

HANDS ON BIOTECH

EKSPERIMENT 3

Nyttige produkter fra mikroalger

LONE ALS EGEBO
LARS HAASTRUP PEDERSEN

TEORI
ELEVVEJLEDNING
LÆRERVEJLEDNING

EKSPERIMENT 3

Nyttige produkter fra mikroalger

Hands on Biotech – Nyttige produkter fra mikroalger

© 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: 978-87-89383-93-4

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
Mikroalgen <i>Dunaliella tertiolecta</i>	8
Lysering	9
Gradientcentrifugering	10
Arbejdsspørgsmål	12
ELEVVEJLEDNING	13
Formål	13
Flow	13
DEL A – LYSERING AF CELLER	14
Materialer	14
Fremgangsmåde	14
DEL B – SEPARATION AF CELLEBESTANDDELE	14
Materialer	14
Fremgangsmåde	14
DEL C – FRAKTIONERING AF PROTEINBESTANDDELE	15
Materialer	15
Flowchart	15
Fremgangsmåde	16
SDS-PAGE på udvalgte fraktioner	17
Farvning af gel	19
LÆRERVEJLEDNING	21
Læreplanen	21
Teori	21
Flow	22
Kommentarer til eksperimentet	22

Forord

Dette hæfte **Nyttige produkter fra mikroalger** 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 **Nyttige produkter fra mikroalger**.

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 Hastrup 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 3

Nyttige produkter fra mikroalger

Havets mikroskopiske alger og cyanobakterier producerer mellem 50 og 85 % af atmosfærens indhold af O_2 ved fotosyntese. Med produktionen af dioxygen følger en tilsvarende stor produktion af mikroorganismer, der skaber grobund for havets fødekæder. Alger kan fx producere umættede fedtsyrer, protein, stivelse og pigmenter, som kan udnyttes til bæredygtig fremstilling af nye produkter til fødevarer og kosttilskud, se figur 1, til medicin og diagnostik eller olier til biobrændsel.

Da størstedelen af jordklodens overflade udgøres af hav, ligger der et stort og uudnyttet potentiale i bæredygtig marin produktion. Produktion af mikroalger og cyanobakterier kan blive et stort og væsentligt bidrag til den fremtidige bioteknologiske industri. Disse fotosyntetiserende organismer fikserer CO_2 og medvirker derved til at reducere atmosfærens indhold af denne klimagas.

For at analysere hvilke stoffer de eukaryote mikroalger indeholder og producerer, og i hvilke dele af cellen de findes, er det væsentligt at kunne adskille og undersøge cellernes organeller. Til dette formål findes forskellige separations- og analysemetoder.

Foto ikke tilgængelig.
Kan ses i den trykte udgave.

Figur 1. Tabletter, flager og pulver fra cyanobakterier anvendes som kosttilskud. Proteinindholdet i de tørrede produkter er omkring 60 %.

I eksperimentet 'Nyttige produkter fra mikroalger' er formålet at separere algecellers organeller ved gradientcentrifugering. Efterfølgende er formålet ved hjælp af metoden SDS-PAGE at undersøge indholdet af proteiner i fraktionen med de grønne chloroplaste, som er nemme at se.

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 'Nyttige produkter fra mikroalger'.

Foto ikke tilgængelig.
Kan ses i den trykte udgave.

Figur 3. Algen set i lysmikroskop.

Mikroalgen *Dunaliella tertiolecta*

I forsøget anvendes den marine mikroalge *Dunaliella tertiolecta*. Det er en ca. 10 µm lang encellet grønalge med to trådformede *flageller*, som den bevæger sig ved hjælp af, se figur 3.

Den tilhører en algeslægt, som er karakteristisk ved, at cellerne mangler en cellevæg. En celle uden cellevæg betegnes en *protoplast* og er nemmere at *lyser*. Ved lysering ødelægges cellernes membran enten mekanisk eller ved hjælp af enzymer eller opløsningsmidler.

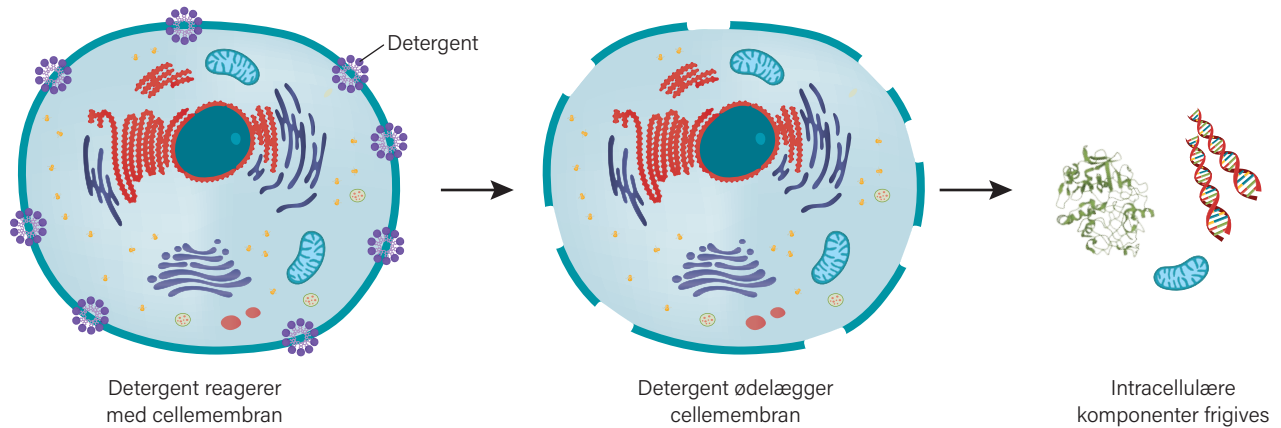
Dunaliella tertiolecta har tidligere været dyrket især på grund af dens indhold af carotenoider (gul-orange farvestoffer), der anvendes som naturligt farvestof. Den indeholder dog også store mængder af de energigivende næringsstoffer protein, carbohydrate og lipid, og fx vil proteinerne kunne udnyttes til flere formål, bl.a. som kosttilskud, se figur 4. Dens høje indhold af carbohydrate og lipider vil kunne udnyttes til produktion af hhv. bioethanol og biodiesel.

INDHOLD AF ENERGIGIVENDE STOFFER I PROCENT TØRVÆGT			
	Proteiner	Carbohydrater	Lipider
<i>D. tertiolecta</i>	38,5 ± 0,3	24,6 ± 2,6	11,6 ± 1,4
Brød	25-39	30-38	0,2-1
Kød	43-74	0-1	12-34
Mælk	22-26	35-38	28-29
Ris	7-8	77-80	0,6-2
Sojabønner	36-37	30	18-20

Figur 4. Indhold af energigivende stoffer i procent tørvægt hos *Dunaliella tertiolecta* sammenlignet med traditionelle fødeemner.

