

# Teorikompendium - Biotech Academy Camp 2023

Velkommen til Biotech Academy Camp 2023!

I år kommer Biotech Academy Camp til at handle om hvad syntesebiologi og cellefabrikker er, og hvordan de kan bruges i praksis, til at producere plastiknedbrydende enzymer. Dette kompendie skal introducere den nødvendige baggrundsviden, samt give dig et overblik over de bioteknologiske redskaber, som vi kommer til at bruge på selve campen. Forskellige steder i dette kompendie vil der blive henvist til Biostriben. Biostriben er en del af Biotech Academys hjemmeside, og her finder du en masse gode videoer om de emner, der bliver gennemgået i dette kompendie. Vi anbefaler, at du ser disse videoer som en del af forberedelsen.

Vi forventer ikke, at du husker alt, hvad der står i kompendiet, men at du læser op, hvor du har behov. Vi kommer til at gennemgå teori på campen, men vi har ikke tid til at gennemgå alt, hvilket er hvorfor vi beder alle deltagere om at forberede sig på forhånd. Man må meget gerne skrive spørgsmål ned, hvis der er noget som er svært, eller ikke helt klart i teksten. Du får rig mulighed for at spørge ind til det, når vi mødes.

God læselyst! Vi glæder os til at se dig.

Bedste hilsner fra Amalie og Kaare

## Indholdsfortegnelse

<b>Det genetiske udtryk .....</b>	<b>3</b>
<i>DNA</i> .....	3
<i>RNA</i> .....	4
<i>Proteiner</i> .....	4
<b>Det Centrale Dogme .....</b>	<b>4</b>
<i>Transskription: Fra DNA til RNA</i> .....	5
Initiering .....	5
Elongering .....	5
Terminering .....	6
<i>Translation: Fra mRNA til polypeptid</i> .....	6
Ribosomal initiering .....	8
Ribosomal elongering.....	8
Ribosomal terminering.....	8
<i>Enzymer – struktur og funktion</i> .....	9
Restriktionsenzymer .....	9
Plastiknedbrydende enzymer.....	11
<i>Tags</i> .....	13
<b>Bakterier .....</b>	<b>15</b>
<i>Bakterievækst</i> .....	15
<i>Replikation i bakterier</i> .....	17
<i>Kompetente celler</i> .....	18
<i>Vækstmedie</i> .....	19
<i>Selektion af bakterier</i> .....	19
<b>Cellefabrikker .....</b>	<b>20</b>
<b>Metoder i laboratoriet.....</b>	<b>21</b>
<i>Restriktionsenzymkloning</i> .....	21
<i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i> .....	23
Valg af primere - kopiernes start og stop .....	23
Faserne i en PCR-cyklus .....	23
Colony PCR.....	25
<i>Gelelektroforese</i> .....	25
Opsæt en gel .....	25
<i>UV-VIS- Spektroskopi</i> .....	27
<i>Bradford proteinassay</i> .....	28

## Det genetiske udtryk

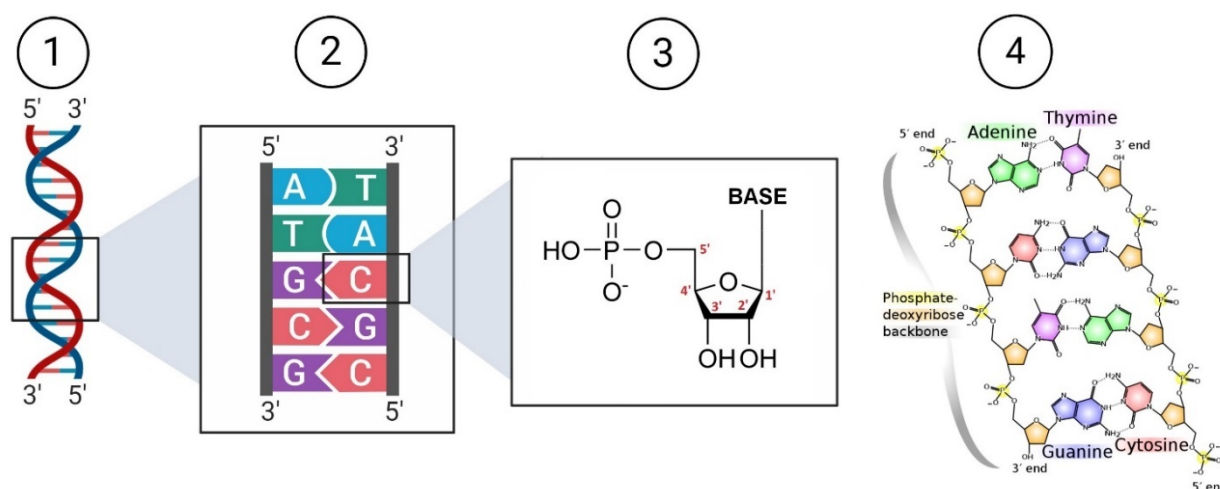
I moderne bioteknologisk produktion, der benytter genmodificerede organismer, er syntesebiologi uundværlig. For at kunne forstå teorien bag syntesebiologi er det dog nødvendigt med en fundamental forståelse for DNA, RNA og proteiner først. Disse tre komponenter vil du nemlig møde mange steder, når du gennemgår teorikompendiets emner.

### 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 det 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)**. De fire baser kan ses i deres sammenhæng på Figur 1.2.

Grundet DNA-strengens opbygning, har DNA-strengen 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 1.2). 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 tredje carbon atom, der bliver eksponeret (Figur 1.3). Når nye nukleotider skal tilføjes til DNA-strengen, vil nukleotidet, der skal inkorporeres i strengen, danne en binding mellem sit 5'-fosfat til DNA-strengens 3'-hydroxylgruppe. Dermed vokser strengen fra sin 5'-ende mod sin 3'-ende og bliver på den måde længere i 3'-enden.

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 dobbelthelixen 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 1.4).



Figur 1: DNA's opbygning. 1: Dobbel streng DNA helix. 2: Denne er opbygget af de 4 komplementære nukleobaser. 3: Nukleobaser består af en sukkerdel, en fosfordel og en nitrogenholdig base. Der er 5 carbon atomer i suktermolekylet, navngivet 1'-5' på følgende måde. Det er ud fra disse carbonatomer, at DNA-strengene er navngivet 5' eller 3'. 4: DNA'ets endelige opbygning med backbone på ydersiden og nukleobaser på indersiden.

