffer.

9. Den grønne kam i toppen af gelen (figur 25b) fjernes ved at placere begge tommelfingre på kammen, for derefter at skubbe den forsigtigt væk fra gelen.
10. 7 μL af proteinvægtmarkøren loades (på sættes) i den første brønd med pipetten, og 25 μL af hver af prøverne tilføres hver af de resterende brønde. Husk ren pipettespids ved hver enkelt pipettering. Husk at notere rækkefølgen af de enkelte prøver. Anvend skema (figur 27) til at holde styr på rækkefølgen.

Brønd	Prøve	Mix	Load
1	Markør	Er blandet	7 μL
2	Udvalgt fraktion 1, DEL B	20 μL prøve+20 μL PB	25 μL
3	Udvalgt fraktion 2, DEL B	20 μL prøve+20 μL PB	25 μL
4	Udvalgt fraktion 3, DEL B	20 μL prøve+20 μL PB	25 μL
5	Udvalgt fraktion 4, DEL B	20 μL prøve+20 μL PB	25 μL
6	Udvalgt fraktion 1, DEL D	20 μL prøve+20 μL PB	25 μL
7	Udvalgt fraktion 2, DEL D	20 μL prøve+20 μL PB	25 μL
8	Udvalgt fraktion 3, DEL D	20 μL prøve+20 μL PB	25 μL
9	Udvalgt fraktion 4, DEL D	20 μL prøve+20 μL PB	25 μL
10	Råekstrakt, DEL A	20 μL prøve+20 μL PB	25 μL

Figur 27. Skema over påsætning af fraktioner på gel.

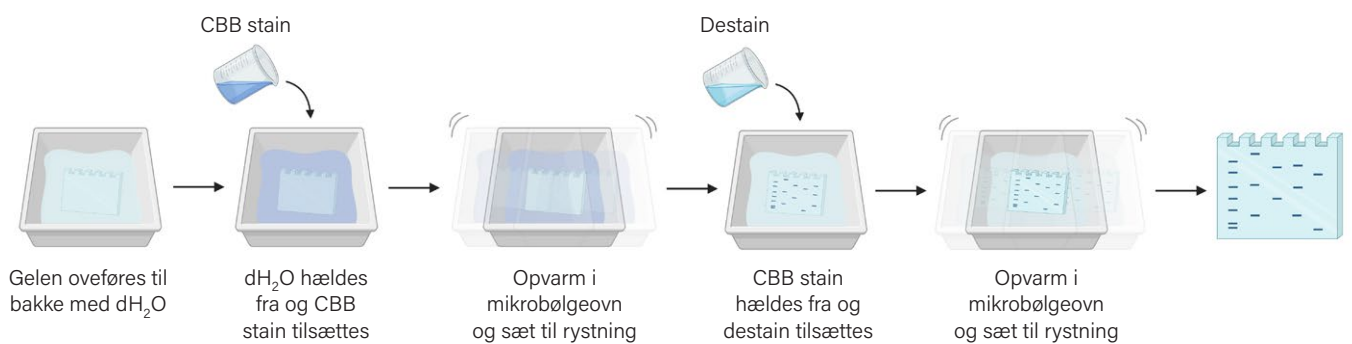
11. Når prøverne er loadet på gelen, tjekkes det, at rummet imellem de to kar stadig er helt fyldt med buffer. Er dette ikke tilfældet, tilsættes der blot mere buffer.
12. Låget sættes på karret, og strømstikkene isættes strømforsyningen (rødt stik til rød indgang – sort stik til sort indgang).
13. Strømforsyningen tændes, hvorved der sættes en strøm over gelen med konstant spændingsforskel på 70 V i 5 minutter og herefter 200 V i ca. 22 minutter. (Når strømmen er startet, skal det gerne begynde at boble med O_2 inde i karret, og hvis det ikke er tilfældet, sidder gelen enten ikke rigtigt, eller også er der for lidt buffer i karret).
14. Fortsæt elektroforesen indtil den blå frontlinje har arbejdet sig ned til bunden af gelen (efter ca. 20-23 min).
15. Elektroforesecellen skilles ad, og gelen udtages.
16. Gelen sidder imellem to stykker plastik. Disse skilles ad som vist på figur 28. Der er fire indhak på gelen, hvor værktøjet indsættes og vrikkes, til det siger klik. Pas på ikke at ødelægge gelen i denne proces.



Figur 28. Plastikpladerne har fire indhak, to på hver side. Værktøjet indsættes mellem de to plastikplader ved hvert indhak og vrikkes op og ned, indtil det siger klik. Sørg for den er ordentligt skilt ved alle fire punkter, før gelen overføres til farvning.