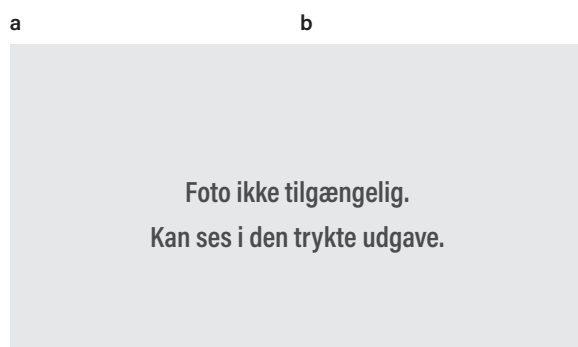
Lysering

Cellelysering dækker over en række metoder, hvor cellemembraner (og cellevægge) nedbrydes eller ødelægges for at frigive DNA, RNA, protein eller organeller fra en celle. Lysering af celler anvendes i laboratoriet i forbindelse med molekylær diagnostik og immunoassays, men også i industrielle processer såsom proteinoprensning. Valget af lyseringsmetode har betydning for oprensningen, men også for kvaliteten af slutprodukterne. Cellelysering ved hjælp af en detergent ødelægger cellemembranen, hvorved de intracellulære komponenter frigives, se figur 5.



Figur 5. Cellelysering vha. en detergent.

Osmotisk chok er en anden metode, som kan bruges til at lysere celler. Når koncentrationen af salt (eller andre osmotisk aktive stoffer) omkring en celle pludselig ændres, vil koncentrationsforskellen mellem indersiden og ydersiden af cellen forårsage, at der sker osmose. Hvis koncentrationen af osmotisk aktive stoffer er lavere i den omgivende opløsning, sker der en nettotransport af vand ind i cellen, hvorved den svulmer op og brister. Denne teknik er velegnet til lysering af celler fra pattedyr (mammale celler) på grund af cellemembranernes skrøbelige struktur, se figur 6.

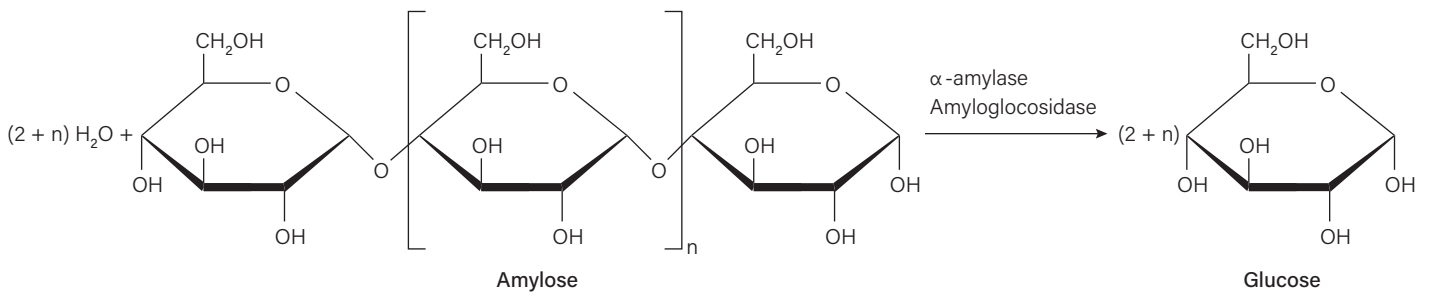


Figur 6.

- Normalt rødt blodlegeme fra et pattedyr.
- Rødt blodlegeme som har været udsat for osmotisk chok, hvorved cellen suger vand og springes.

Mange mikroorganismer inklusive visse mikroalger har foruden cellemembranen også en cellevæg, som beskytter cellen, og som kan være svær at nedbryde. Til dette kan udnyttes cellevægsnedbrydende enzymer fx lysozym, som kendes fra tårer eller forskellige cellulaser.

Mikroalgen *Dunaliella tertiolecta* har som nævnt ingen cellevæg. Til gengæld omgiver den sig af et beskyttende lag af polysaccharider, som er vandsugende og derved beskytter mod udtørring. Dette lag består hovedsagligt af amylose (lineært stivelse) som ved



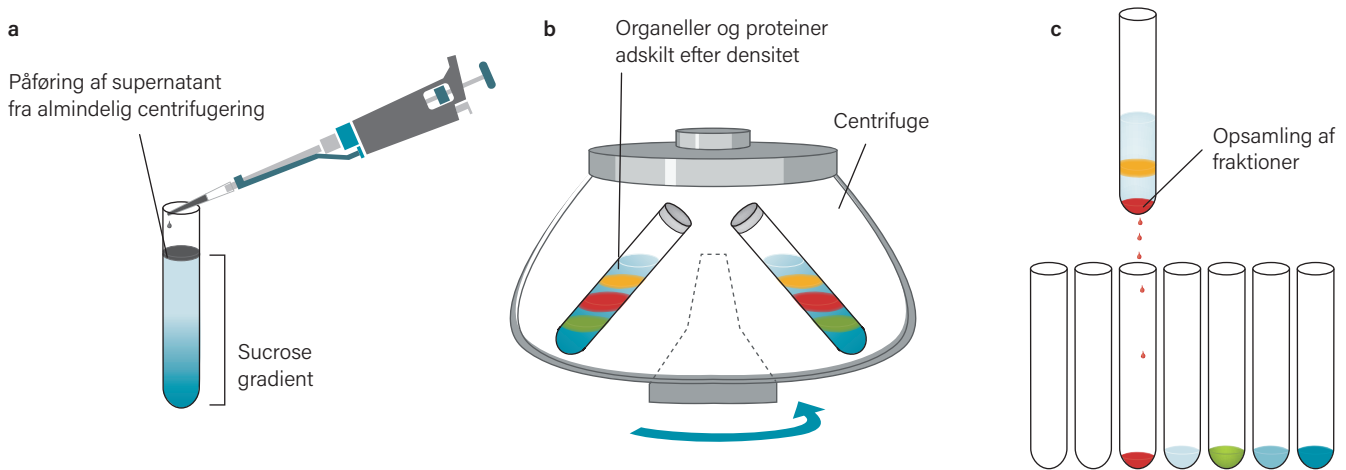
Figur 7. Polysaccharidet amylose kan nedbrydes til monosaccharider (glucose) ved hjælp af de hydrolytiske enzymer α -amylase og amyloglucosidase.

enzymatisk hydrolyse med enzymerne α -amylase og amyloglucosidase kan nedbrydes til glucose, se figur 7.