Hentet fra Wikipedia (Madeleine Price Ball).

De fire forskellige baser laver specifikke pardannelser med hinanden. Cytosin (C) danner altid par med guanin (G), og adenin (A) danner altid par med thymin (T) (Figur 1.2). De to DNA-strengene 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 1.4).

Alle celletyper opbevarer deres arvemasse som DNA. Den totale mængde arvemasse, på DNA-form, er cellens genom. I eukaryote celler findes DNA'et i cellekernen: genomet ligger som et langt, lineært dobbeltstrengt DNA-molekyle, tæt pakket og strengt reguleret. Prokaryoter er mindre avancerede, og har cirkulære genomer, som ligger frit i cytoplasmet. De kan også indeholde genetisk information på mindre cirkulære DNA-enheder, som kaldes plasmider.

## RNA

RNA består, ligesom DNA, af en kæde af nukleotider, og det har utrolig mange forskellige funktioner i cellen. I modsætning til DNA, er RNA enkeltstrengt, og det har en anderledes opbygning af 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 når, der skal dannes et nyt protein via translation i ribosomerne. rRNA er (sammen med proteiner) en vigtig bestanddel af ribosomerne. Endelig har tRNA den vigtige rolle, at de transporterer aminosyrerne til ribosomet under proteinsyntesen.

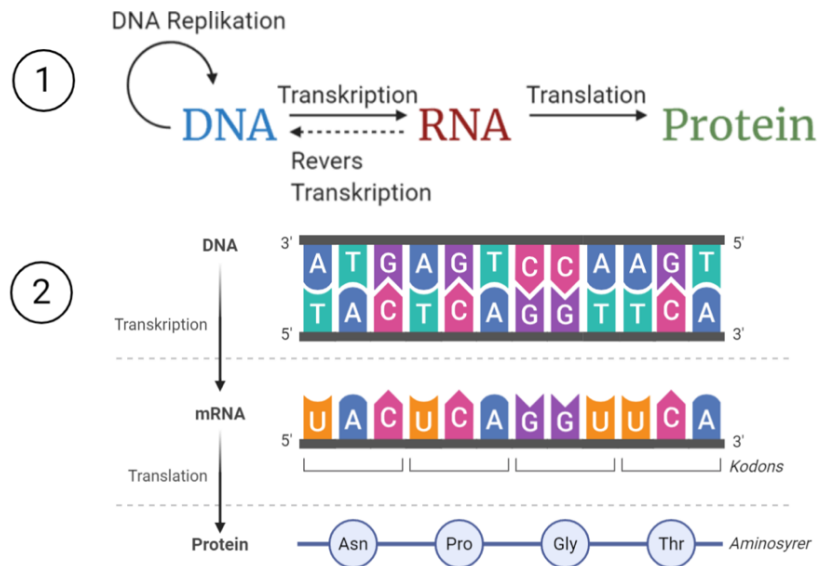
## Proteiner

Proteiner er et vigtigt element i celler, og der er mange forskellige typer af proteiner i hver eneste 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 i 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, og hvert enkelt protein har et specifikt formål i kroppen. De korte kæder, altså peptiderne, har dog også mange funktioner og bruges fx ofte som signaler hængt fast i enden på proteiner, der angiver hvor proteinet skal sendes hen i, eller udenfor cellen. Tilsammen er proteiner livsnødvendige for cellens overlevelse. Under årets camp kommer vi også til at arbejde med proteiner, eller mere præcist, enzymer.

## Det Centrale Dogme

For at forstå hvordan proteiner bliver dannet, og dermed hvordan vi selv kan manipulere denne process, skal vi forstå hvad det centrale dogme er. I 1956 opdagede Francis Crick en af de vigtigste koncepter i molekylærbiologiens historie, '**Det Centrale Dogme**' (Figur 2). Det Centrale Dogme beskriver strømmen af genetisk information i en celle. Overordnede sæt beskrives de to trin: DNA'et koder for RNA gennem transskription, og RNA koder derefter for protein via translation (Figur 2.1).

DNA kan desuden kopieres, og dermed kan der videregives genetiske information til en ny celle via replikation. I naturen har man aldrig observeret en strøm af genetisk information, der går den anden vej altså fra protein til protein, fra protein til RNA, eller fra protein til DNA. Med andre ord kan man sige, at når den genetiske information er videregivet til proteinniveau, så er den genetiske information fastlåst og kan ikke videregives længere.



Figur 2: 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 bliver udtrykt i cellen 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 via translation. Denne aminosyresekvens er bestemt ud fra det kodende RNA's kodons. Den kodende kodonsekvens for mRNA'et er den samme som for 5'-3'-DNA-strengen (den kodende DNA-streng), som det stammer fra. Den eneste forskel mellem dem er, at thymin (T) er blevet erstattet med uracil (U) i RNA-strengen.

## 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, altså få koden i genet omsat til 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 3). De færreste gener bliver transskriberet konstant. Cellerne regulerer omhyggeligt transskription af hvert individuelle gen eller 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 transskriptionen af et gen, binder **RNA-polymerase** sig til en sekvens i 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, kan RNA-polymerase skille DNA-strengene ad. Dette 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** ( **$\sigma$ -faktor**). Dette protein muliggør specifik binding af RNA-polymerase til promotoren. Den specifikke  $\sigma$ -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  $\sigma$ -faktoren (Figur 3.1).

