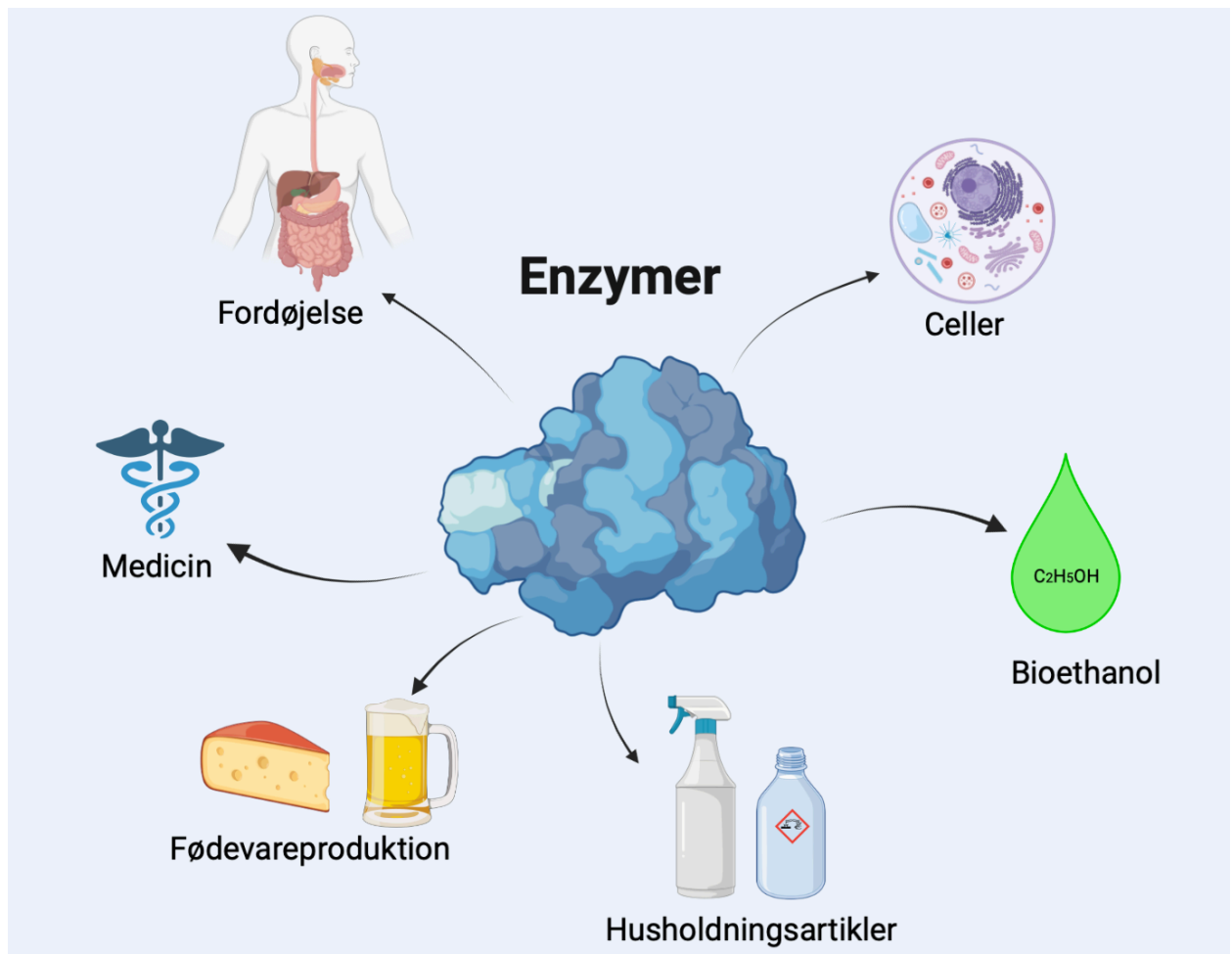


TEORIMATERIALE

Biotech Academy Camp 2022



Anita Skovbjerg Hjort-Gregersen & Mads Emil Mikkelsen

DTU | Den 15. – 22. oktober 2022

Biotech Academy Camp 2022

Velkommen til Biotech Academy Camp 2022. Dette teorikompendium vil hjælpe dig med at forstå den teori, der ligger bag laboratoriearbejdet, som vi kommer til at lave i løbet af ugen.

I år vil Biotech Academy Camp sætte fokus på enzymer. Dette kompendie skal introducere den nødvendige baggrundsviden, samt give overblik over de bioteknologiske redskaber, som vi kommer til at bruge. Forskellige steder i dette kompendie vil der blive henvist til Biostrubens videoer. Biostruben er en del af Biotech Academys hjemmeside, og her finder du en masse gode videoer bl.a. om de emner, der bliver gennemgået i dette kompendie. Vi anbefaler, at du ser disse videoer som en del af forberedelsen.

God læselyst! Vi glæder os til at se dig.

Bedste hilsner fra Mads og Anita

Biotech Academy Camp er i år støttet af:



Indholdsfortegnelse

Enzymer – Struktur og funktion	3
<i>Laktase</i>	3
Mutationer	4
Bakterier	5
<i>Bakterievækst</i>	5
Vækstmedie	7
<i>Selektion af bakterier</i>	7
Det genetiske udtryk	8
<i>DNA</i>	8
<i>RNA</i>	9
<i>Proteiner</i>	9
Det Centrale Dogme	10
<i>Replikation i bakterier</i>	10
<i>Transskription: Fra DNA til RNA</i>	12
Initiering.....	13
Elongering.....	13
Terminering.....	13
<i>Translation: Fra mRNA til polypeptid</i>	14
Initiering.....	16
Elongering.....	16
Terminering.....	16
Metoder i laboratoriet	16
<i>DNA-ekstraktion</i>	16
<i>Kloning</i>	17
<i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	17
Valg af primere - kopiernes start og stop.....	18
Faserne i en PCR-cyklus.....	18
<i>Gelelektroforese</i>	20
Opsæt en gel.....	20
Michaelis Menten Kinetik	22

Enzymer – Struktur og funktion

Ordet ”enzym” betyder ”i gær”, da gær hedder zymos på latin. Enzymer blev nemlig første gang opdaget, som værende en bestanddel af gærceller. Men i dag ved man at der findes der enzymer i alle levende celler.

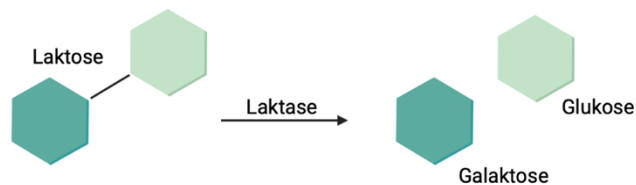
Enzymer er biologiske katalysatorer for biokemiske processer i levende organismer. De kan både virke intracellulært; inden i for cellen, og ekstracellulært; uden for cellen. Enzymer er essentielle for alt liv på Jorden: De katalyserer reaktioner i cellers metabolisme, der ellers ville være enormt langsomme – op til flere millioner af år – hvis de skulle forløbe uden enzymeres tilstedeværelse. En katalysator øger reaktionshastigheden for en kemisk reaktion uden selv at blive omdannet og uden at ændre den kemiske ligevægt. Enzymer fungerer som katalysatorer ved at danne et fysisk og kemisk miljø, der fremmer reaktionen. Dette gør enzymerne ved at binde til deres substrat og reagere med deres reaktive funktionelle grupper. Når et substrat bindes, vil der ske en ændring i de intramolekulære bindinger i enzymet. Disse ændringer i strukturen fremmer, at produktet af reaktionen kan dannes. Selvom nogle ændringer forårsager større ændringer i hele enzymet, foregår de fleste i eller omkring det aktive site. Enzymer sænker derved aktiveringsenergien og øger reaktionshastigheden for biokemiske reaktioner.

De to vigtigste pointer om enzymeres struktur og funktion er:

1. Enzymer binder til deres substrat med høj affinitet og specificitet.
2. Når substratet binder til det aktive site, forårsager det strukturelle ændringer i enzymet.

Laktase

I løbet af ugen vil vi have fokus på enzymet laktase. Det findes naturligt i spædbørns mavesæk, da de skal kunne nedbryde laktose fra modermælken. Laktose er opbygget af to monosakkarider, glukose og galaktose. Laktase kan nedbryde den glykosidbinding, der holder glukose og galaktose sammen. Ved reaktionen fås altså to frie monosakkarider, som kan optages i tyndtarmen (Figur 1).



Figur 1: Laktase nedbryder laktose til galaktosidase og glukose

Tidligere havde voksne ikke adgang til mælk, hvilket betød, at laktaseenzymet blev overflødigt, når barnet ikke længere fik brystmælk. Derfor stoppede den naturlige produktionen af laktase umiddelbart herefter. Dog har nogle voksne særligt i Nordeuropa formået at bibeholde evnen til at

nedbryde laktose, mens andre stadig ikke kan nedbryde disakkaridet. Den manglende nedbrydningsevne kaldes laktoseintolerans. Laktoseintolerance er således et ret normalt fænomen – faktisk det mest naturlige for voksne. Når laktoseintolerante personer indtager mælk, bliver laktosen ikke blive nedbrudt af laktase. I stedet nedbrydes laktose af tarmbakterierne, som danner gasser, hvilket kan give rumlen og ubehag i maven.

Laktase bruges i dag i mange forskellige sammenhænge f.eks. i forskernes laboratorier som **reporter gen**. Et reporter gen bruges når man vil introducere et nyt gen til en organisme f.eks. generne, der koder for insulin til brug i en insulinproduktion. I dette tilfælde kunne generne, der koder for laktase indføres sammen med de ønskede insulingener. Man kan efterfølgende vide om insulingenet er overført korrekt, ved at undersøge om organismen kan nedbryde laktose. Desuden fremstilles laktase i store mængder som kosttilskud for at imødekomme laktoseintolerante personer, der gerne vil indtage laktose. Denne produktion gøres typisk ved brug af bakterier.