Enzympræparatet Celluclast fra Novozymes, der består af cellulosenedbrydende enzymer, har også en positiv indvirkning på lysning af *D. tertiolecta*, hvilket indikerer, at der også er cellulose til stede, selvom der ingen cellevæg forekommer hos mikroalgen.

Gradientcentrifugering

Algecellernes komponenter kan efter lysning adskilles ved *gradientcentrifugering*. Det er en metode som ved centrifugering med høj hastighed adskiller organeller og proteiner efter forskelle i densitet. Komponenterne kan efterfølgende opsamles i fraktioner. En gradientcentrifugering kan fx udføres i en koncentrationsgradient af carbohydratet sucrose, hvor gradienten ændres gradvist fra fx 5 til 20 % ned gennem et centrifugeglas. Figur 8 viser princippet i en gradientcentrifugering.



Figur 8.

- Påsætning af prøve i toppen af en sucrosegradient.
- Centrifugering.
- Opsamling af fraktioner.

Ulempen ved at anvende koncentrationsgradienter med sucrose til centrifugering er, at sucrose er et osmotisk aktivt stof, og det kan fx påvirke stabiliteten af de organeller, der skal adskilles.

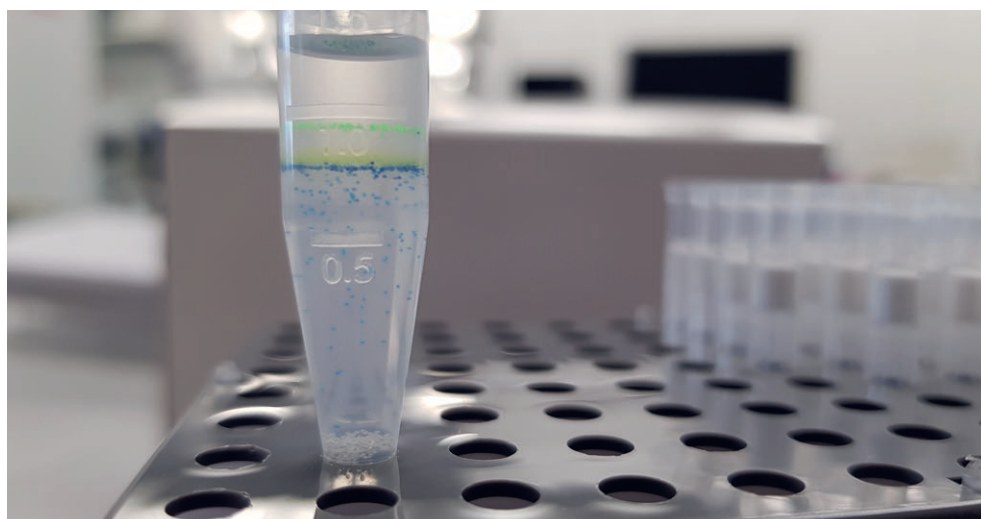
I eksperimentet 'Nyttige produkter fra mikroalger' anvendes i stedet en gradient af et medium, der kaldes *Percoll*. Dette medium er sammensat af siliciumpartikler af forskellig densitet. Partiklerne er beklædt med et monolag af stoffet polyvinylpyrrolidon (PVP). De PVP-coatede siliciumpartikler er osmotisk inaktive, og ved at opslæmme dem i en saltopløsning, der er isotonisk med en fysiologisk saltopløsning, opnås et medium, der kan adskille algecellernes organeller og proteiner efter størrelse. Ved at anvende en Percollgradient undgås de osmotiske effekter, der skabes ved en sucrosegradient.

Til at markere forskellige densiteter i Percollgradienten anvendes såkaldte densitetsmarkører. Det er små kugler med forskellige farve, se figur 9a, hvor hver farve repræsenterer en bestemt densitet. Densiteten er angivet nederst på figuren. Kuglerne er specielt fremstillet til at bruges sammen med Percollgradienter. I figur 9b er grønne, mørkeblå og lyseblå kugler vist i en Percollgradient.



Figur 9a. Densitetsmarkører (Density marker beads) og deres densitet i enheden g/mL.

ρ (g/mL) 1,02 1,04 1,08 1,09 1,13

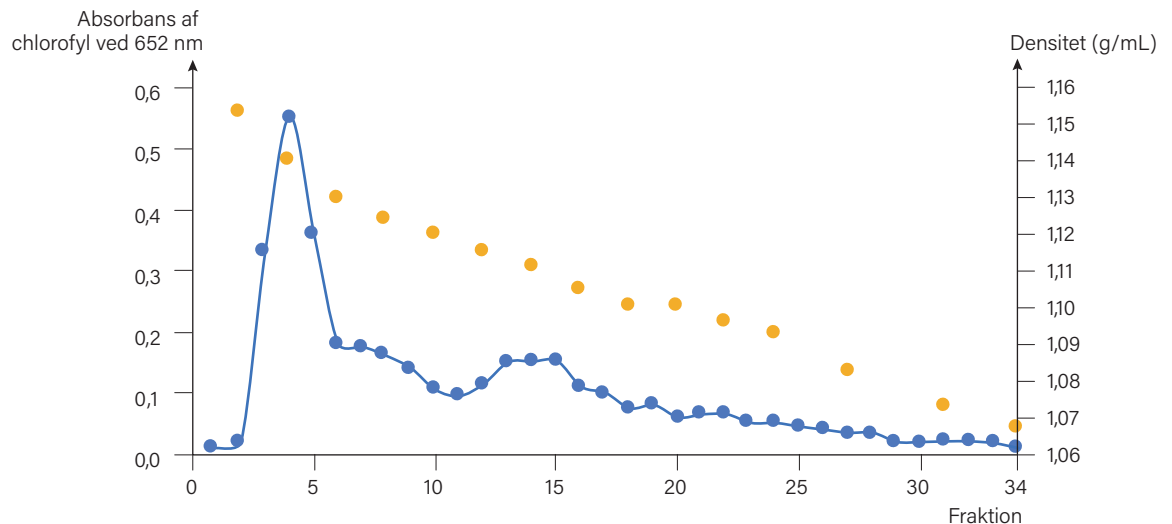


Figur 9b. Percollgradient med grønne, mørkeblå og lyseblå densitetsmarkører.