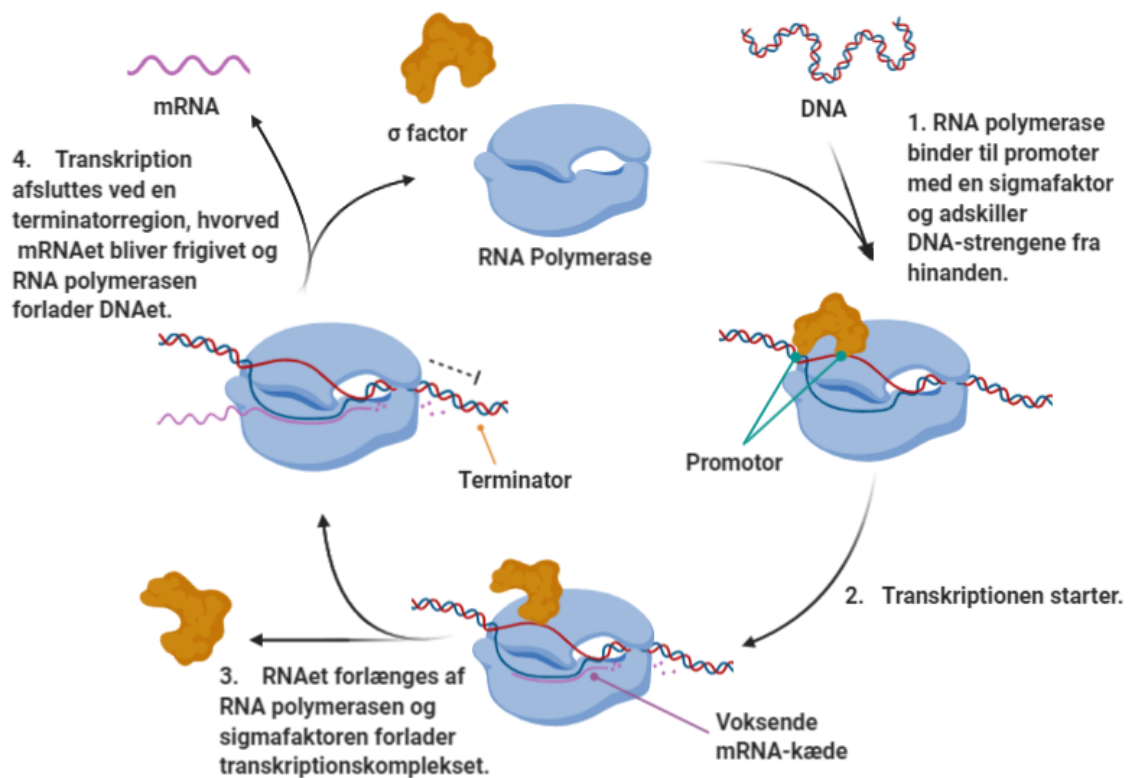
### Elongering

Når RNA-polymerasen har bundet sig til promotoren sammen med  $\sigma$ -faktoren, bliver DNA-skabelonens sekvens læst én base ad gangen (Figur 3.2). Samtidig med baserne bliver læst, bygger RNA-polymerasen en RNA-streng med komplementerende baser. Denne RNA-streng vokser i 5' til 3' -

retningen. RNA-strengen bærer den samme sekvens, som den DNA-streng, der ikke bruges som DNA-skabelon, med undtagelse af basen uracil (U) som systematisk byttes ud med thymin (T). Denne DNA-streng kaldes derfor også for den **kodende DNA-streng**. Efter at de første baser er sat på den voksende RNA-streng falder  $\sigma$ -faktoren af, og RNA polymerasen fortsætter syntetiseringen af RNA-strengen på egen hånd (Figur 3.3).

### Terminering

RNA-polymerasen fortsætter transskriptionen, 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 3.4). En RNA-sekvens, der er klar til at blive oversat af ribosomet, kaldes et **messenger-RNA (mRNA)**. I bakterier er mRNA-strengen klar til at blive oversat til protein lige efter transskription. Translationen af mRNA'et kan faktisk starte, mens transskription stadig foregår, og ribosomer er ofte knyttet til mRNA-strengen, mens den bliver syntetiseret.

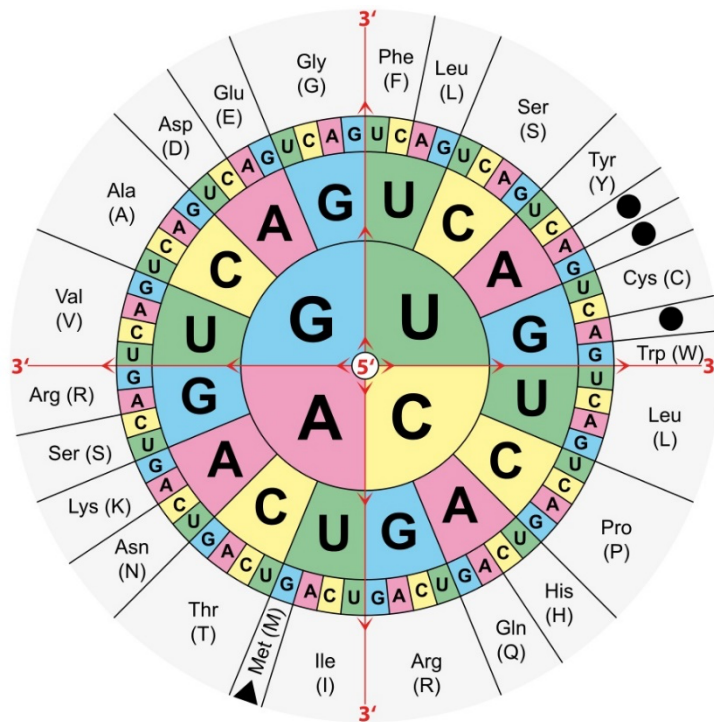


Figur 3: Transskriptionen af DNA til RNA udføres af enzymet RNA-polymerase, der binder til en specifik promotorregion på DNA'et, med hjælp fra en specifik sigma-faktor. RNA-polymerasen er derefter i stand til at initiere transskription ved at åbne det spiralformede DNA, hvilket tillader, at det enkeltstrengede 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 RNA-polymerasen. Transskriptionen 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 af aminosyrer, der opbygges ved hjælp af et ribosom. Et polypeptid kan efterfølgende foldes til et fuldt funktionsdygtigt protein. mRNA indeholder instruktionerne til opbygningen af et polypeptid. Instruktionerne læses i grupper af tre RNA-nukleotider, altså grupper af tre adenin (A), uracil (U),

cytosin (C) og guanin(G) baser. Disse tripletter kaldes for **kodons**. Et enkelt kodon koder for én specifik aminosyre, men flere kodons kan godt kode for samme aminosyre. Et **startkodon**, ofte med sekvensen AUG, koder for aminosyren methionin og beskriver, hvor i mRNA-sekvensen translationen skal begynde. Efter startkodonet afkodes mRNA-sekvensen kodon for kodon uden overlap eller mellemrum, indtil ribosomet møder et **stopkodon** (UAA, UAG eller UGA), der markerer translationens afslutning. I modsætning til alle andre slags kodons, så koder stopkodon IKKE for en aminosyre. Oversættelsen af kodons til aminosyrer betegnes **den genetiske kode**. Hvilke aminosyrer de forskellige kodons svarer til kan ses på Figur 4.