Mutationer

Men hvorfor har nogle voksne mennesker bibeholdt evnen til at nedbryde laktose? Svaret ligger i begrebet **mutation**. Grundlæggende kan begrebet beskrives, som de fejl der af og til sker, når arvemateriale kopieres ved celledeling. Fejlene gør, at gensekvensen ændres. Nogle gange er ændringerne en ulempe for organismen, mens de andre gange giver organismen en fordel. Hvis mutationen er fordelagtig, vil den ofte blive nedarvet pga. naturlig selektion, altså simpelthen fordi mutationen giver organismen mulighed for at klare sig bedre end organismer uden mutationen. På den måde kan nye egenskaber opstå, som for eksempel at bibeholde evnen til at nedbryde og optage næringsstofferne i mælk for voksne.

Når der opstår en mutation, så er det proteinet, som dannes ud fra gensekvensen, der ændres. Proteiner har mange forskellige funktioner i kroppen, bl.a. som hormon til signalering, til transport af stoffer rundt i blodbanen, strukturel betydning for f.eks. muskelkontraktion samt enzymatisk aktivitet. Mutationer kan altså have indflydelse på organismen på mange forskellige måder. I realiteten skal der mange mutationer over en længere periode til for at lave så store ændringer, som f.eks. at det voksne menneske kan nedbryde laktose.

Der findes 4 forskellige typer af mutationer:

- **Insertion** – et antal nukleotider indsættes i gensekvensen
- **Deletion** – et eller flere nukleotider slettes fra gensekvensen
- **Substitution** – et nukleotid byttes ud med en anden så baseparringsprincippet svigter. Dette kaldes også en punktmutation.
- **Duplikation** – en sekvens kopieres to gange

Nogle mutationer kan have fatale konsekvenser for det resulterende protein. Især frameshift mutationer, som opstår når mutationer resulterer i at læserammen rykkes. Læserammen er den

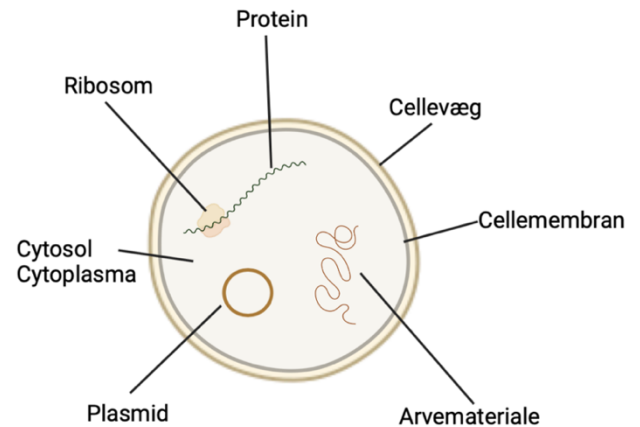
proteinsekvens man forstår når man tyder basekoderne. Der skal 3 baser til for at kode for 1 aminosyre, hvilket kaldes et kodon, som også forklares senere. Så når der sker en insertion eller en deletion vil hele læserammen rykkes, og alle de følgende tripletter vil kode for nye aminosyrer.

I løbet af campen vil I stifte bekendtskab med substitutionsmutationer som med vilje indføres i et plasmid for at undersøge, hvordan det påvirker organismen.

Bakterier

Bakterier er prokaryote celler. Selvom bakterier kan være meget forskellige, har de den samme grundlæggende struktur (Figur 2). Alle bakterier bruger DNA til at gennem deres arvemateriale, og hos mange bakterier er dette cirkulært og kaldes plasmider.

Prokaryoter adskiller sig særligt fra eukaryoter på et punkt: de har ikke en cellekerne. De betyder at deres arvemateriale (DNA) ligger frit i cellens indre: cytosolen.

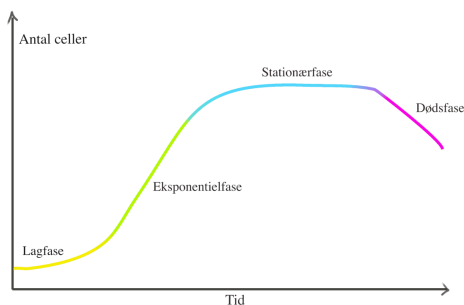


Figur 2: Prokaryot celle

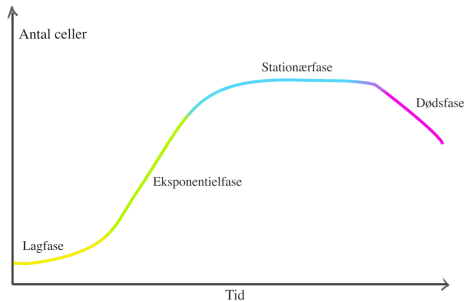
Cytosolen er en væske, der hovedsageligt består af vand og opløste ioner, f.eks. salte og metaller og andre små molekyler og proteiner. Cytoplasma består også af uopløselige cellekomponenter som f.eks. ribosomer. Ribosomerne er ansvarlige for proteinsyntesen. Her bliver der altså dannet protein ud fra messenger RNA (mRNA).

Uden om cellen findes cellemembranen, der adskiller cellens indhold fra det omkringliggende miljø. Cellemembranen er med til at regulere, hvad der kommer ind og ud af cellen. Udenom bakteriernes cellemembranen ligger cellevæggen, som både beskytter cellen og er med til at holde på formen. Cellevæggen er opbygget af lange kæder af peptidoglycan, som er et sukkerstof.

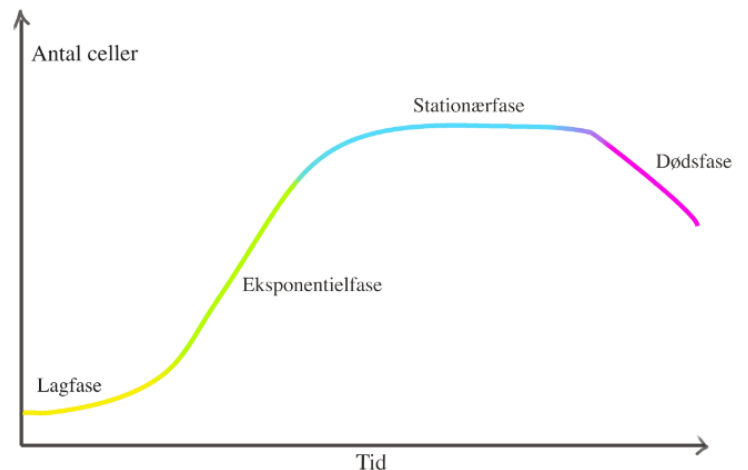
Bakterievækst



Mikroorganismers vækst kan beskrives med en vækstmodel som den der ses på (**Fejl! Henvisningskilde ikke fundet.**). I vækstmodellen inddeles væksten i fire faser: nølefasen, den eksponentielle fase, den stationære fase og dødsfasen.



I **lag-/nølefasen** er cellerne lige blevet overført fra et brugt vækstmedie til et friskt, og de skal derfor vænne sig til de nye vækstbetingelser. Mikroorganismene tilpasser sig ved at omstrukturere deres stofskifte, og de begynder at syntetisere cellekomponenter forbundet med vækst. I denne fase kan hver enkelt mikroorganisme vokse i celledørrelse, men den deler sig ikke endnu. Antallet af mikroorganismer vil dermed være konstant. Nølefasen kan være kortere eller længere tid, afhængigt af forskellen mellem cellernes tidligere og nuværende vækstbetingelser.



Figur 3: Vækstmodellen

I **den eksponentielle fase** har cellerne vænnet sig til vækstbetingelserne, og de begynder at formere sig ved celledeling. Fordi én celle deler sig i to, er antallet af mikroorganismer eksponentielt voksende. Som eksempel har bakterien *Escherichia coli* en generationstid, dvs den tid det tager for en celle at blive til to, på omkring 20 minutter, mens gærsvampen *Saccharomyces cerevisiae* har en generationstid på 90 minutter. Andre typer af organismer som dyre- og planteceller kan have generationstider på adskillige timer eller sågar døgn.

I **den stationære fase** er cellerne ikke længere i vækst. Det kan skyldes; (1) at mikroorganismene har opbrugt næringsstofferne i mediet; (2) at der har ophobet sig affaldsstoffer i vækstmediet, som dræber mikroorganismene eller hæmmer deres vækst; eller (3) at der simpelthen ikke er plads tilbage for mikroorganismene til at dele sig yderligere. Der sker igen en omstrukturering af stofskiftet i mikroorganismene, men de begynder nu at syntetisere cellekomponenter forbundet med overlevelse og stresshåndtering. Antallet af mikroorganismer vil dermed være konstant, fordi antallet af nydannede celler er nogenlunde lig antallet af døende celler. Nogle af de mikroorganismer, der dør, vil sprænges ved cellelysering, hvormed deres nedbrydningsstoffer kan udnyttes som næringsstoffer af andre mikroorganismer, der stadig vokser.

I **dødsfasen** har cellerne ikke længere gode nok vækstbetingelser til at kunne opretholde de nødvendige livsprocesser. Det kan være mangel på næringsstoffer eller ophobning af affaldsstoffer, som dræber mikroorganismene. Fordi antallet af døende celler overstiger antallet af nydannede celler, er antallet af mikroorganismer aftagende. Typisk er dødsraten i dødsfasen væsentligt lavere end vækstraten i den eksponentielle fase.