Arbejdsspørgsmål

1. Hvorfor er det fra et bæredygtighedssynspunkt ønskeligt at kunne fremstille nyttige produkter fra mikroalger og cyanobakterier?
2. Hvilke produkter kan der fx fremstilles ud fra disse organismer?
3. Beskriv opbygningen af hhv. en prokaryot og en eukaryot celle.
4. Hvad kendetegner mikroalgen *Dunaliella tertiolecta*'s opbygning og struktur? Inddrag figur 3.
5. Analysér figur 4, og vurder mikroalgen *D. tertiolecta*'s indhold af energigivende stoffer sammenlignet med andre energigivende råvarer.
6. Forklar ved hjælp af figur 5, hvordan lysering vha. af en detergent foregår.
7. Hvordan beskytter *D. tertiolecta* sig mod udtørring?
8. Hvordan kan *D. tertiolecta* lyses? Inddrag figur 7.
9. Forklar ved hjælp af figur 8 princippet i en gradientcentrifugering.
10. Hvad er Percoll for et medium/materiale?
11. Hvilke fordele er der ved en Percollgradient sammenlignet med en sucrosegradient?
12. Hvordan visualiseres forskellige densiteter i en Percollgradient? Inddrag figur 9.

I et eksperiment blev densiteten af organeller fra *D. tertiolecta* undersøgt ved hjælp af gradientcentrifugering i en Percollgradient. Efter centrifugering blev der opsamlet 34 fraktioner, og i ca. hver anden fraktion blev densiteten målt. Derefter blev indholdet i hver fraktion ekstraheret i ethanol. Absorbansen af de filtrerede ekstrakter blev derefter målt ved hjælp af spektrofotometri ved en bølgelængde på 652 nm. Ved denne bølgelængde absorberer bl.a. det grønne farvestof chlorofyl. Resultaterne er vist i figur 10.



Figur 10. Densitet (orange) og absorbans ved 652 nm (blå) som funktion af fraktionsnummer.

13. Analysér graferne vist i figur 10, og vurder herunder om algen indeholder chloroplaste og i givet fald, hvilken densitet disse chloroplaste har.
14. Diskuter hvilke fejlkilder, der kan være i eksperimentet, som har betydning for at opnå pålidelige resultater.
15. Giv forslag til supplerende undersøgelser af fraktionerne.

EKSPERIMENT 3

Nyttige produkter fra mikroalger

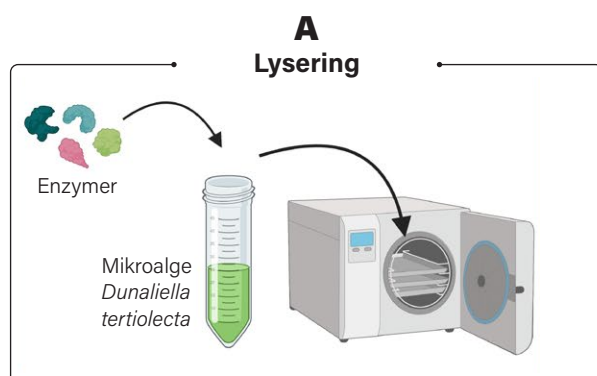
Formål

Formålet med denne øvelse er at separere organeller fra celler af mikroalgen *Dunaliella tertiolecta* ved gradientcentrifugering. Efter separationen af algecellernes organeller undersøges proteinindholdet i fraktioner med grønne chloroplaster.

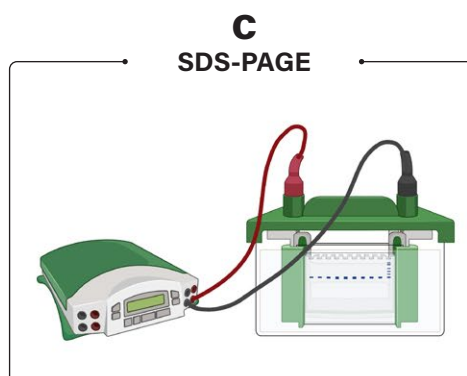
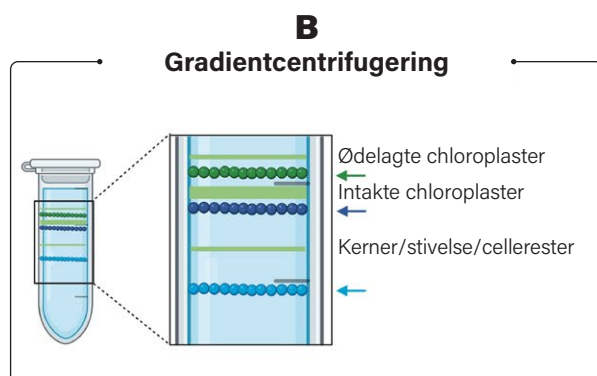
Flow

Øvelsen har følgende flow og tidsforbrug (se figur 11):

- Del A: Lysering af celler – (30 min forberedelse + 60 min inkubering)
- Del B: Gradientcentrifugering – (45 min forberedelse + 30 min centrifugering)
- Del C: SDS-PAGE – (100 min forberedelse + 30 min elektroforese + 40 min farvning/affarvning)



Figur 11. Oversigt over flow i eksperimentet.

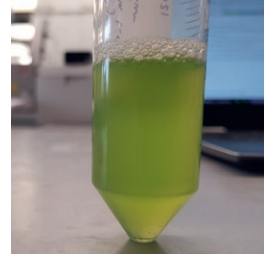


DEL A - Lysering af celler

Formålet med DEL A er at lysere algecellerne vha. enzymer for at frigive algens organeller til væskefasen.

Materialer

- Pipetter + spidser (20-200 μ L)
- Eppendorfrør 1 stk.
- Greinerrør med mikroalger (*Dunaliella tertiolecta*) i 2 mL TRIS buffer (25 mM, pH 6), se figur 12
- Celluclast (enzym)
- α -amylase (enzym)
- Varmeskab



Figur 12. Greinerrør med *Dunaliella tertiolecta* opløst i 2 mL TRIS buffer.

Fremgangsmåde

1. Der er forberedt et greinerrør med alger, der er opløst i 2 mL TRIS buffer (25 mM – pH 6)
OBS: Hvis der senere ønskes at analysere proteiner med SDS-PAGE, skal der nu udtages 50 μ L til et Eppendorfrør, som gemmes til DEL C. Dette Eppendorfrør kaldes 'Rå DEL A + gruppenavn'. Husk at blande/vortexe algerne inden de 50 μ L udtages for at sikre en homogen prøve.
2. Tilsæt 200 μ L Celluclast til algerne.
3. Tilsæt 200 μ L α -amylase til algerne.
4. Sæt prøven i varmeskab ved 50 °C natten over. (Skal anvendes i DEL B).