Figur 4: Den genetiske kode. Figuren viser, hvilke aminosyrer som de forskellige kodons koder for. For at finde ud af hvilken aminosyre ens kodon svarer til starter man på midten, Man følger herefter de nukleotider, der findes i ens kodon, hvis man f.eks. 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 kodonet GAG koder for aminosyren Glu (E). Du kan nu selv prøve med kodonet AGU. Startkodon er AUG, hvilket også er angivet med en sort pil. Slutkodons er UAA, UAG og UGA. Dette er anvist med sorte prikker. Billede hentet fra Wikipedia (Robert Kohlmann).

Translationen sker primært ved hjælp af transfer-RNA og ribosomer.

**Transfer-RNA (tRNA)** kobler mRNA-kodons sammen med 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. Det vil sige at tRNA'et altså er det modsatte kodon end det, der er på mRNA'et f.eks. hvis mRNA'ets kodon er CCG så er tRNA'et GGC, se Figur 5. 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 genkender én eller få kodons og bringer herefter den matchende aminosyre til den voksende polypeptidkæde.

**Ribosomerne** er de strukturer, hvor i 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 binder aminosyrerne sammen og skaber en kæde.



Translationen kan inddeles i samme 3 faser som transskriptionen: Initiering, elongering og terminering. Den overordnede proces kan ses på Figur 5.

### Ribosomal 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 gå i gang.

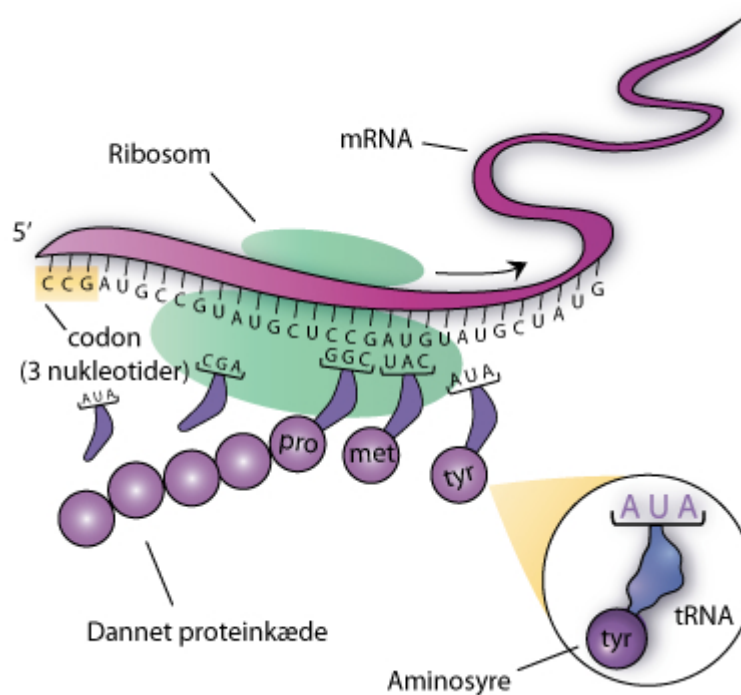
### Ribosomal elongering

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 polypeptidet, som sidder i ribosomet. Herefter mister den naboliggende tRNA sin aminosyre, og dette tRNA frigøres og skubbes ud af ribosomet. Det tRNA, som sidder tilbage, og nu har en ekstra aminosyre, er klar til at give den voksende kæde videre til det næste tRNA, der binder til åbningspositionen i ribosomet.

### Ribosomal terminering

I 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 tRNA'et, og den kan herefter løsrive sig fra ribosomet. Herefter er translationen afsluttet. Efter translationens afslutning kan polypeptidet stadig mangle at gennemgå forskellige slags modifikationer, før det er foldet til et funktionelt protein. Det skal f.eks. ofte sendes et andet sted hen 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>.



Figur 5: Translationen hvor protein dannes fra mRNA. tRNA baseparrer til det næste ledige codon på mRNA-strengen. tRNA'et indsætter dermed den passende aminosyre i den voksende aminosyrekæde, der bliver det nye protein.

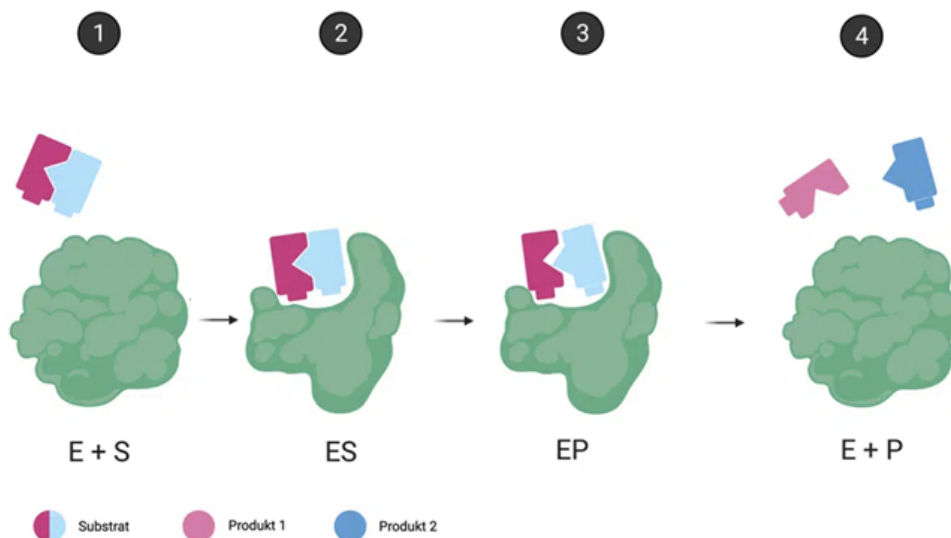


## Enzymer – struktur og funktion

Der findes som sagt utroligt mange slags proteiner, der alle spiller en vigtig funktion i biologiske systemer. Enzymer er en af disse grupper af proteiner. Ordet ”enzym” betyder ”i gær” og kommer af, at gær hedder zymos på latin. Enzymer blev nemlig, som navnet tyder på, første gang opdaget i gærceller. I dag ved man dog, at der findes enzymer i alle levende celler. Enzymer er **biologiske katalysatorer** for biokemiske processer i levende organismer. De kan både virke **intracellulært**; inden i cellen, eller **ekstracellulært**; udenfor cellen. Enzymer er essentielle for alt liv på Jorden, fordi de katalyserer reaktioner i cellers metabolisme, der ellers ville være enormt langsomme. Nogle af reaktionerne ville tage op til flere millioner af år, hvis de skulle forløbe uden enzymeres tilstedeværelse. På den måde ville den biokemiske reaktion altså i praksis ikke finde sted. Dette betyder altså, at cellerne ville dø uden f.eks. de enzymer, der deltager i deres metabolisme også kaldet stofskifte.