Vækstmedie

For at bakterierne kan gro, skal vi sørge for at de har de rigtige forhold. Bakterierne har brug for organiske stoffer, mineraler og salt for at kunne vokse. Hvis man blander disse stoffer i de rette forhold, kan man producere et **vækstmedie**. Der findes mange forskellige vækstmedier med forskelligt indhold, som bruges til forskellige organismer og formål.

På campen kommer I til at bruge M17-medie til *Lactococcus lactis* celler og LB-medie til *Esterichia coli* cellerne. For at lave 1 liter flydende LB-medie skal man blande 10g/L **tryptone**, 5g/L **gærekstrakt** og 10g/L **natriumklorid** i 1 liter vand. Tryptonen er en blanding af peptider (proteiner), som er bakteriernes kilde til aminosyrer. Gærekstrakt består af gærcellens indhold efter cellevæggen er fjernet. Dette er bakteriens kilde til sukker, mineraler og anden næring. Natriumklorid er normalt køkkensalt. M17-mediet indeholder de samme grundlæggende ingredienser som LB-medie, dog indeholder M17 lidt flere komponenter.

Når celler podes til (tilsættes) et flydende vækstmedie, vil cellerne gro nede i væsken. Et alternativ til denne metode er at tilsætte 15g/L agar til varmt flydende medie, og komme denne blanding i en petriskål. Når agar varmes op til 85 °C, smelter den og bliver flydende. Ved 32-40 °C størkner agaren og danner derved et fast vækstmedie.

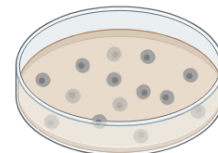
Petriskåle, der indeholder et fast medie baseret på agar, kaldes agarplader. Agarplader bruges til at dyrke celler på en overflade. Celler, der spredes ud og dyrkes på en agarplade, er lette at identificere. Det skyldes, at de vokser i kolonier, som kan ses med det blotte øje som små prikker. Hver koloni er et resultat af én celle der har delt sig til mange millioner af celler, der ligger op ad hinanden (Figur 4/Agarplader). Alle cenerne i en koloni antages altså at være genetisk identiske. Det er vigtigt at kunne sprede cellerne rigtigt ud på en agarplade, så hver enkelt kolonier kan tælles.

Vidste du at?

Agar er en hvid substans, der kommer fra røde algers cellevægge. Agar bruges i laboratoriet og i fødevarer som alternativ til gelatine.



Agar plade uden kolonier



Agar plade med kolonier

Figur 4: Agarplader med og uden vækst

Selektion af bakterier

Der findes mange mikroorganismer i luften, der kan falde ned på en agarplade og kontaminere den, mens den står uden låg. Der findes forskellige metoder hvorpå man kan sikre sig, at det kun

er den bakterie man arbejder med, som groer på pladen. En god metode er med såkaldte **selektive agarplader**. Der er to grundlæggende typer indenfor dette:

1. Der indsættes en **selektionsmarkør** i bakteriens gener. Det kan f.eks. være antibiotikaresistens, hvilket betyder, at hvis man udplader bakterien på en plade med antibiotika, vil den gro, mens bakterier uden antibiotikaresistens vil blive hæmmet af antibiotikaen. En selektionsmarkør kan også være farve, hvorved bakterien på den måde adskiller sig fra de andre.
2. Agarpladen er selektiv. Her er det kun muligt for en specifik gruppe bakterier at gro, da petriskålens vækstmedie har et særligt fordelagtigt næringsindhold til denne gruppe, mens det hæmmer andre. Et eksempel på dette kunne være at tilsætte galde til agar, som derved selekterer for tarmbakterier som *E. coli*.

I vil i løbet af ugen bruge både selektionsmarkør og selektive plader til at gro *L. lactis* og *E. coli*.

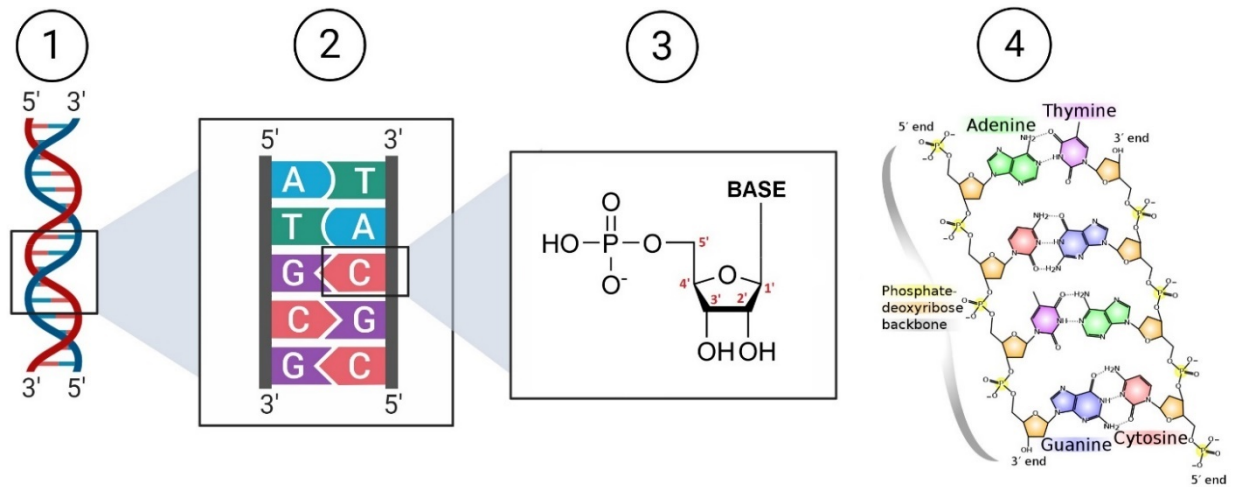
Det genetiske udtryk

DNA

DNA er et molekyle, der bærer genetiske instruktioner til udvikling, funktion, vækst og reproduktion af alle kendte organismer og mange vira. DNA står for deoxyribonukleinsyre og består af to DNA-streng. Hver DNA-streng består af en masse **nukleotider**, der er kovalent bundet sammen. Et nukleotid består af en fosfatgruppe, et pentosesuktermolekyle (deoxyribose) samt en nitrogenholdig base. I DNA findes der fire forskellige baser; **cytosin** (C), **guanin** (G), **adenin** (A) og **thymin** (T) (Figur 5.1 og 6.2)

Grundet DNA-strengens opbygning, har DNA-strengen også en retning. Det vil sige, at DNA-strengen har to ender, der adskiller sig fra hinanden. Disse to ender kaldes for henholdsvis **5'-enden** og **3'-enden** (Figur 5.4). 5'-enden bliver ofte beskrevet som DNA-strengens begyndelse, hvor det første nukleotid har en fosfatgruppen, som stikker ud fra pentosesukkerets 5. carbon atom. 3'-enden bliver ofte kaldt for DNA-strengens afslutning. Her indeholder det sidste nukleotid i DNA-strengen en hydroxylgruppe (-OH-gruppe) fra pentosesukkerets 3. carbon atom, der bliver eksponeret (Figur 5.3). Når nye nukleotider skal tilføjes til DNA-strengen, vil nukleotidet der skal inkorporeres i strengen danne en binding mellem dens 5'-fosfat til DNA-strengens 3'-hydroxylgruppe. Dermed vokser strengen fra sin 5'-ende mod sin 3'-ende.

De to DNA-streng er snoet omkring hinanden og danner en struktur, der minder om en snoet stige. Denne struktur kaldes for en **dobbelthelix**. På ydersiden af dobbelthelixa sidder DNA-strengenes fosfatgrupper og suktermolekyler. Dette kaldes også for DNA'ets **backbone**. De fire forskellige typer baser findes på indersiden af helixen. De sørger for, at de to kæder sidder sammen, da baserne danner par med hinanden via hydrogenbindinger (Figur 5.2 og 6.4).



Figur 5: DNAs opbygning (1) Doblet strengtet DNA helix der er opbygget af (2) de 4 komplementære nukleobaser. (3) Nukleobaser består af en sukkerdel en fosfor del og en nitrogenholdig base. Der er 5 carbon atomer i sukkeret, navngivet 1'-5'. Det er ud fra disse carbonatomer, at DNA-strengene er navngivet 5' eller 3'. Henret fra Wikipedia (Madeleine Price Ball).

De fire forskellige baser laver en specifik pardannelse med hinanden. Cytosin (C) danner par med guanin (G), og adenin (A) danner par med thymin (T) (figur 6.2). De to DNA-streng i dobbelthelixen løber i modsatte retninger. Det betyder, at 5'-enden af en streng er parret med 3'-enden af dens matchende streng. Man siger derfor, at DNA-strengene er **antiparallele** (figur 6.2, 6.4).

RNA

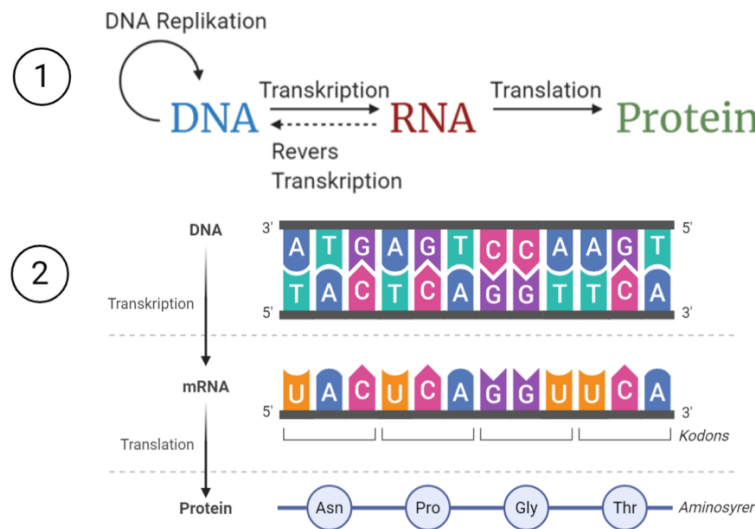
RNA består, ligesom DNA, af en kæde af nukleotider og har utrolig mange forskellige funktioner i cellen. I modsætning til DNA, er RNA enkeltstrengtet og har små ændringer i sin sukkergruppe. En anden vigtig forskel mellem DNA og RNA er, at en af de fire nitrogenholdige baser i RNA er anderledes. I RNA erstattes basen thymin (T) med basen uracil (U). Der er mange forskellige typer RNA, herunder messenger RNA (mRNA), ribosomalt RNA (rRNA) og transfer-RNA (tRNA) samt primere. mRNA er den type RNA der bliver aflæst og danner et protein ved translation i ribosomerne. rRNA er (sammen med proteiner) en vigtig bestanddel af ribosomerne. Endelig har tRNA den vigtige rolle, at transportere aminosyrerne til ribosomet under proteinsyntesen.