DEL B - Separation af cellebestanddele

Formålet med DEL B er at separere algens cellebestanddele ved hjælp af gradient-centrifugering.

Materialer

- Pipetter + spidser (1-10 μ L, 20-200 μ L, 100-1000 μ L)
- Eppendorfrør (2 mL)
- Centrifuge til Eppendorfrør
- Percoll gradientmedium
- Density marker beads – lyseblå (1,13 g/mL), mørkeblå (1,08 g/mL) og grøn (1,02 g/mL).
- Kamera (fx fra mobiltelefon)

Fremgangsmåde

1. Tilsæt 1 mL forberedt Percollgradientmedium til et 2 mL Eppendorfrør. Dette Eppendorfrør kaldes 'Gradient + gruppenavn'.
2. Tilsæt 5 μ L af hver af de tre farver Density marker beads med 10 μ L pipettespids. Disse beads kan være en smule besværlige at pipettere. Sørg for at der kommer

beads med i pipetten, ved at suge væsken i Eppendorfrøret, lige ovenover hvor beads er bundfældet. Omkring 10-20 beads er rigeligt. Bemærk: *Beads må ikke smides ud og ønskes returneret til AAU.*

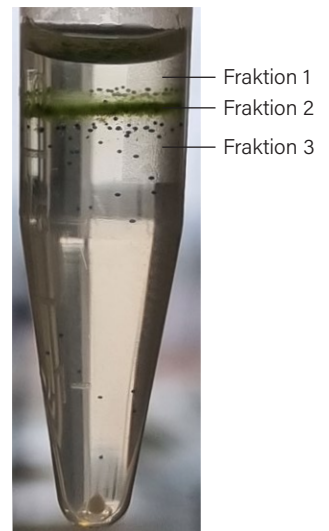
- Den lyserede prøve rystes forsigtigt, således at prøven igen er homogen.
- Hvis der skal laves SDS-PAGE overføres 50 μ L prøve til et Eppendorfrør og gemmes til DEL C. Dette Eppendorfrør kaldes 'Rå DEL B + gruppenavn'.
- Overfør forsigtigt 200 μ L lyseret prøve til toppen af hvert Eppendorfrør med Percoll og beads.
- Placer Eppendorfrør i centrifugen (husk modvægt, hvis der er et ulige antal prøver).
- Centrifuger ved 20.000 rcf (max speed) i 30 minutter.
- Udtag forsigtigt rørene fra centrifugen.
- Tag et billede af resultatet af separationen. Prøven skulle gerne ligne figur 13.
- Skal fraktioner undersøges med SDS, skal Eppendorfrør gemmes til DEL C.
- OBS: Hvis ikke SDS-PAGE (DEL C) udføres med det samme, laves også separering af fraktionerne (punkt 1-3 i DEL C), og de opdelte fraktioner opbevares på køl indtil næste gang.**

DEL C - Fraktionering af proteinbestanddele

Formålet med DEL C er at fraktionere proteinbestanddelene fra organellerne med SDS-elektroforese (SDS-PAGE).

Materialer

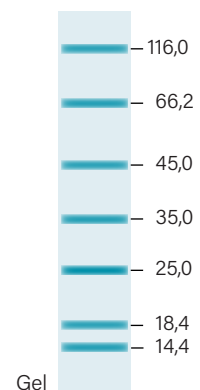
- Algeprøve fra DEL A samt lyseret algeprøve fra DEL B
- Pipetter + spidser (1-10 μ L, 2-20 μ L, 20-200 μ L)
- Eppendorfrør (2 mL)
- Gel elektroforesesystem (Bio-Rad Mini-protean lodret elektroforesekar, se figur 14)
- Strømforsyning
- Bordcentrifuge
- Farvebakke
- Mikrobølgeovn
- Vippebord
- Grønt adskillelsesværktøj til gel
- Papirservietter
- Evt. plastiklomme og skanner
- SDS-gel
- Varmeblok til Eppendorfrør
- Prøvebuffer (loading dye, glycerol, SDS, 5 % DTT)
- Løbebuffer
- Proteinvægtmarkør (Thermo Fisher #26610, se figur 15)
- Farvningsbuffer (Coomassie Brilliant Blue, farver proteiner)
- Affarvningsbuffer (Ethanol, eddikesyre og vand)



Figur 13. Percollgradient med grønne, mørkeblå og lyseblå densitetsmarkører, samt algebestanddele mellem de mørkeblå og grønne beads.

Foto ikke tilgængelig.
Kan ses i den trykte udgave.

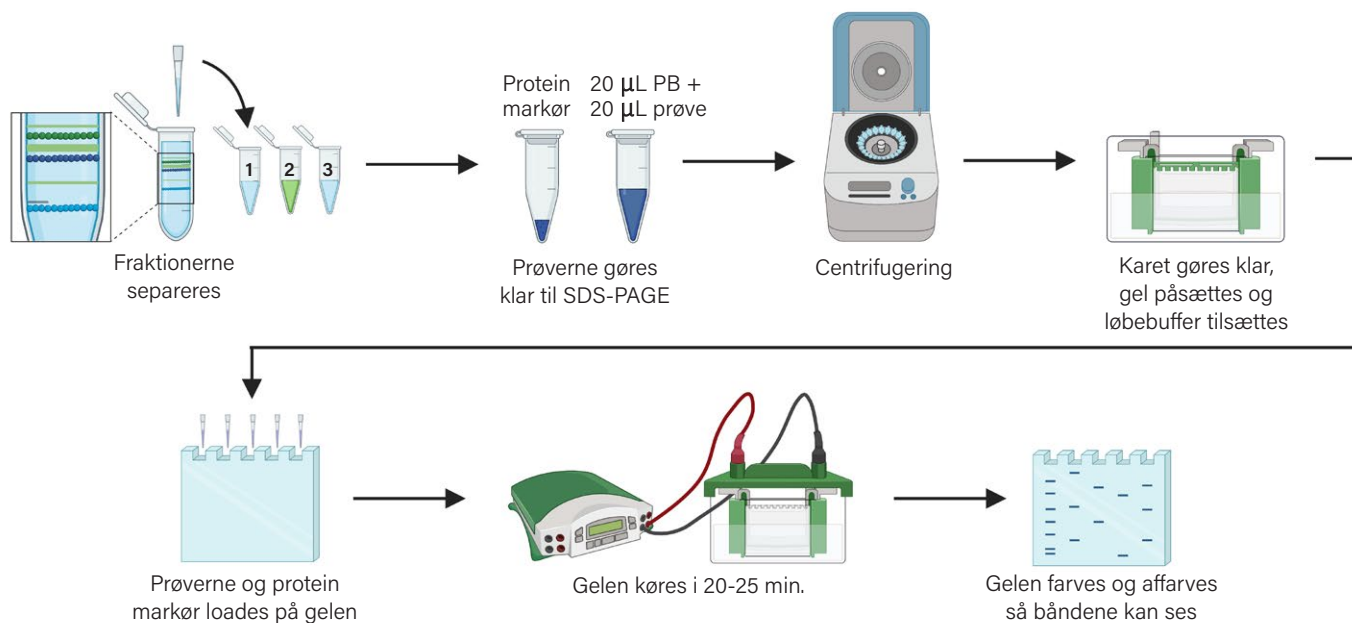
Figur 14. SDS-elektroforesekar.