Enzymer er enormt specifikke, når det kommer til, hvilke substrater de kan binde og dermed også, hvilke reaktioner de kan katalysere. 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 lokalt fysisk og kemisk miljø, der fremmer reaktionen. Dette gør enzymerne ved at binde til substratet via deres **aktive site** og reagere med dets reaktive funktionelle grupper. Når et substrat bindes til enzymet, vil der ske en ændring i de intramolekylære bindinger i enzymet. Disse ændringer i strukturen fremmer, at produktet af reaktionen kan dannes, se Figur 6. Selvom nogle ændringer forårsager større ændringer i hele enzymet, foregår de fleste i eller omkring det aktive site. Enzymer sænker derved **aktiveringsenergien** for reaktionen 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.



Figur 6: Enzym-aktiveret kemisk reaktion. Figuren viser, hvordan et enzym omdanner et substrat til to produkter. Forkortelserne er: Enzym (E), substrat (S), enzym-substrat kompleks (ES), enzym-produkt kompleks (EP), og produkt (P).

## Restriktionsenzymer

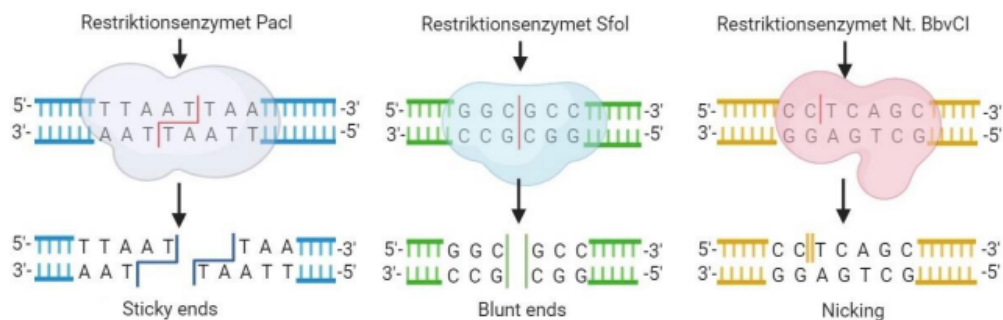
**Restriktionsenzymer** er en bred gruppe af enzymer, som kan klippe i dobbeltstretet DNA ved specifikke DNA-sekvenser. Det er yderst brugbart, når man vil modificere forskellige organismers DNA, og danner udgangspunkt for den kloningsmetode, vi kommer til at bruge under campen. Restriktionsenzymer benyttes af bakterier og arkæer som en form for forsvarsmekanisme mod

virusinfektioner. Virusinfektioner kan ramme mennesker, men de kan også ramme bakterier og arkæer. Vira som angriber bakterier, kaldes fager. Under et angreb fra en virus, bliver virussens DNA injiceret ind i en af værtsorganismes celler. Dette kan resultere i, at den injicerede celle dør. Dette vil værtsorganismen selvfølgelig helst undgå, og en måde at gøre det på, er ved at cellerne kan producere restriktionsenzym, der klipper virussens DNA-streng i stykker. Restriktionsenzymene genkender specifikke basesekvenser i det DNA, som de klipper i. Disse specifikke basesekvenser kaldes for restriktionsenzymets **genkendelsessites**. Disse genkendelsessites er ofte yderst præcise for hvert restriktionsenzym. Denne præcision er vigtig, da organismene, der benytter sig af restriktionsenzymene, skal være sikre på, at restriktionsenzymene ikke angriber organismens eget DNA. Hvis dette sker, kan det nemlig medføre celledød. Genkendelsessitesne er derfor unikke for de forskellige restriktionsenzym. Restriktionsenzymene kan derudover klippe DNA'et på forskellige måder. Disse klippemønstre kaldes for **sticky ends**, **blunt ends** og **nicks** (Figur 7).

Sticky ends er ender på DNA, hvor de to DNA-streng er skåret over forskudt. Dette medfører, at den ene DNA-streng er længere end den anden. Den lange ende kaldes ”**overhang**”. Overhangs kan sætte sig sammen med andre overhangs, men dette kan kun lade sig gøre, hvis DNA-sekvensen matcher hinanden korrekt (se eksemplet i Figur 8).

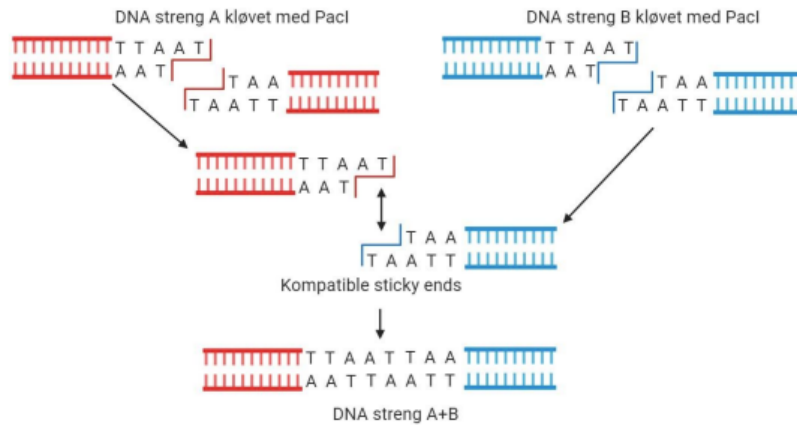
Blunt ends er ender på DNA-strengen, hvor begge streng er skåret over på samme sted. Blunt ends indeholder ingen overhangs og er derfor svære at gensplejse, da der ikke er kompatible sticky ends (Figur 7 7).