Proteiner

Proteiner er en vigtig bestanddel af celler og der er mange forskellige proteiner i hver celle. Proteiner er opbygget af én eller flere kæder af **amino-syrer**. Disse kæder kaldes for **polypeptider**. Der er 20 forskellige aminosyrer, der kan bruges til at lave et protein, og hver aminosyre har forskellig struktur og kemisk adfærd. Antallet af aminosyrer på polypeptidet varierer fra protein til protein. Antallet af polypeptider, som et protein er opbygget af, varierer også. Proteiner kommer derfor i enhver størrelse, form og type, som du kan forestille dig, og hvert enkelt protein har et specifikt formål. Tilsammen er de livsnødvendige for cellens overlevelse, mens nogle enkelte vil være overflødige.

Det Centrale Dogme

I 1956 opdagede Francis Crick en af de vigtigste koncepter i molekylærbiologiens historie, '**Det Centrale Dogme**' (Figur 6). Det Centrale Dogme beskriver strømmen af genetisk information i en celle. DNA koder for RNA via transskription, og RNA koder for protein via translation (Figur 6.1). DNA kan desuden kopieres og videregive genetiske information til en ny celle via replikation. Derimod har man aldrig i naturen observeret en strøm af genetisk information fra protein til RNA, til DNA. Med andre ord kan man sige, at når den genetiske information er videregivet til proteinniveau, så er den genetiske information fastlåst, og aminosyresekvenserne kan dermed ikke blive videregivet mellem generationerne.



Figur 6: Det Centrale Dogme. (1) DNA kan blive kopieret ved hjælp af en proces, der kaldes for DNA-replikation. Dette er vigtigt for at en celle kan videregive sin genetiske information. DNA'et kan blive udtrykt i celle ved hjælp af to processer kaldet transskription og translation. (2) Når et gen skal udtrykkes, skal DNA-sekvensen først transskriberes til RNA. Den kodende region i RNA'et bliver dernæst lavet til et polypeptid med en korresponderende aminosyresekvens. Denne aminosyresekvens er bestemt ud fra RNA'ets kodons. Denne proces kaldes for translation. Læg herunder mærke til at kodonsekvensen for mRNA'et er den samme for 5'-3'-DNA-strengen (den kodende DNA-streng). Den eneste forskel mellem dem er, at thymin (T) er blevet erstattet med uracil (U) i RNA-strengen.

Replikation i bakterier

Under en celledeling skal en celle kopiere sit DNA ved replikation. Det kopierede DNA separeres derefter i to datterceller, der arver den samme genetiske information som modercellen. DNA-replikation er **semikonservativ**, hvilket betyder, at hver streng i en DNA-dobbelthelix fungerer som en skabelon til syntesen af en ny, komplementær streng. Når DNA-replikationen er færdig, er der to DNA-kopier, hvor hver dobbelthelix har en "gammel DNA-streng" og en helt ny DNA-streng. Bakterier skal kunne kopiere deres DNA meget hurtigt og med meget få fejl. Derfor gør de brug af forskellige proteiner, der arbejder sammen for at sikre, at DNA-replikation udføres så nøjagtigt som muligt. Disse proteiner skal du lære om nu.

Før DNA'et kan blive kopieret, skal de to DNA-strengene adskilles fra hinanden. For at gøre dette, bruges specifikke enzymer kaldet **DNA-helikaser**. Disse enzymer binder til et kort segment i DNA'et. De adskiller derefter de to DNA-strengene fra hinanden og danner to Y-formede strukturer, der kaldes for **replikationsgabler** (Figur 7). De to replikationsgabler udgør tilsammen et kompleks, der kaldes for en **replikationsboble**. Segmentet, hvor DNA-helikasen binder, kaldes for "**Origin of replication**" (**ORI**), og her starter syntesen af ny DNA. *E. coli* har, som de fleste bakterier, en enkelt ORI-sekvens på dets kromosom (se Figur 7). Denne sekvens har stor overvægt af A / T-basepar (som holdes sammen af færre brintbindinger end G / C-basepar), hvilket gør DNA-strengene lettere at adskille. For at sikre, at de to adskilte strengene ikke genforenes, binder der sig en masse strukturstabiliserende proteiner til både de enkeltstrengede DNA-regioner i replikationsboblen og de dobbeltstrengede DNA-regioner udenfor replikationsboblen.

Når DNA-helikasen har adskilt de to DNA-strengene fra hinanden, og replikationsgablerne er dannet, er DNA'et klar til at blive kopieret. Syntetiseringen af den nye DNA-streng bliver gjort hovedsageligt af specifikke enzymer kaldet **DNA-polymeraser**. Disse enzymer tilføjer nukleotider til den voksende DNA-kæde en efter en. Dette gør DNA-polymerasen ved at bruge den ene DNA-streng som skabelon til at inkorporere de nukleotider, der komplementerer skabelonen. Disse nukleotider bliver altid tilføjet til 3'-enden af DNA-strengen.

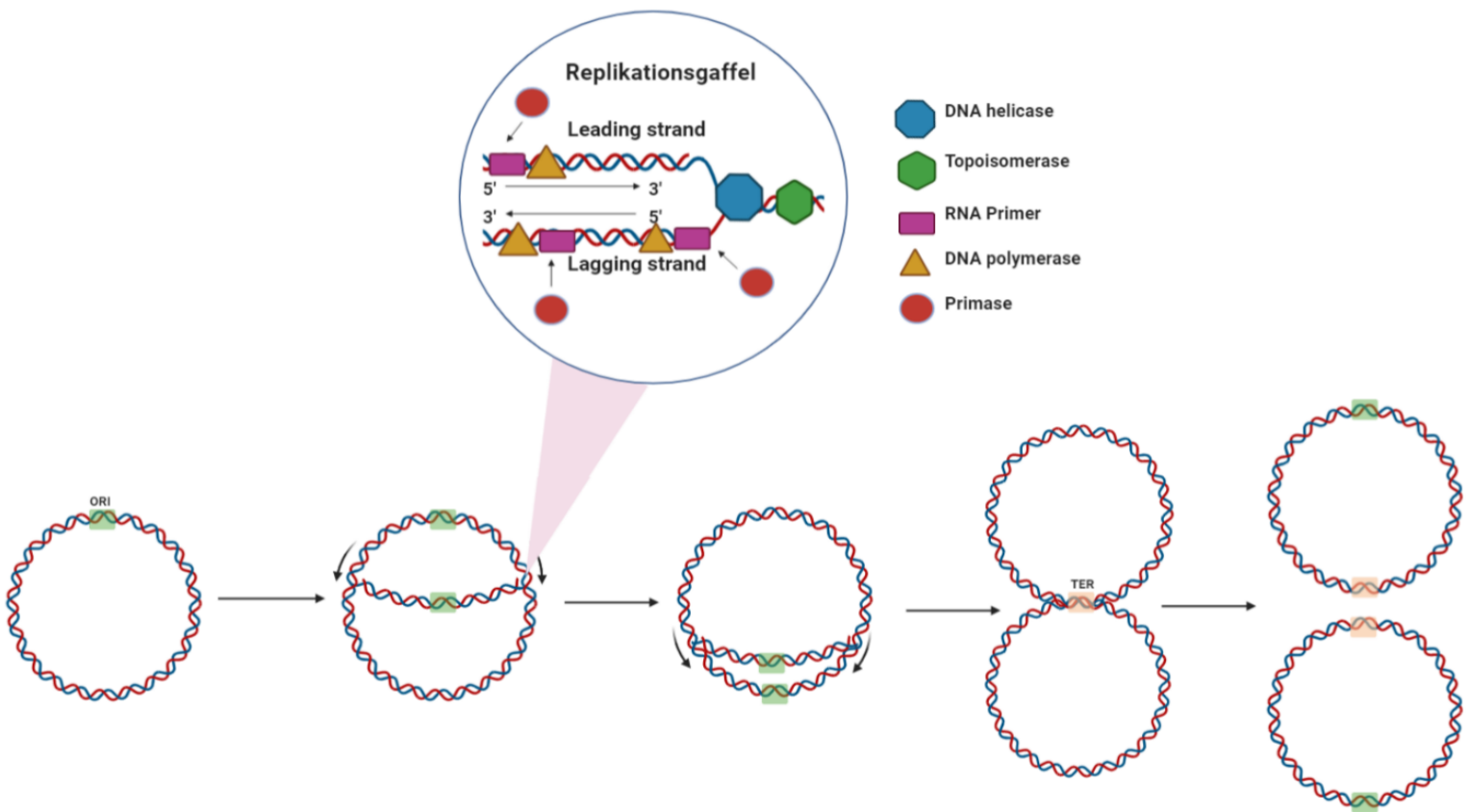
Men DNA-polymeraser kan ikke starte en ny DNA-kæde fra bunden. De kan kun binde nye nukleotider til en allerede eksisterende streng. Der er brug for en **primer**, som er et kort stykke RNA, der bliver sammensat af et enzym kaldet **primase**. Primerne sætter sig på DNA'et, så DNA-polymerasen har et sted at starte. Senere udskiftes primeren med DNA, og DNA-polymerasen kan herefter påbegynde DNA-syntesen (Figur 7).

