

Øvelse 4 – Jagten på proteiner

Proteinrige fødevarer og foder kan blive en mangelvare i fremtiden, hvis der ikke findes nye bæredygtige kilder til fødevareproduktionen. Hovedparten af de nye proteiner forventes at kunne komme fra velkendte landbrugsafgrøder som græs, kløver og andre bælglplanter. Disse afgrøder er kendt for deres høje proteinindhold, og de kan produceres i Danmark og dermed mindske klimaafttrykket fx sammenlignet med import af sojaprotein.



Figur 1. Kløvermark.

Fremtidens protein kan også udvindes af bl.a. muslinger, insekter, tang og overskud fra fødevareproduktionen. Samlet kan nye proteinkilder erstatte nogle af de proteinkilder der typisk anvendes i dag, og fx medvirke til at mindske det klimaafttryk som stammer 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 proteinoprensningsteknikker også helt centrale. Det gælder fx ved fremstilling af medicin (fx insulin til diabetespatienter) eller ved produktion af enzymholdigt vaskepulver¹.

Formål

I denne øvelse er formålet at afprøve forskellige trin i oprensning af proteiner. Af pædagogiske årsager vælges at oprense på det røde muskelprotein myoglobin, da det på grund af sin farve er let at følge gennem de enkelte oprensningstrin. Proteinet findes bl.a. i oksekød.

Teori

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

- Proteiners struktur og funktion (med myoglobin som eksempel)
- Lysering af celler
- Søjlekromatografi (ionbytning)
- Fluorometri
- SDS-PAGE

¹ FN-verdensmål for bæredygtig udvikling der især bringes i spil i denne case



<https://www.verdensmaalene.dk/fakta/verdensmaalene>

Teorien er beskrevet i den tilhørende bog 'Hands on Biotech' side xx-xx eller på hjemmesiden www.xxxx.dk

Læreplanen

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

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

Øvelsen 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.

Flow

Øvelsen har følgende flow og tidsforbrug:

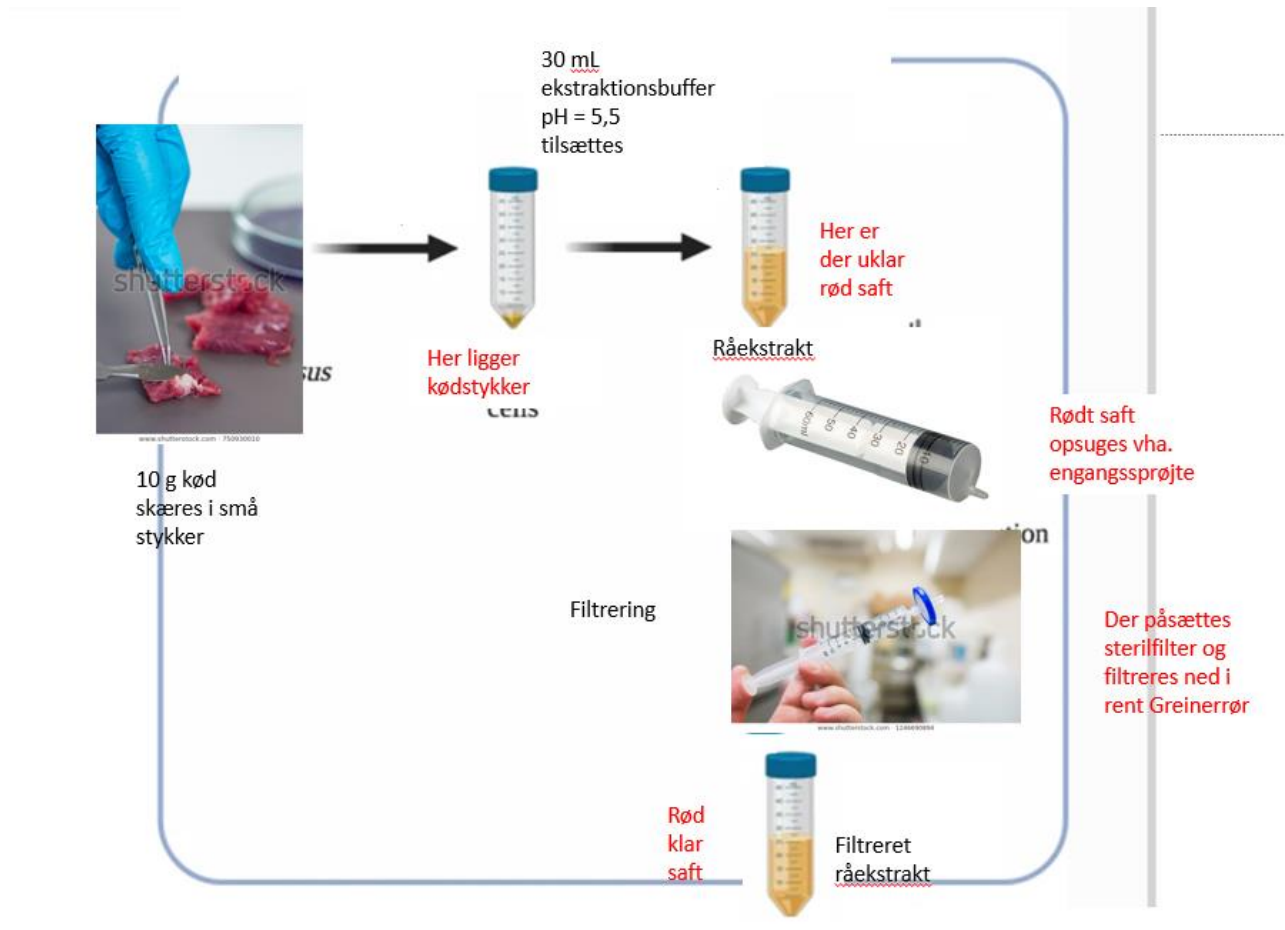
- DEL A – Ekstraktion af protein fra oksekød, 45 min
- DEL B - Oprensning af myoglobin vha. små søjler (pilotforsøg)
- DEL C - Oprensning af myoglobin vha. FPLC, 45 min
- DEL D - Analyse af resultater vha. fluorometri
- DEL E - Evt. Analyse af resultater vha. SDS-PAGE