Nicking er resultatet af en overskæring af et restriktionsenzym, på kun den ene af de to DNA-streng (Figur 7).



Figur 7: Klippemønstre og genkendelsessites for tre forskellige restriktionsenzym. 1: Restriktionsenzymet Pacl genkender sekvensen TTAATTA, og dens klippemønster resulterer i DNA-ender med overhangs (sticky ends). 2: Restriktionsenzymet Sfol genkender sekvensen GGCGAA, og dens klippemønster resulterer i DNA med blunt ends. 3: Restriktionsenzymet Nt.BbvCI genkender sekvensen CCTCAGC, og dens klippemønster resulterer i DNA med et nicks mellem C og T i top strengen.

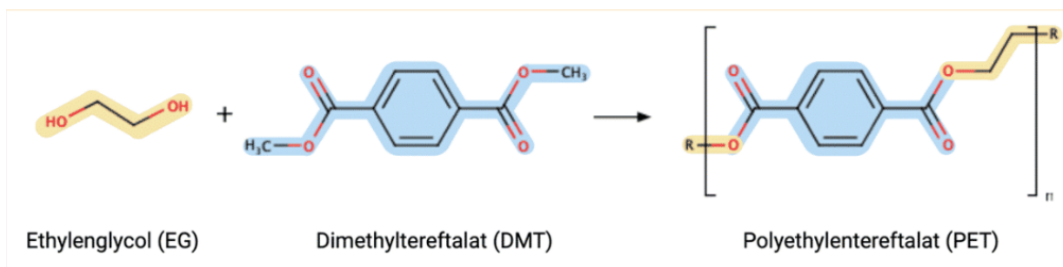
Overhangs kan blive brugt til at tilføje nye DNA-sekvenser til en værtsorganismes eksisterende DNA eller på et plasmid. Dette kan KUN lade sig gøre, hvis den nye DNA-sekvens har sticky ends, der matcher det specifikke overhang, som den nye sekvens skal tilføjes til. I eksemplet på Figur 8 er der to DNA-streng (streng A og streng B), der begge er blevet klippet med restriktionsenzymet Pacl. Da de to DNA-streng er blevet klippet med samme restriktionsenzym, har de kompatible sticky ends. Dette resulterer i, at de kan sætte sig sammen og danner DNA streng A+B, som er en kombination af de to streng. Restriktionsenzym er vigtige redskaber inden for bioteknologi og syntesebiologi, da de er pålidelige og lette at bruge. I kommer selv i løbet af uge til at gøre brug af restriktionsenzym og i får dermed lov til selv at bruge dem til at sætte DNA-sekvenser sammen.



Figur 8: Eksempel på genmanipulering med "sticky ends". Her har DNA streng A et overhang, der indeholder 5'-AT-3' og DNA streng B har et overensstemmende (komplementært) overhang 5'-TA-3'. Dette gør, at enderne kan klistre sig sammen, og derfor bliver disse overhangsne kaldt for "sticky ends".

### Plastiknedbrydende enzymer

Plastik er syntetiske polymerer, hvilket betyder, at de er skabt kunstigt af mennesker. Polymerer er store molekyler (makromolekyler), der er opbygget af mange af den samme mindre molekylenhed, kaldet monomerer. Polymererne dannes igennem polymerisationsreaktioner, der kæder de mindre monomerer sammen. På Figur 9 ses de to monomerer, der danner plasttypen PET.

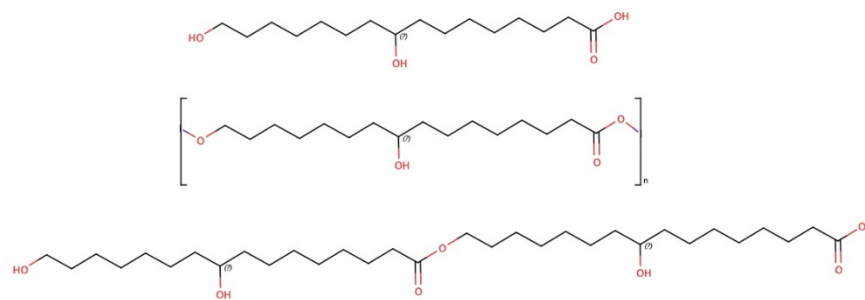


Figur 9: Plastiktypen PET, ofte kaldet polyester, dannes gennem polymerisationsreaktionen mellem EG og DMT. I illustrationen af PET betegner  $n$  antallet af monomere i den samlede polymer.

Afhængigt af den givne behandling som PET udsættes for, ligger polymererne enten i større eller mindre grad tilfældigt filtret ind i hinanden, eller velordnet i en krystallinsk struktur. Hvis PET-plastik i høj grad er uordnet kaldes det "amorf PET", og er gennemsigtigt. Ved fx ved opvarmning eller mekanisk stress, bliver plastikken mat, som polymererne falder på plads i en krystalstruktur.

Plastiknedbrydende enzymer er enzymer, der er i stand til at bryde den esterbinding, der binder monomererne i f.eks. PET sammen.

Fordi PET et syntetisk produkt af moderne industri, findes der ikke nogen organismer, der har tilpasset sig til at bruge det som substrat. Til gengæld findes der mange mikroorganismer, som har haft millioner af år til at specialisere sig i at nedbryde lignende, plantebaserede molekyler, i deres kamp for overlevelse. Cutin er et af disse PET-lignende molekyler, og et eksempel på dets struktur kan ses på Figur 10. Det er en voksagtig substans som findes i planters mest overfladiske celler, og er ligesom PET en hydrofob polyester. Monomererne i cutin udgøres af C16 og C18 organiske syrer (altså syrer med 16-18 kulstofmolekyler), forbundet med esterbindinger.



Figur 10: Eksempel på cutin-monomer. 9,16-dihydroxyhexadecansyre har to hydroxylgrupper, og en carboxylsyre, der alle tre udgør grupper, hvor der kan dannes bånd til lignende monomerer, gennem kondensationsreaktioner. Cutin består af forskellige C16 og C18 organiske syrer, som er forbundet ved esterbånd.