Det er dog vigtigt at pointere, at DNA-polymeraser kun kan syntetisere DNA i 5' til 3' retning. Dette skaber et problem under replikation, da dobbeltstrengt DNA, som tidligere nævnt, altid er antiparallel. Det vil sige, at den ene streng løber i 5' til 3' retningen, mens den anden løber i 3' til 5' retningen.

Den nye streng, der kører fra 5' til 3' mod replikationsgaffen, er den lette. Strengen fremstilles kontinuerligt, fordi DNA-polymerasen bevæger sig i samme retning som replikationsgaffen. Denne kontinuerligt syntetiserede streng kaldes for **leading strand**. Den anden nye streng, der løber fra 5' til 3' væk fra replikationsgaffen, er vanskeligere (Figur 7). Denne streng bliver lavet i fragmenter, fordi DNA-polymerasen bevæger sig væk fra replikationsgaffen. Det betyder, at DNA-polymerasen skal genmonteres på det nyligt eksponerede DNA, som replikationsgaffen har efterladt sig. Denne vanskelige streng, der er lavet i fragmenter, kaldes for **lagging strand** (Figur 7). De små fragmenter kaldes for **Okazaki-fragmenter**. Leading strand kan syntetiseres ud fra én enkelt primer, hvorimod lagging strand har brug for en ny primer til hvert Okazaki-fragment.

Afslutning af DNA-replikation forekommer, når to modsat orienterede replikationsgabler mødes og smelter sammen for at skabe to separate og komplette dobbeltstrengede DNA-molekyler. I

cirkulære bakteriekromosomer afslutter DNA-replikationen oftest i et område, der kaldes **terminusregionen (TER)**.



Figur 7: DNA-replikation af et bakterielt kromosom. Replikationsgafflen indeholder både DNA'ets leading- og lagging strand. På lagging strand syntetiserer primasen en masse primere. På leading strand er der kun brug for én enkelt primer. DNA-helikasen er ansvarlig for at separere de to DNA-streng. DNA-polymerasen sørger for at syntetisere den anden streng ved hjælp af primere fra primasen. Replikationen starter i ORI og slutter i TER regionerne på kromosomet.

Transskription: Fra DNA til RNA

Ordet **transskription** beskriver en proces, hvori oplysninger skrives om. I biologiens verden beskriver transskription en proces, hvor en gensekvens (altså en DNA-sekvens) bliver kopieret og oversat til den korresponderende RNA-kode. Transskription er det første led i at få et gen udtrykt, hvor information kodet i genet bruges til at konstruere et funktionelt produkt såsom et protein. For et proteinkodende gen bærer RNA-kopien den information, der er nødvendig for at opbygge et polypeptid der senere folder sig til et funktionelt protein. Transskription af et gen foregår i tre trin: 1. Initiering, 2. Elongering og 3. Terminering (se Figur 8). De færreste gener bliver transskriberet konstant. Cellerne regulerer i stedet omhyggeligt transskription af hvert gen individuelt eller for en lille klynge af gener, der bliver transskriberet samtidig. På den måde kan cellen styre, at gener kun bliver udtrykt, når der er behov for dem.

Initiering

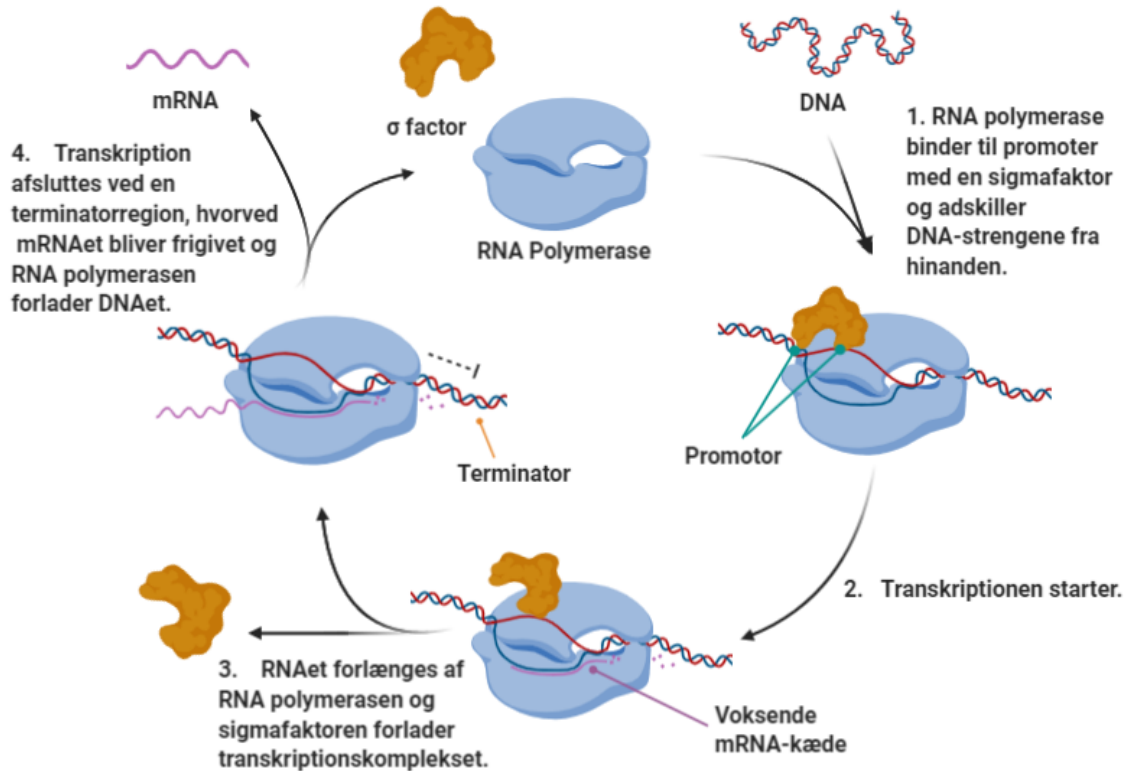
Når cellen starter transkriptionen af et gen, binder **RNA-polymerase** til en sekvens på DNA'et, der kaldes for en **promotor**. Denne sekvens findes i nærheden af genets begyndelse. Hvert gen har sin egen promotor der fungerer som en tænd/sluk knap for genet. Når RNA polymerasen binder til promotoren, adskiller RNA-polymerase DNA-strengene, hvilket blotlægger den enkeltstrengede DNA-skabelon, der er nødvendig for transskription. For at de rette gener transskriberes, er det derfor yderst vigtigt at RNA-polymerasen binder til den rette promotor. Dette gøres ved hjælp af et protein, der kaldes for en **sigmafaktor (σ -faktor)**. Dette protein muliggør specifik binding af RNA-polymerase til promotoren. Den specifikke σ -faktor, der bruges til at initiere transskription af et givet gen, vil variere afhængigt af genet og af de miljømæssige signaler, der er nødvendige for at starte transskription af dette gen. Den valgte promotor for RNA-polymerasen afhænger derfor af σ -faktoren (Figur 8.1).

Elongering

Når RNA-polymerasen har bundet sig til promotoren sammen med σ -faktoren, bliver DNA-skabelonens sekvens herefter læst én base ad gangen (Figur 8.2). Samtidig med baserne bliver læst, bygger RNA-polymerasen en RNA-streng med komplementerende baser. Denne RNA-streng vokser i 5' \rightarrow 3' - retningen. RNA-strengen bærer præcis den samme sekvens, som den DNA-streng, der ikke bruges som DNA-skabelon, med undtagelse af basen uracil (U) i stedet for thymin (T). Denne DNA-streng kaldes derfor også for den **kodende DNA-streng**. Efter de første par baser er lavet på den voksende RNA-streng falder σ -faktoren fra hinanden, og RNA polymerasen fortsætter syntetiseringen af RNA-strengen på egen hånd (Figur 8.3).

Terminering

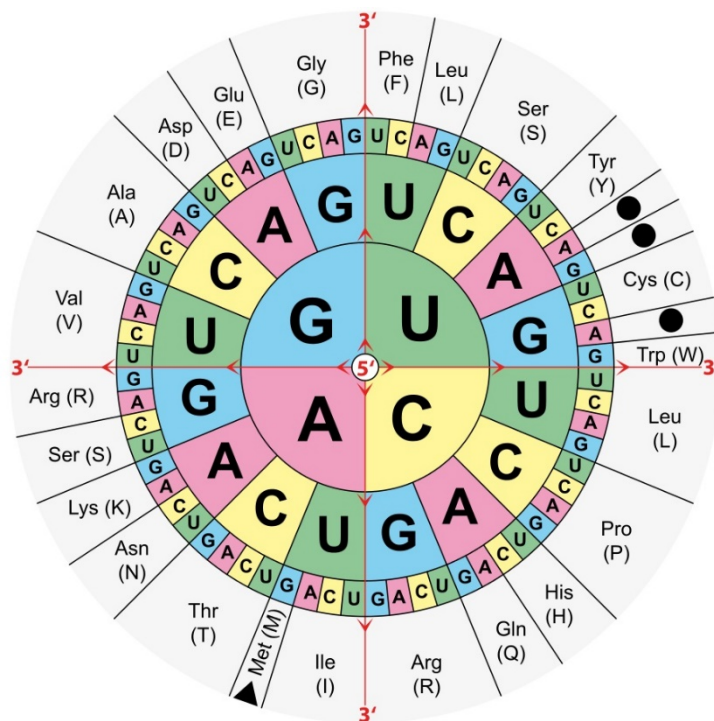
RNA-polymerasen fortsætter transkriptionen, indtil den møder en sekvens på DNA'et, der får den til at stoppe. Dette sker, når RNA polymerasen transskriberer en DNA-sekvens, der kaldes for en **terminator**. Når RNA-polymerasen møder en terminator, får det RNA-polymerasen til at stoppe transskriptionen, og RNA polymerasen falder af DNA-strengen (Figur 8.4). Et RNA-produkt, der er klar til at blive oversat af ribosomet, kaldes et **messenger RNA (mRNA)**. I bakterier er den nye mRNA-streng klar til at blive oversat lige efter transskription. Translationen af mRNA'et kan faktisk starte, mens transskription stadig foregår, og mange ribosomer er ofte knyttet til mRNA-strengen, mens den bliver syntetiseret.