Figur 15. Proteinvægtmarkør.

Flowchart

- Øvelsen har følgende flow, se figur 16:

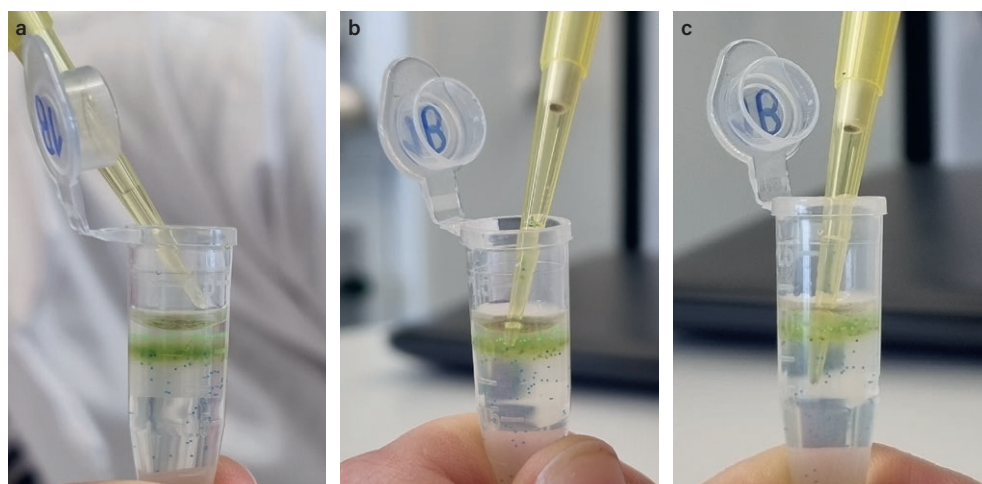


Figur 16. Fremgangsmåde til udførelse af SDS-PAGE.

Fremgangsmåde

Separering af fraktioner

- Find Eppendorfrøret der skal fraktioneres (den fra DEL B).
- Klargør Eppendorfrør hvori fraktionerne fra gradientcentrifugeringen skal overføres.
 - Et til den øverste fraktion (fraktion 1, figur 17a). Kald denne 'Fraktion 1, samt gruppenavn'.
 - Et til den midterste fraktion, hvor algebestanddelene samles (fraktion 2, figur 17b). Kald denne 'Fraktion 2, samt gruppenavn'.
 - Et, til den nederste klare fraktion (fraktion 3, figur 17c). Kald denne 'Fraktion 3, samt gruppenavn'.



Figur 17. Fraktionering efter gradientcentrifugering. Fraktionerne pipetteres i den viste rækkefølge.

3. For at fraktionere prøven, skal der forsigtigt pipetteres fra de tre fraktioner, ved brug af 20 µL pipette. Det er kun nødvendigt at pipettere 60-100 µL, altså 3-5 pipetteringer med pipetten.

Start med den øverste fraktion, således der pipetteres i rækkefølgen vist på figur 17. Her er det vigtigt at tage sig god tid til at placere pipettespidsen rigtigt og forsigtigt suge væsken fra de enkelte fraktioner. Der anvendes ny pipettespids til hver fraktion.

OBS: Den midterste fraktion med de grønne chloroplaster kan være en smule klistret og derfor svær at suge op med pipetten.

SDS-PAGE på udvalgte fraktioner

1. Klargør 5 nye Eppendorfrør (prøverør):

- Råekstraktet før enzymerne er tilsat (udtaget i starten af DEL A)
- Råekstrakt efter enzymerne er tilsat (udtaget i DEL B)
- Øvre fraktion
- Midterste fraktion
- Nedre fraktion

Husk at markere rørene (f.eks. 'Rå DEL A, samt gruppenavn', 'Rå DEL B, samt gruppenavn', 'Fraktion 1, samt gruppenavn' osv.)

2. Tilsæt 20 µL prøvebuffer (PB) til hvert af de nye prøverør.

OBS: Da prøvebufferen overføres til nye tomme prøverør, kan den samme pipettespids bruges.

3. Fordel 20 µL af hver fraktion samt råekstrakterne i de tilhørende prøverør.

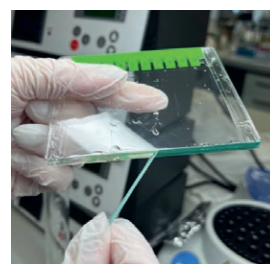
OBS: Bland prøverne med pipetten, inden de overføres til de nye Eppendorfrør med PB.

Husk at bruge en ny pipettespids til hver prøve, således at prøverne ikke blandes med hinanden.

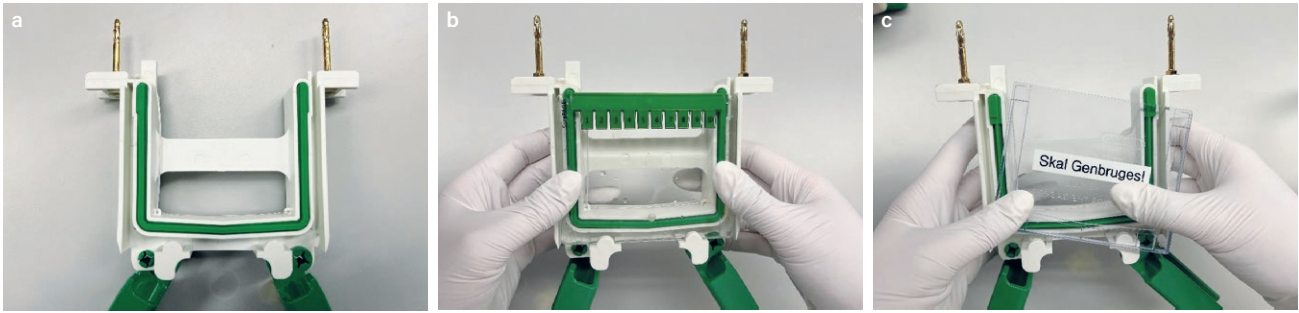
4. Prøverne centrifugeres kort i en bordcentrifuge på max speed (fx 14.500 rpm i 20 sekunder).