Gennem naturlig selektion, har en række mikroorganismer udviklet enzymer, der kan nedbryde voksener, der sidder tilbage på fx nedfaldsblade, -kviste, og -frugter. Et af disse enzymer, kaldet leaf-branch compost cutinase (på dansk: blad-kvist kompost cutinase), forkortet LCC, blev isoleret i 2012, af en gruppe forskere ved Universitetet i Osaka, i Japan<sup>1</sup>. Fordi ester-bindingerne i cutin minder om esterbindingerne i PET, kan enzymet binde og kløve bindingerne i PET, selvom det ikke er enzymets naturlige substrat.

LCC-enzymet blev isoleret fra et metagenomstudie (altså et studie af alt tilstedeværende DNA i en prøve, i det tilfælde indsamlet fra en kompostbunke), og derfor ved man ikke fra hvilken organisme enzymet oprindeligt stammer, hvorfor man fortsat blot refererer til det, som LCC.

Historien slutter dog ikke her, for i 2020 lykkedes det en gruppe franske forskere at modificere enzymet, så er blevet mere termostabilt, altså enzymets evne til at modstå strukturelle forandringer som følge af opvarmning<sup>2</sup>. Det resulterende enzym var et af flere muterede enzymer som blev skabt og testet, og den bedste variant, kaldet LCC<sub>ICCG</sub> havde et smeltepunkt ( $T_m$ ) der var 9.3 °C højere end det naturlige enzym.

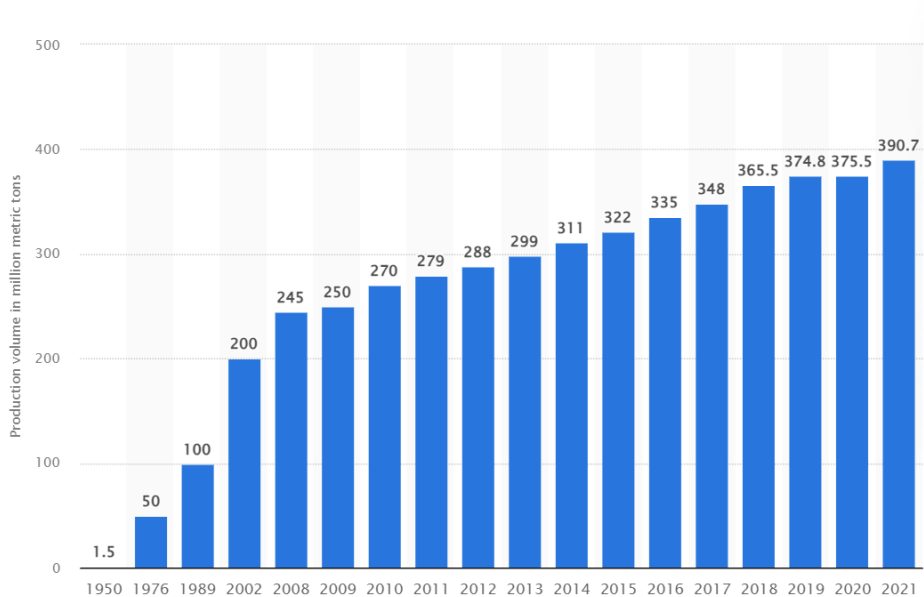
Dette var et enormt fremskridt, fordi PET er mere mobilt, når det er opvarmet. Enzymerne kan derfor lettere få adgang til polymerkæderne, og nedbryde plastikken. Desuden stiger enzymernes aktivitetsniveau – deres katalytiske rate – når temperaturen øges, hvilket betyder at de udfører flere reaktioner i sekundet. Dette gælder dog kun til en vis temperatur, hvorefter hhv. PET begynder at krystalliserer og polymerkæderne derfor bliver mindre tilgængelige for enzymerne, og enzymerne selv bliver ”kogt” og denaturerer (altså mister deres struktur og derfor deres katalytiske egenskab).

Med den optimerede version af LCC, LCC<sub>ICCG</sub>, lykkedes det den franske gruppe at nedbryde PET med 90 procents effektivitet på ca. 10 timer, et resultat fuldstændigt uden sidestykke indtil. Det resulterende

<sup>1</sup> Sulaiman, S., Yamato, S., Kanaya, E., Kim, J.-J., Koga, Y., Takano, K., & Kanaya, S. (2012). Isolation of a Novel Cutinase Homolog with Polyethylene Terephthalate-Degrading Activity from Leaf-Branch Compost by Using a Metagenomic Approach. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(5), 1556–1562. <https://doi.org/10.1128/AEM.06725-11>

<sup>2</sup> Tournier, V., Topham, C. M., Gilles, A., David, B., Folgoas, C., Moya-Leclair, E., Kamionka, E., Desrousseaux, M.-L., Texier, H., Gavalda, S., Cot, M., Guémard, E., Dalibey, M., Nomme, J., Cioci, G., Barbe, S., Chateau, M., André, I., Duquesne, S., & Marty, A. (2020). An engineered PET depolymerase to break down and recycle plastic bottles. *Nature*, 580(7802), 216–219. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2149-4>

enzym udgør et fantastisk værktøj i arbejdet om at genbruge de 390 mio. tons plastik som bliver produceret årligt, se Figur 11. Hvis denne teknologi implementeres korrekt, åbner det endda for muligheden for på sigt helt at stoppe med at producere ny plastik, og i stedet bare nedbryde og gendanne det, der allerede eksisterer!



Figur 11: Årlig plastikproduktion fra 1950-2021, målt i mio. tons. Produktionen af plastik er steget enormt siden teknologien blev kommercialiseret i 70'erne. I dag er den årlige produktion af plastic steget til næsten 400 mio tons.

## Tags

Når man arbejder med genmodificering, kan det, der kaldes proteintags være et brugbart hjælpemiddel, når ens protein f.eks. skal oprenses, eller når det skal detekteres. **Proteintags** er små peptidkæder, der introduceres i den ene ende af det ønskede protein<sup>4</sup>. Proteintags er altså et genteknologisk værktøj, der kan gøre livet lettere for molekylærbiologer. Proteintags kan som udgangspunkt introduceres i både C-terminalen og N-terminalen af et protein, men ikke alle typer af proteintags kan introduceres begge steder<sup>5</sup>. Det er derfor vigtigt at undersøge, hvor ens proteintags skal sidde, før man går i gang med at genmodificere sin ønskede værtsorganisme. Det ønskede protein og proteintagget vil efter translationen blive udtrykt som et **fusionsprotein**. Det vil sige et protein, der består af mindst to kodende gener, der bliver translateret som en samlet enhed, altså et samlet protein<sup>6</sup>. Fusionsproteinet vil på den måde få den brugbare egenskab proteintagget (fx være lettere at oprense), men vil stadig have samme funktion som det valgte protein havde.