Figur 8: Transkriptionen af DNA til RNA udføres af enzymet RNA-polymerase, der binder til en specifik promotorregion på DNA'et, med hjælp fra en specifik sigma-faktor. Polymerasen er derefter i stand til at initiere transkription ved at åbne det spiralformede DNA, hvilket tillader at det enkeltstrengede DNA kan fungere som en skabelon. Efter inkorporering af de første få nukleotider begynder enzymets affinitet til promotoren at falde, indtil sigma-faktoren frigøres fra polymerasen. Transkriptionen fortsætter indtil den når en terminatorregion, hvorefter mRNA'et bliver frigivet og RNA polymerasen kobler sig fra DNA'et.

Translation: Fra mRNA til polypeptid

Ved translation bliver informationerne, der er gemt i mRNA'et, brugt til at opbygge et polypeptid, som er en kæde sammensat af aminosyrer ved hjælp af et ribosom. Et polypeptid kan herefter blive foldet til et fuldt funktionelt protein. mRNA indeholder instruktionerne til opbygningen af et polypeptid, læst i grupper af tre RNA-nukleotider (adenin (A), uracil (U), cytosin (C) og guanin(G)). Disse grupper kaldes for **kodons**. Et enkelt kodon koder for én specifik aminosyre. Et **startkodon**, med sekvensen AUG, koder for aminosyren methionin og beskriver, hvor i mRNA-sekvensen translationen skal begynde. Herfra afkodes mRNA-sekvensen kodon for kodon uden overlap eller mellemrum, indtil ribosomet møder et **stopkodon** (UAA, UAG eller UGA), der markerer translationens afslutning. I forhold til alle andre slags kodons, så koder et stopkodon IKKE for en specifik aminosyre. Oversættelsen af kodon til aminosyre betegnes **den genetiske kode** (Figur 9).



Figur 9: Den genetiske kode. Figuren viser hvilke aminosyrer, som de forskellige kodons koder for. For at finde ud af, hvilken aminosyre ens kodon repræsenterer, skal man starte fra midten og bevæge sig udad. Man vælger her fra de forskellige nukleotider, der findes i ens kodon. F.eks. hvis man har et kodon, der hedder GAG, starter man i det midterste G-felt, hvorefter man går videre til A-feltet og til sidst til det yderste G-felt. Ud fra dette kan man se, at kodon GAG koder for aminosyren Glu (E). Startkodon er AUG, hvilket også er anvist med en sort pil. Slutkodons er UAA, UAG og UGA. Dette er anvist med sorte prikker. Billede hentet fra Wikipedia (Robert Kohlmann).

Men hvordan sker denne oversættelse i cellen? Translationen sker primært ved hjælp af transfer RNA og ribosomer.

Transfer RNA (tRNA) forbinder mRNA-kodons til den specifikke aminosyre, som de koder for. På den nederste del af hvert tRNA er der en sekvens på tre nukleotider, der kaldes for et **antikodon**, som kan binde til specifikke mRNA-kodons. Den øverste del af tRNA'et bærer den aminosyre, der er specificeret af det pågældende kodon. Der er derfor mange forskellige typer tRNA. Hver type læser én eller få kodons og bringer herefter den matchende aminosyre til den voksende polypeptidkæde.

Ribosomerne er de strukturer, hvorpå polypeptiderne bliver bygget. De består af protein og **ribosomalt RNA (rRNA)**. Hvert ribosom har to underenheder, en stor og en lille, der samles omkring mRNA'et, der skal oversættes. Ribosomet fungerer samtidig også som et enzym, der forbinder aminosyrer sammen for at skabe en kæde.

Translationen kan inddeles i samme faser som transskriptionen: Initiering, elongering og terminering.

Initiering

Først samles ribosomet omkring mRNA'et, der skal læses, og det første tRNA binder sig på mRNA-strengen. Dette tRNA bærer aminosyren methionin, der matcher startkodonet AUG. Denne opsætning kaldes for initieringskomplekset, hvilket er nødvendigt for at oversættelsen kan komme i gang.

Elongering

Efter initieringskomplekset vil aminosyrekæden blive forlænget. Her oversætter ribosomet et kodon ad gangen, og den korresponderende aminosyre tilføjes til den voksende aminosyrekæde. Hver gang et nyt kodon oversættes, overføres et tRNA med den rette aminosyre til polypeptid. Herefter mister den naboliggende tRNA sin aminosyre, og dette tRNA frigøres. Det tRNA, der nu har en ekstra aminosyre, er klar til at give den voksende kæde videre til det næste tRNA.

Terminering

Under den sidste fase skal det færdige polypeptid frigøres. Polypeptidet bliver frigjort, når et stopkodon bliver genkendt af ribosomet. Sekvensen på dette stopkodon kan være UAG, UAA eller UGA. Disse kodonsekvenser udløser en række hændelser, der adskiller polypeptidkæden fra dens tRNA, og den kan herefter løsrive sig fra ribosomet og translationen er hermed afsluttet. Efter translationens afslutning kan polypeptidet stadig være nødt til at gennemgå forskellige slags modifikationer for at blive foldet til et funktionelt protein. Det skal også ofte sendes til det et andet sted i cellen eller kombineres med andre polypeptider, før det kan gøre sit job som et funktionelt protein.

Hvis du vil vide mere om molekylærbiologiens centrale dogme, anbefaler vi at du ser videoerne dedikeret til emnet på biostriben: <https://bit.ly/3mupSnh>

Metoder i laboratoriet

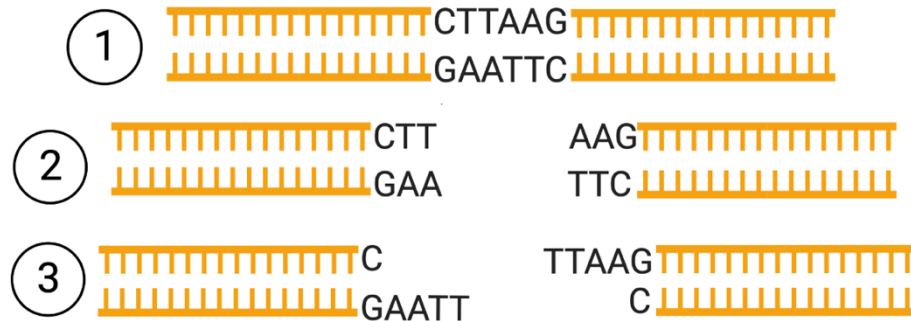
DNA-ekstraktion

På campen skal I bl.a. oprense et plasmid, hvilket også kaldes DNA-ekstraktion. Dette gøres, hvis man er interesseret i at isolere DNA fra en cellekultur. På campen anvender vi et kit til at ekstrahere DNA. Metoden bliver meget simpel ved brug af disse kits, og der opnås kvalitetsresultater, som professionelle forskningslaboratorier også bruger.

Fremgangsmåden ved DNA-ekstraktionen er: (1) at lysere/ødelægge cellerne i prøven, (2) at absorbere/binde DNA til en silicamembran, (3) at udvaske urenheder og (4) eluere (frigive) DNA fra kolonnen. Vi ender dermed med DNA i en buffer, hvori der hverken findes protein, nukleaser eller andre urenheder. Herfra bevares DNA'et bedst ved -20°C.

Kloning

På Campen skal vi prøve kræfter med **kloning af rekombinant DNA**. Rekombinant DNA er et DNA molekyle, der er lavet i laboratoriet ud fra mindst 2 forskellige kilder til DNA. Ved denne proces gør man brug af **restriktions enzymer**, som er enzymer, der kan bryde bindinger i DNA på den samme måde hver gang. Der findes både restriktionsenzymer, der kan lave såkaldt ”blunt cuts”, hvor begge DNA-strengene skæres i samme position og nogle, der kan lave ”sticky ends”, som også kaldes overhangs, hvor DNA-strengene skæres på en sådan måde, at der vises enkeltstreng DNA fra begge strengene. Eksempler på dette ses på figur 10



Figur 10: Restriktionsenzymer. (1) Den oprindelige DNA-sekvens. (2) Blunt ends lavet af et restriktionsenzym. (3) Sticky ends (overhangs) lavet af et restriktionsenzym.

Når et restriktionsenzym har klippet i DNA’et kan en ny DNA-sekvens sættes ind. To vilkårlige DNA-sekvenser med komplementære sticky ends kan samle sig til en dobbelthelix DNA-streng ved hjælp af hydrogenbindinger mellem baserne. Det gælder altså selv når f.eks. humant og bakterielt DNA blandes. Man kan desuden gøre brug af DNA-ligase, som katalyserer dannelse af kovalente fosfodiesterbindinger mellem strengene, for på den måde at ”reparere DNA’et”.