Øvelsen er under udvikling

DEL A – Ekstraktion af protein fra oksekød

Formålet med del A er at få ekstraheret proteiner fra oksekød.

Arbejdsgangen er illustreret her og beskrives i det følgende (skitse – ikke den færdige figur):



Materialer:

Skært oksekød
Skalpel/køkkenkniv + skærebræt
Buffer A (20 mM ethansyre, 20 mM NaCl, pH 5,5)
Målebæger
Greinerrør, 50 mL
Engangssprøjte u. kanyler, 20 mL
Engangsfiltre, 0,4 µL
Mikropipetter + spidser, 20-100 µL
Eppendorfrør, 1,5 mL
Vægt

Fremgangsmåde:

1. Afvej 10 g oksekød, og findel kødet med en skalpel eller køkkenkniv.
2. Overfør kødet til et rent 50 mL Greinerrør.
3. Tilsæt 30 mL buffer A.

4. Sæt låg på røret, og vend det forsigtigt nogle gange.
5. Lad opløsningen stå i 5-15 minutter indtil der fremkommer en tydelig rødfarvning af væsken. Vend røret fra tid til anden.
6. Opsug ca. 20 mL af kød-buffer-opløsningen op i en engangssprøjte. Undgå at suge for meget kød med op.
7. Et 0,4 µL engangsfilter placeres på sprøjtes spids (skrues fast), og væsken presses igennem filteret og ned i et rent Greinerrør. Dette er proteinekstraktet.
8. Udtag med en mikropipette 20 µL af proteinekstraktet, og overfør dette til et eppendorfrør. Røret markeres med teksten 'råekstrakt'.

Greinerrør samt eppendorfrør med ekstrakt kan nu lægges på køl eller frost indtil anvendelse i DEL XX og DEL XX.

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

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

Materialer:

Noget fra del A

Fremgangsmåde:

DEL C – Oprensning af myoglobin vha. FPLC

Formålet med DEL C er at oprense myoglobin fra proteinekstraktet fremkommet i DEL A.

Materialer:

FPLC med tilhørende software (ÄKTastart + Unicorn)

Fraktionsopsamler (Frac 30)

Kationbyttersøjle (HiTrap SP FF)

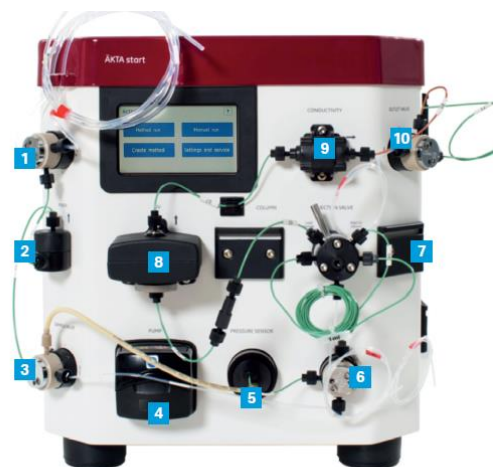
Engangssprøjte u. kanyle, 5 mL

Fremgangsmåde:

1. 5 mL af det filtrerede kød-protein-ekstrakt suges op i ren engangssprøjte.
2. Sprøjten tømmes for luft ved at vende spidsen opad og presse luften ud af sprøjten. Skyd en lille smule væske med ud, og hav en serviet klar til at tørre sprøjten.
3. Sprøjten med det filtrerede proteinekstrakt påsættes FPLC'en i injektionsventilens port nummer 3, og størstedelen af ekstraktet skydes langsomt ind i prøve-loopet.

4. Efterlad 1 mL tilbage i sprøjten. **N.B.** Da prøve-loopet har et volumen på 5 mL, og prøven er større end 5 mL, vil noget af protein-ekstraktet løbe hele vejen igennem loopet og ud i affaldsflasken. Dette er helt i orden, så længe loppet er fyldt med prøve.

5.



Part	Description	Part	Description
1	Buffer valve	6	Wash valve
2	Mixer	7	Injection valve
3	Sample valve	8	UV monitor
4	Pump	9	Conductivity monitor
5	Pressure sensor	10	Outlet valve

FPLC.

1. Analyse af resultater vha. fluorometri

2. Analyse af resultater vha. SDS-PAGE

Efterbehandling

Kilder:

Kløvermark: <https://www.colourbox.dk/billede/groen-hvidkloever-felt-billede-1754509>

Figur til ekstraktion: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00216-019-02254-7>