Påsætning af gel

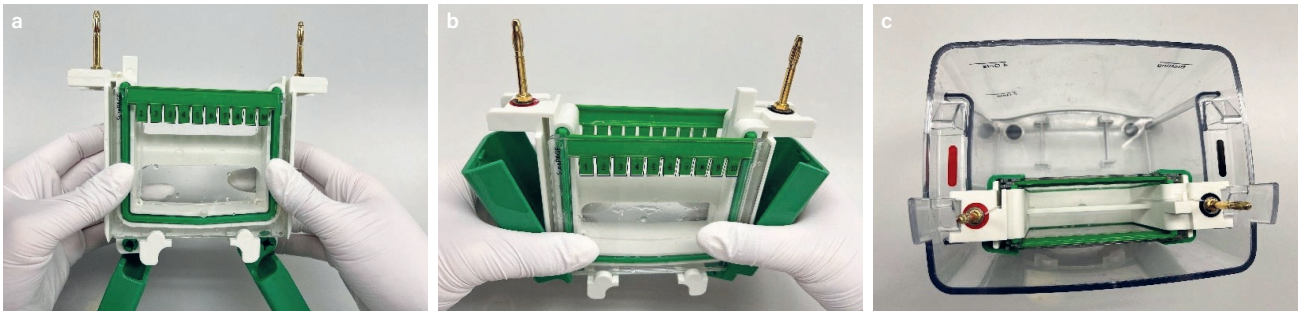
5. Tag et par handsker på, og pak gelen ud.
6. **VIGTIGT! Fjern det grønne stykke tape i bunden, se figur 18.**
7. Tjek at den grønne gummiring ved modulet vender rigtigt. Hvis det er gelen, som skal påsættes modulet, skal indhakkene i gummiringen vende indad. Anvendes der en plastikbufferdam, skal indhakkene ved den grønne gummiring vende udad. Det er vigtigt at indhakkene i plastikbufferdammen og indhakkene ved gummiringen presses tæt sammen, se figur 19 side 18.
8. Gelen isættes gelelektroforesekarret, som vist på figur 20 side 18. Den korte side af gelen vender ind mod midten af indsatsen, og det sikres at gelerne sidder stramt mod bunden, mens siderne klikkes op. (Følg evt. linket <http://www.youtube.com/watch?v=IAfUEe4Db2U&feature=related> hvor det demonstreres hvordan karret sættes rigtigt i. Dette kar er muligvis ikke helt identisk med det, som I får udleveret). Det er nødvendigt at have to geler i indsatsen, så de tilsammen danner et rum, der kan fyldes med buffer.
9. Rummet imellem gelerne fyldes først helt op med løbebuffer. Tjek om der siver løbebuffer ud af beholderen, før der fyldes løbebuffer i resten af karret. Holder rummet imellem gelerne ikke tæt, skal hele indsatsen skilles ad, sættes ordentlig sammen og karret tørres af, inden man forsøger igen, se figur 21 side 18.



Figur 18. Fjernelse af det grønne stykke tape fra bunden af gelen. Dette er vigtigt at huske for at sikre det elektriske felt gennem gelen.

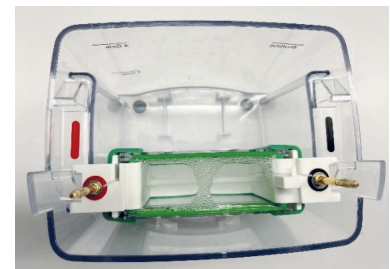


Figur 19. a. Siden med indhakked ved gummiringen vender indad. b. Gelen påsættes ved gummiringen med siden uden indhakked. c. Plastikbufferdammen placeres ved gummiringen med indhakked.



Figur 20. a. Indsæt gelerne ved at placere den korte side af gelen mod midten af beholderen. b. Når gelerne er på plads, skubbes de grønne klemmer på plads. c. Gelbeholderen placeres i karret, ved at beholderen med elektroderne står udenfor plastikforhøjningerne på karret.

10. Den grønne plastikkam i toppen af gelen (figur 20) fjernes ved at placere begge tommelfingre på kammen, for derefter at skubbe den forsigtigt væk fra gelen.
11. 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 pipettering. Husk at notere rækkefølgen af de enkelte prøver. Anvend nedenstående skema (Tabel 1) til at holde styr på rækkefølgen.



Figur 21. Rummet mellem gelerne er fyldt med løbebuffer.

Tabel 1			
Brønd	Prøve	Mix	Load
1	Markør	Er blandet	7 μL
2	Rå DEL A	20 μL prøve + 20 μL PB	25 μL
3	Rå DEL B	20 μL prøve + 20 μL PB	25 μL
4	Fraktion 1	20 μL prøve + 20 μL PB	25 μL
5	Fraktion 2	20 μL prøve + 20 μL PB	25 μL
6	Fraktion 3	20 μL prøve + 20 μL PB	25 μL