Herefter opformeres DNA’et, hvilket kan gøres i en værtsorganisme f.eks. *E. coli* eller ved brug af PCR, som forklares senere. Næste skridt er at overføre DNA’et til den ønskede organisme. Denne proces kaldes **transformation**, og kræver at værtscellerne er gjort ”**kompetente**”. Det begreb dækker over at cellerne er gjort modtagelige for DNA, ved at svække cellemembranen. Det er vigtigt at disse celler hele tiden holdes så kolde som muligt, for at cellemembranen ikke repareres. Når både kompetente celler og rekombinant DNA er klar, skal de to komponenter blandes i en elektrokuvette. Denne giver man elektrochok, hvorefter cellerne skal gro i et vækst medie. Efterfølgende skal man sikre sig, at de rette gener er overført til organismen, f.eks. ved brug af selektive plader.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase Chain Reaction er en molekylærbiologisk teknik, der bliver brugt til at opformere specifikke DNA-sekvenser. PCR bliver brugt til detektion og identifikation af organismer eller biologisk materiale, der indeholder DNA. PCR bliver også hyppigt brugt som et vigtigt redskab til kloning og genmodificering.

PCR udnytter en af naturens egne enzymer, som spiller en vigtig rolle i det centrale dogme, nemlig DNA-polymerasen. Til PCR bruges DNA-polymerasen til at opformere en specifik DNA-sekvens, der kaldes for vores **gene of interest (GOI)**. Vores GOI er en del af et længere stykke DNA, som kaldes for en **DNA-skabelon**. PCR gennemgår en række cyklusser, hvor hver DNA-sekvens bliver kopieret én gang per cyklus. Så hvis man starter med 2 ens DNA-streng, vil man efter første cyklus have 4 DNA-streng. Hvis man kører en PCR med 30 cyklusser, ender man ud med 2^{30} kopier af ens DNA-streng, hvilket svarer til 1.073.741.824 DNA-streng.

Valg af primere - kopiernes start og stop

DNA har som bekendt to streng, der løber i hver sin **retning** (3' til 5' og 5' til 3'). Derfor vil DNA-polymerase i PCR også kopiere de to streng i hver sin retning. Dette indebærer, at der skal bruges to forskellige primere - én til start af kopiering i hver retning. DNA-polymerase bygger nemlig udelukkende en ny streng op i retningen fra 5' til 3'. Den streng, enzymet bruger som skabelon, skal altså gå modsat, dvs. fra 3' til 5'. Det betyder, at de to nødvendige primeres sekvenser skal vælges, så den ene baseparrer til startstedet på den ene streng, og så den anden baseparrer til den anden strengs startsted. Da strengene er modsatrettede, ligger det ene startsted automatisk samme sted som stopstedet på den modsatte streng (Figur 12).

Hvorfor startstedet på én streng samtidig er slutstedet på den anden streng, kan være lidt svært at forstå. Men det skyldes, at de DNA-streng, som dannes i den første cyklus, også vil fungere som skabelon i den næste fordoblingscyklus, men nu for den modsatte streng og retning. Derfor er der ikke mere DNA-streng tilbage, når DNA-polymerasen kommer frem til det oprindelige startsted - som derfor bliver et stopsted.

Faserne i en PCR-cyklus

Hver cyklus i en PCR er delt op i tre forskellige faser, der har hver deres temperatur og varighed. De angivne temperaturer varierer efter hvilke primere, der anvendes (**Fejl! Henvisningskilde ikke fundet.**).

1. Opvarmning (denaturering af DNA)

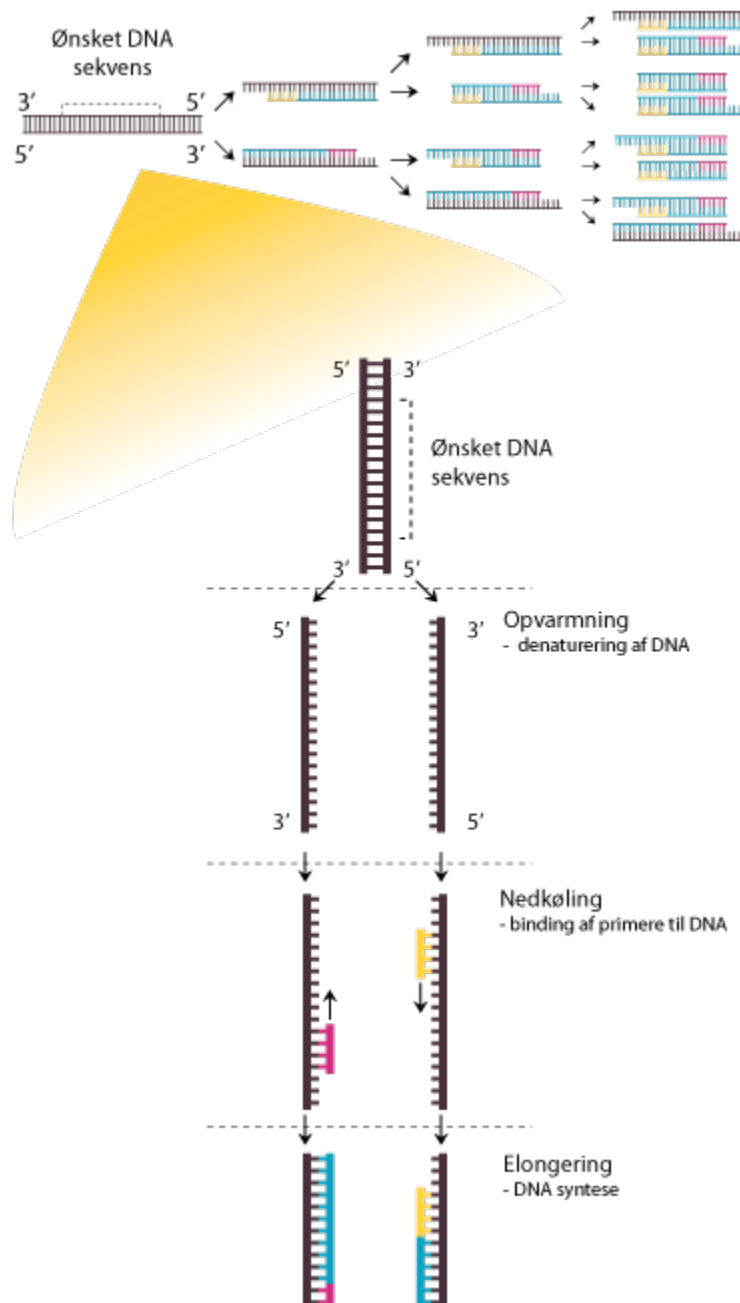
Det dobbeltstrengede DNA, der skal bruges som skabelon i reaktionen, skal først denatureres (skilles) ved høj temperatur (ca. 95 °C) nogle sekunder. Dette gør DNA'et enkeltstreng, så hver streng kan få bygget en ny komplementær streng senere i PCR-cyklussen.

2. Nedkøling (binding af primere til DNA)

Temperaturen sænkes til omkring 60 °C, hvor de tilsatte primere vil kunne binde til startstederne på det enkeltstrengede DNA.

3. Elongering (dannelse af de nye, komplementære DNA-strenger)

Temperaturen hæves til 72 °C, hvor DNA-polymerase binder til primerne ved startstederne og bygger videre på de nye, komplementære DNA-strenger. DNA-polymerasen fortsætter, så længe temperaturen ikke hæves, og så længe der stadig er skabelon-DNA til rådighed. Varigheden af trinnet beregnes derfor, så cyklusen først genstarter, når hele den interessante DNA-sekvens er forlænget (elongeret) til dobbeltstrengt DNA. En PCR med 30 cyklusser varer gerne 2-3 timer.



Figur 11: Figur 12: Opkopieringen af en specifik DNA-sekvens med PCR ved tilsætning af primere (gul og rød), der binder til startstedet for kopieringen på hver af de to DNA-strenger.

Hvis du vil vide mere om PCR, anbefaler vi at du ser videoerne dedikeret til emnet på Biostriben: <https://bit.ly/35DMjjP>

Gelelektroforese

Gelelektroforese er en teknik, hvor man kan separere- og identificere forskellige DNA-strengene eller proteiner i en opløsning. Gelelektroforese er et nyttigt redskab, da adskillelsen af DNA kan bruges til at måle antallet af basepar i en DNA prøve eller bekræfte om ens forsøg, har resulteret i den korrekte DNA-længde. Efter man har kørt en gelelektroforese, vil man se millioner af DNA-fragmenter, som adskilte lysende bånd i forskellige længder. Gelelektroforese kan altså bruges til at tjekke at det forventede DNA er til stede i en prøve.

I gelelektroforese udnytter man, at DNA naturligt er negativt ladet. Denne negative ladning kommer fra fosfatgrupper, der optræder i hvert nukleotid i DNA-strengen. I en gelelektroforese bliver DNA'et udsat for et elektrisk spændingsfelt, der har en negativ pol og en positiv pol. Da DNA er negativt ladet, vil det blive tiltrukket af den positive pol. De korteste DNA-strengene vil rejse længst igennem gelen (pga. den mindre modstand de oplever), og derved kan der skelnes mellem store og små DNA-fragmenter.