Farvning af gel

1. Fyld farvebakken med ELGA/Milli-Q-vand, og overfør gelen til bakken.
2. ELGA/Milli-Q-vandet hældes fra, og der tilsættes Coomassie Brilliant Blue (CBB), indtil gelen er dækket (figur 29). Låget sættes på bakken.
3. Farvebakke med indhold varmes i mikrobølgeovn i 20 sekunder.
4. Bakken med gelen placeres på et vippebord i 10 minutter.
5. CBB hældes fra gelen tilbage i flasken og genbruges (CBB må IKKE hældes ud i vasken), og affarvningsbuffer tilsættes, så det dækker gelen.
6. Blandingen opvarmes igen i 20 sekunder i mikrobølgeovnen.
7. Et par foldede papirservietter lægges ned i bakken til gelen for at suge farven (der skal stadig være væske i beholderen).
8. Lad gelen affarve i 10 min, hvorefter papirservietterne skiftes. Allerede her burde det være muligt at se nogle blå farvede proteinbånd på gelen (disse bånd ses lettere ved at løfte bakken op fra bordet).
9. Lad gelen affarve fuldstændigt (skift papir ca. hvert tiende minut og tilsæt evt. mere buffer), og derefter kan proteinoprensningen visualiseres.
10. Gelen fotograferes og gemmes evt. i en plastiklomme.



Figur 29. Farvning og affarvning af gelen til visualisering af proteinbånd.

Efterbehandling

DEL A:

1. Forklar hvorfor myoglobin kan ekstraheres ved hjælp af buffer A.
2. Forklar hvorfor prøven filteres.
3. Indsæt foto af gruppens proteinekstrakt. Kommenter billedet.
4. Angiv mulige fejlkilder og deres betydning i denne del af forsøgsrækken.
5. Hvilke typer protein findes i ærter, og hvilken funktion har de?

DEL B:

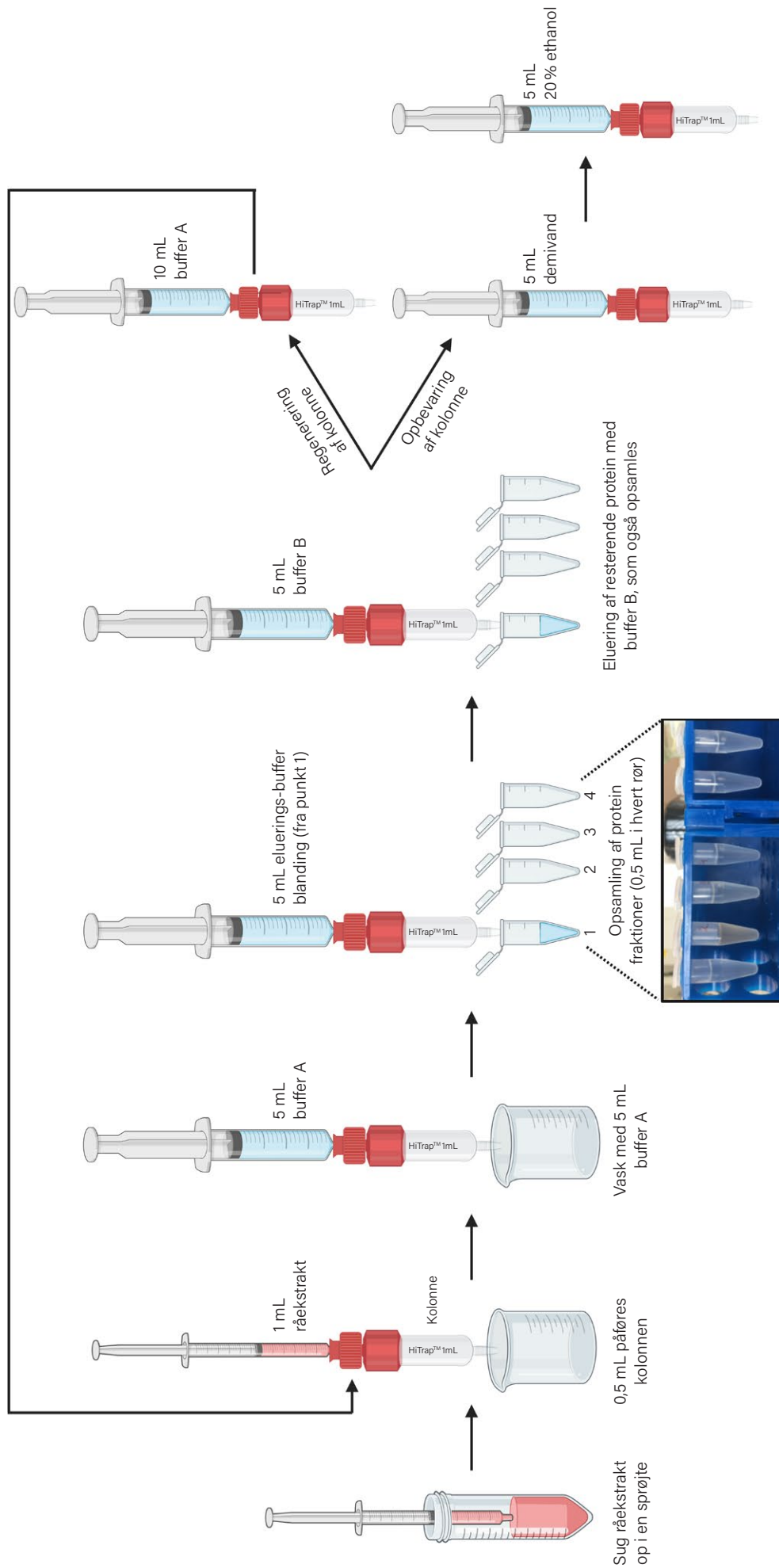
1. Vis ved beregning, hvordan koncentrationerne af NaCl vist i skema i figur 15 side 16 er fremkommet.
2. Forklar formålet med hvert enkelt punkt, vist i fremgangsmåden på figur 17, side 17.
3. Indsæt foto af gruppens opsamlede fraktioner.
4. Angiv om eller ved hvilke(n) saltkoncentration(er), myoglobin elueres.
5. Sammenlign med de andre gruppers resultater, og forklar hvorfor resultaterne adskiller sig fra hinanden.
6. Angiv mulige fejlkilder og deres betydning i denne del af forsøgsrækken.