12. Når prøverne er load'et 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.

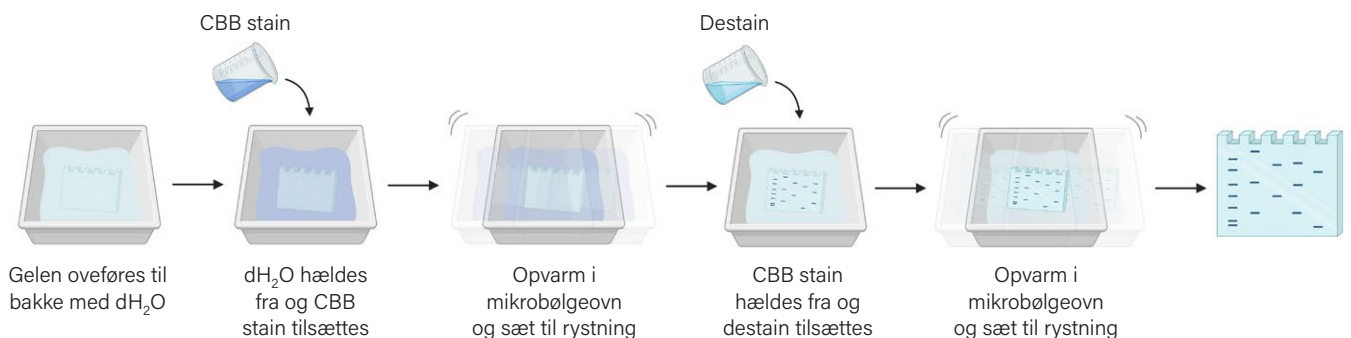
13. Låget sættes på karret, og strømstikkene isættes strømforsyningen (rødt stik til rød indgang – sort stik til sort indgang).
14. Strømforsyningen tændes, hvorved der sættes en strøm over gelen med konstant spændingsforskel på 70 V i 5 minutter og herefter 200 V i ca. 22 minutter. (Når strømmen er startet, skal det gerne begynde at boble med ilt inde i karret, og hvis det ikke er tilfældet, sidder gelen enten ikke rigtigt, eller også er der for lidt buffer i karret).
15. Fortsæt elektroforesen indtil den blå linje har arbejdet sig ned til bunden af gelen.
16. Når den blå linje er i bunden af gelen (efter ca. 20-23 minutter), slukkes for strømmen, elektroforesecellen skilles ad, og gelen udtages.
17. Gelen sidder imellem to plastikplader. Disse skilles ad som vist på figur 22. 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 22. Gelen har fire hæftninger – en i hvert hjørne. Værktøjet indsættes mellem de to plastikplader ved hver hæftning og vrikkes op og ned, indtil det siger klik. Sørg for den er ordentligt skilt ved alle fire hæftninger, før gelen overføres til farvning.

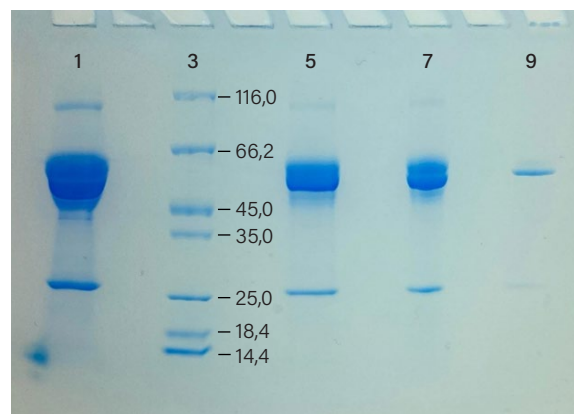
Farvning af gel

1. Gelen overføres til en bakke, hvori der tilsættes farvningsbuffer (Coomassie Brilliant Blue, CBB) indtil gelen er dækket. Låget sættes på bakken (må gerne stå lidt åbent i et af hjørnerne). Processen er vist i figur 23.
OBS: Gelen knækker nemt og kan være lidt besværlig at overføre, man kan derfor med fordel forsøge at glide gelen ned i farvebakken.
2. Blandingen varmes i mikrobølgeovn i 20 sekunder, og derefter køles gelen af i 10 minutter ved stuetemperatur (gerne på et vippebord).



Figur 23. Farvning og affarvning af gelen til visualisering af proteinbånd.

3. CBB hældes fra gelen (hældes tilbage i flasken og genbruges), og affarvningsbuffer tilsættes så det dækker gelen.
4. Blandingen opvarmes igen i 20 sekunder i mikrobølgeovnen.
5. Et par foldede papirservietter lægges ned i bakken til gelen for at suge farven (der skal stadig være væske i bakken).
6. Lad gelen affarve i 10 min, hvorefter papirservietterne skiftes. Allerede her burde det være muligt at se nogle blå proteinbånd på gelen (disse bånd ses lettere ved at løfte bakken op fra bordet).
7. Lad gelen affarve fuldstændigt (skift papir ca. hvert tiende minut og tilsæt evt. mere buffer), og derefter kan proteinoprensningen visualiseres. Et eksempel på en gel med algebestanddele er vist på figur 24.



Figur 24. SDS-PAGE gel af algeproteinfraktioner efter stain og destain. 1. Råekstrakt (DEL B), 3. Markør, 5. Øverste fraktion, 7. Midterste fraktion, og 9. Nedre fraktion. Molekylvægten, angivet i kDa, er vist til højre for markøren.

8. Gelen kan med fordel fotograføres og/eller overføres til en plastiklomme.

EKSPERIMENT 3

Nyttige produkter fra mikroalger

Læreplanen

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

- Eukaryote celletyper
- Fotosyntesens overordnede delprocesser
- Separationsteknikker, herunder elektroforese og centrifugering

Øvelsen kan indgå i temaer der perspektiverer kernestoffet indenfor bæredygtig produktion af fødevarer, energi og kemiske stoffer; bioteknologisk anvendelse af mikroorganismer samt ny forskning og nye bioteknologiske metoder.

Teori

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

- Alge- eller plantecellers opbygning og funktion
- SDS-PAGE
- Centrifugering
- 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:

- Mikroalgers indhold af protein
- Lysering af celler
- Gradientcentrifugering

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

Flow

Eksperimentet har følgende flow og tidsforbrug:

- DEL A – Lysering af celler (2 timer)
- DEL B – Gradientcentrifugering (1 time)
- DEL C – SDS-PAGE (2 timer)

Kommentarer til eksperimentet

DEL A – Lysering af celler (30 min forberedelse + 60 min inkubering)

- Gymnasiet forventes selv at have varmeskab.
- Prøverne lyseres i varmeskab ved 50 °C i mindst en time og maksimalt natten over. Prøven kan herefter klare sig ved stuetemperatur i ca. 1 døgn og ellers må den sættes på køl, hvor holdbarheden er ukendt.
- Der er ventetid, så forbered spørgsmål (fx arbejdsspørgsmål fra teoriafsnittet) eller andet, som eleverne også kan arbejde med.

DEL B – Gradientcentrifugering (45 min forberedelse + 60 min inkubering)

- Rør med proteinfraktioner kan gemmes på køl et par døgn ellers på frys.
- Bemærk: Beads må ikke smides ud og ønskes returneret til AAU.
- Der er ventetid, så forbered spørgsmål (fx arbejdsspørgsmål fra teoriafsnittet) eller andet, som eleverne også kan arbejde med.

DEL C – SDS-PAGE (100 min forberedelse + 30 min elektroforese + 40 min farvning / affarvning)

- Gymnasiet forventes selv at have varmeblok/varmebad, mikrobølgeovn, vippebord og evt. plastlommer til opbevaring af gel.

HANDS ON BIOTECH

EKSPERIMENT 3

Nyttige produkter fra mikroalger

Dette hæfte (Nyttige produkter fra mikroalger) 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