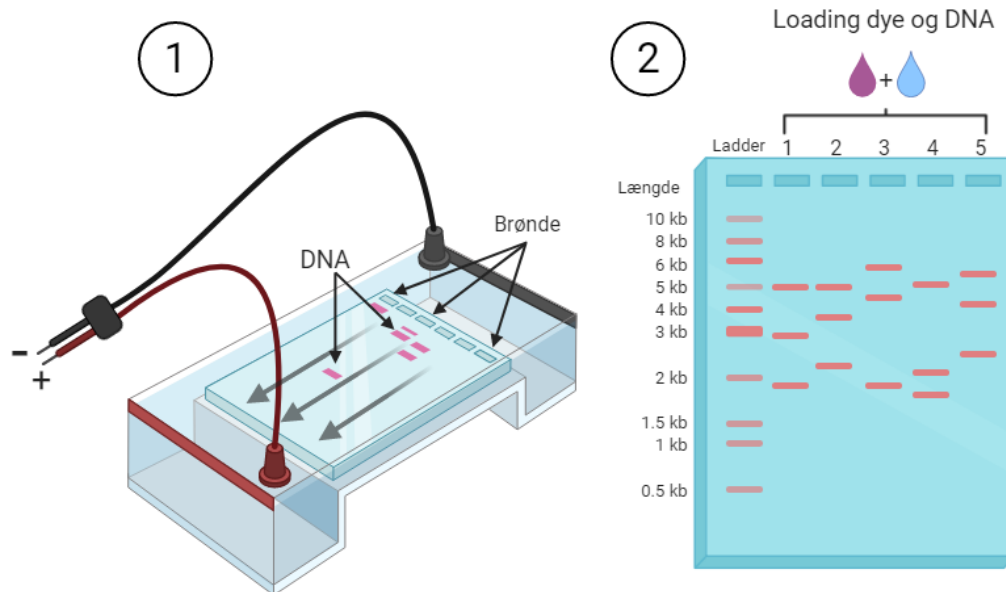
Opsæt en gel

Der indgår syv komponenter i en gelelektroforese: DNA, en gel, et elektroforese-kammer med et spændingsfelt, en DNA markør, en loading dye, en DNA stainer og en buffer.

1. Når man laver en gelelektroforese, støber man først sin gel. En gel består af polysacchariden **agarose**, der er blandet sammen med vores buffer og en **DNA-stainer**, der er vigtig for at kunne visualisere båndene under UV-lys. Gelen bliver først varmet op, og når den efterfølgende er kølet ned, vil agarosen størkne, og blandingen få en geléagtig tekstur.
2. Gelen bliver herefter nedsænket i et elektroforese-kammer, hvorefter en **bufferopløsning** hældes ned i elektroforese-kammeret, så den lige akkurat dækker gelen. Bufferopløsningen er med til at holde en stabil pH-værdi og beskytter gelen mod at udtørre. Ioner i bufferopløsningen er med til at lede strømmen igennem karret under gelelektroforesen (Figur 12.1).
3. De ellers usynlige DNA-fragmenter bliver herefter blandet med en lille smule **loading dye**, der er farvet og indeholder en koncentreret sukkeropløsning (ofte glycerin). Dette gøres for at visualisere DNA'et.
4. Herefter placerer man sin DNA-prøve i nogle fordybninger (kaldet brønde), der er placeret for enden af sin gel. Glycerinen sørger for, at DNA'et synker lettere til bunds i brøndene. Udover at tilføje DNA'et fra prøven til sine brønde, tilføjer man også en **DNA ladder**, der er en blanding af DNA-fragmenter i kendte længder (Figur 12.2). Da vi kender længden på DNA-fragmenterne i vores DNA-ladder, kan vi sammenligne de resulterende bånd fra

vores egen DNA-prøve med båndene fra DNA ladder og dermed få et godt overblik over hvor lange vores egne DNA-fragmenter er.

5. Efter at vores DNA-prøve og DNA ladder er tilføjet til brøndene, starter man herefter sin gelelektroforese ved at tænde for spændingsfeltet. Når man tænder for spændingsfeltet, vil det negativt ladede DNA blive tiltrukket af den positive pol i elektroforesekammeret. Det betyder, at DNA'et vil vandre gennem gelen mod den positive pol. En gel fungerer som en filter, som DNA'et skal anstrenge sig for at komme igennem. Det er sværere for langt DNA fragmenter at bevæge sig gennem gelen, og derfor bevæger de sig kortere i gelen, end de korte DNA fragmenter.
- 6.
7. Efter at gelelektroforesen er gennemført, kan man ved hjælp af UV-lys se sit DNA som små bånd på gelen (Figur 12.2). Grunden til at man bruger UV-lys er, at den tilføjede DNA stain binder sig til DNA'et og lyser op under UV-lys.

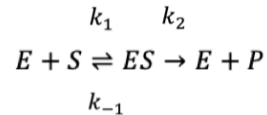


Figur 12 : Gel elektroforese. (1) Gelen ligger nedsunken i vores bufferopløsning. DNA'et bliver tiltrukket af den positive elektrode og vandrer derfor i pilenes retning gennem gelen. (2) Man tilføjer sin DNA Ladder i den første brønd og sin loading dye og DNA i de resterende brønde. Vi kan herefter se, hvordan DNA-fragmenterne bliver vist efter gelen er kørt ved hjælp af UV-lys. I brønden til venstre er vores DNA ladder, hvor vi kender længderne på dens DNA-fragmenter. Vi kan ud fra DNA-ladderens se, hvor lange vores DNA-fragmenter er i prøverne, der er i brøndene navngivet 1-5.

Hvis du vil vide mere om gel elektroforese, anbefaler vi at du ser videoerne dedikeret til emnet på Biostriben: <https://bit.ly/3kp39XS>

Michaelis Menten Kinetik

Enzymkinetik er undersøgelsen reaktioner, der er katalyseret af enzymer. Michaelis Menten kinetik er baseret på enzymkatalyserede reaktioner, der forløber som angivet:



Modellen beskriver hvorledes et enzym (E) og et substrat (S) indgår i et kompleks, og hvordan der herved dannes et produkt. Da dannelse af enzym-substrat-komplekset (ES) er en reversibel reaktion, kan ES enten falde fra hinanden – man siger det dissocierer - og blive til frit enzym og substrat, eller reagere og blive til frit enzym og produkt.

Alle reaktioner forløber med en individuel hastighed, hvilket angives med konstanten, k. Den reversible reaktion har hastighedskonstanten k_1 i den fremadgående retning og **hastighedskonstanten** k_{-1} i den tilbagegående retning. Enzym-substrat-komplekset kan ved den irreversible reaktion blive til frit enzym og et produkt med hastighedskonstanten k_2 .

Nedenfor ses de vigtigste formler til Michaelis Menten kinetik:

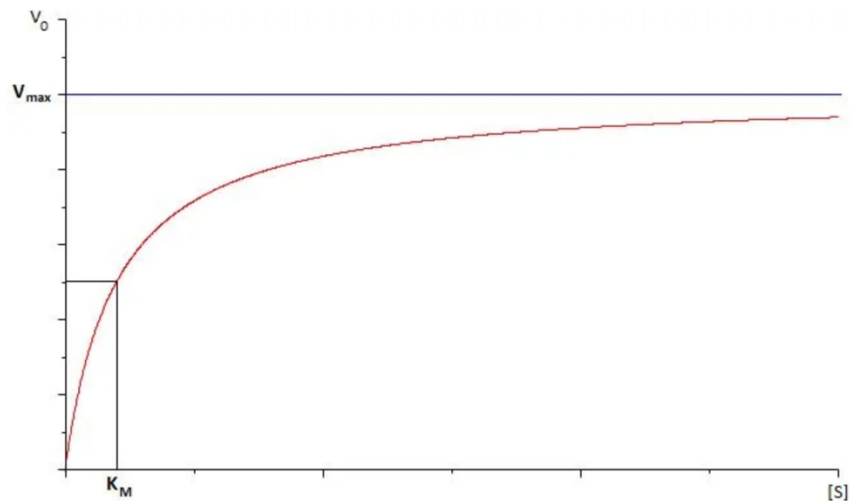
$$V_0 = V_{max} \cdot \frac{1}{2} \qquad K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$
$$V_0 = V_{max} \cdot \frac{[S]}{[S] + K_M} \qquad K_M = \frac{[E] \cdot [S]}{[ES]}$$

Initialhastigheden, V_0 , er et udtryk for hvor hurtigt der dannes produkt, mens V_{max} er **maksimalværdien** som V_0 kan antage dvs. maksimalhastigheden for reaktionen. Dette opstår når alle enzymer konstant er mættet med substrat.

Michaelis-Menten-konstanten, K_M , er et udtryk for enzymets bindingsaffinitet over for substratet. Michaelis-Menten-konstanten er specifik for en given reaktion og kan bestemmes eksperimentelt eller slås op. K_M er den substratkoncentration der skal til, for at reaktionen forløber med nøjagtigt halvdelen af maksimalhastigheden V_{max} . Dette ses nedenfor på en grafisk afbildning (Figur 13) af Michaelis-Menten-ligningen, som er givet ved:

$$V_0 = V_{max} \cdot \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

Sammenhængen mellem $[S]$ og V_0 ifølge Michaelis-Menten-ligningen:



Figur 13: Grafisk afbildning af Michaelis-Menten ligningen. Kurven viser tydeligt hvad der sker med reaktionshastigheden når koncentrationen af substrat øges. Ligeledes kan man se hvilken betydning V_{max} og K_M har.

I praksis beskriver K_M -værdien enzymets affinitet over for substratet, dvs. hvor tilbøjeligt enzymet er til at indgå i et kompleks med substratet. En lav K_M -værdi betyder, at der ikke skal særlig meget substrat til, for at reaktionen forløber med en hastighed tæt på maksimalhastigheden, V_{max} . Omvendt betyder en høj K_M -værdi, at der skal meget substrat til, for at reaktionen forløber tæt ved sin maksimalhastighed. Bemærk, at K_M -værdien ikke har nogen indflydelse på størrelsen af V_{max} , men kun indflydelse på, hvor meget substrat der skal til for at nå maksimalhastigheden. Det betyder, at V_{max} er uafhængig af K_M , og begge kan antage høje og lave værdier, uanset størrelsen af den anden.