DEL C:

1. Indsæt et billede af kromatogrammet, og analysér resultaterne.
2. Kommenter sammensætning af buffer A og B i DEL C sammenholdt med resultaterne fra DEL B.
3. Angiv mulige fejlkilder og deres betydning i denne del af forsøgsrækken.

DEL E:

1. Indsæt et billede af gelen og kommenter resultatet – bestem størrelsen af proteinerne i udvalgte bånd, og angiv hvilket bånd der svarer til myoglobin.
2. Angiv mulige fejlkilder og deres betydning i denne del af forsøgsrækken.
3. Lav en samlet konklusion for forsøgsrækken, og tag herunder stilling til om formålene for de enkelte delforsøg er opfyldt.



Figur 30.
 (Forstørrelse af figur 17).
 Fremgangsmåde for oprensning af proteiner fra oksekød ved brug af HiTrap Sepharose Fast Flow kolonne.

EKSPERIMENT 4

Jagten på proteiner

Læreplanen

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

- Proteiners opbygning, forekomst og egenskaber
- Separationsteknikker, herunder elektroforese og søjlekromatografi

Eksperimentet kan indgå i temaer der perspektiverer kernestoffet indenfor sundhed, sygdom og medicin; bæredygtig produktion af fødevarer, energi og kemiske stoffer; ny forskning og nye bioteknologiske metoder.

Teori

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

- Proteiners struktur og funktion
- Søjlekromatografi (ionbytning)
- SDS-PAGE

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

Desuden er det en fordel at kende til:

- De anvendte proteiners struktur og funktion
- Lysering af celler
- FPLC

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

Flow

Eksperimentet har følgende flow og tidsforbrug:

- DEL A1 – Ekstraktion af protein fra oksekød – 45 min
- DEL A2 – Ekstraktion af protein fra ærteproteinpulver – 45 min
- DEL B – Oprensning af protein vha. små søjler (pilotforsøg) – 90 min
- DEL C – Analyse af resultater vha. fluorometri – 30 min
- DEL D – Oprensning af protein vha. FPLC – 90 min
- DEL E – Analyse af resultater vha. SDS-PAGE – 100 min forberedelse + 30 min elektroforese + 40 min farvning/affarvning

Kommentarer til eksperimentet

DEL A – Ekstraktion af protein.

- Gymnasiet forventes selv at have vægt samt skærebræt og køkkenknive/skalpeller.
- Efter ekstraktion kan rør med ekstrakt lægges på køl eller frost.

DEL B – Oprensning af protein vha. små søjler (pilotforsøg).

- Gymnasiet forventes selv at have engangspipetter, måleglas, bægerglas samt stativer eller lign., der kan fastholde de små søjler.
- Rør med proteinfraktioner gemmes på køl.
- DEL C (FPLC) kan godt startes og køre samtidig med DEL B.

DEL D – Oprensning af protein vha. FPLC.

- Få en kollega til at hjælpe med at få det samlede FPLC + tilbehør op af transportkassen, da det kræver mere end to hænder.

DEL E – Analyse af resultater vha. SDS-PAGE.

- Gymnasiet forventes selv at have varmeblok/varmebad og mikrobølgeovn.
- For at spare tid kan der evt. 'tørloades'. Det vil sige at eleverne placerer gelen lodret på arbejdsbordet og loader brøndene inden placering i gelkammeret. Først efter placering af loadede geler i kammeret fyldes der løbebuffer på. Vær meget forsigtig, når bufferen når op til brøndene.

HANDS ON BIOTECH

EKSPERIMENT 4

Jagten på proteiner

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

Hæftet er delt op i tre kapitler:

- Teori
- Elevvejledning
- Lærervejledning