I dette års camp kommer du til at arbejde med det der kaldes et **affinitetsproteintag**. Det vil sige et proteintag, der er god til at binde til et bestemt kemisk stof. I dette tilfælde kommer vi til at arbejde med det, der kaldes et poly-histidin tag også bare kaldet et His-tag. His-tagget består af en hale med 6-8 histidin aminosyrer. Denne hale gør, at fusionsproteinet kan oprenses i en såkaldt via immobilized metal-affinity chromatography (IMAC). I denne form for chromatografi benyttes overgangsmetallerne  $\text{Ni}^{2+}$  eller  $\text{Co}^{2+}$  til at binde proteiner med His-tag inden i en kolonne (et lille rør fyldt med små kugler, eller en gel), mens andre proteiner løber lige igennem. Når man er sikker på, at alle andre proteiner er skyllet ud af kolonnen, så kan man via imidazole frigive fusionsproteinerne med his-tagget fra kolonnen

<sup>3</sup> <https://www.statista.com/statistics/282732/global-production-of-plastics-since-1950/>, tilgået d. 28/8-2023.

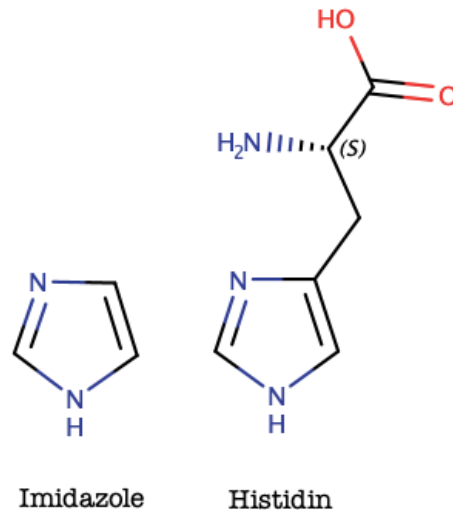
<sup>4</sup> <https://info.gbiosciences.com/blog/bid/198500/8-protein-tags-explained>

<sup>5</sup> <https://www.sinobiological.com/resource/protein-review/protein-tag>

<sup>6</sup> <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123749840005659>

igen. På den måde kan man opnå en opløsning, der i princippet udelukkende består af det ønskede protein, og hvor alle andre proteiner er fjernet. I praksis skal man dog være glad, hvis ens opløsning er over 90% rent.

Histidin aminosyren og imidazole indeholder den samme type ringstruktur, se Figur 12. Dette gør, at både imidazole og histidin kan binde i nikkel- eller cobalt-komplekset inden i kolonnen. Når der tilsættes imidazole til kolonnen opstår der derfor en ligevægt inden i kolonnen mellem om histidin eller imidazole er bundet i kolonnen. Man kan dog forskyde denne ligevægt ved at tilsætte meget mere imidazole til kolonnen end proteinet med his-tagget. På den måde ender man i praksis med kun at have imidazole bundet i kolonnen og alt proteinet frigives<sup>7</sup>.



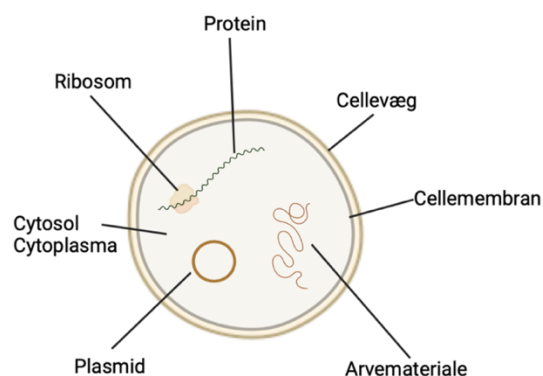
Figur 12: Den kemiske opbygning af imidazole og histidin. På billedet kan man se, at begge stoffer indeholder den samme ringstruktur.

<sup>7</sup> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2909483/>



## Bakterier

Bakterier er prokaryote celler, altså celler uden en cellekerne. Selvom bakterier kan være meget forskellige, har de den samme grundlæggende struktur (Figur 13). Alle bakterier bruger DNA til at gemme deres arvemateriale. Mange bakterier har det mest livsnødvendige DNA liggende på et stort cirkulært kromosom, men kan derudover også indeholde et eller flere mindre stykker cirkulært DNA, kaldet plasmider, som typisk har mindre essentielle gener, som kan være gode at have i særlige situationer.



Figur 13: Simple skitsering af en prokaryot celle. Kun de mest essentielle organeller er illustreret.

Prokaryoter adskiller sig særligt fra eukaryoter på et punkt: de har ingen cellekerne. Det betyder, at deres arvemateriale (DNA) ligger frit i cellens indre, der kaldes cytosolen.

Cytosolen er en væske, der hovedsageligt består af vand og opløste ioner, f.eks. salte, metaller og andre små molekyler og proteiner. Cytoplasma består af cytosolen men også af uopløselige cellekomponenter som f.eks. ribosomer, der som tidligere beskrevet er ansvarlige for proteinsyntesen.

Udenom cellen findes cellemembranen, der adskiller cellens indre fra det omkringliggende miljø. Cellemembranen er blandt andet 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 bakteriens formen. Cellevæggen er opbygget af lange kæder af peptidoglycan, som er en polymer opbygget af sukkerstof og aminosyrer. Man differentierer mellem gramnegative og grampositive bakterier på baggrund af deres cellevæg og cellemembrans opbygning.

## Bakterievækst

Mikroorganismers vækst kan beskrives med vækstmodellen, der ses på Figur 14. 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 gammelt/brugt vækstmedie til et friskt, og cellerne er derfor ved at 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 cellestørrelse, men den deler sig ikke endnu. Antallet af mikroorganismer vil dermed være konstant. Nølefasen kan variere i længde afhængigt af, hvor stor forskellen er mellem cellernes tidligere og nuværende vækstbetingelser.

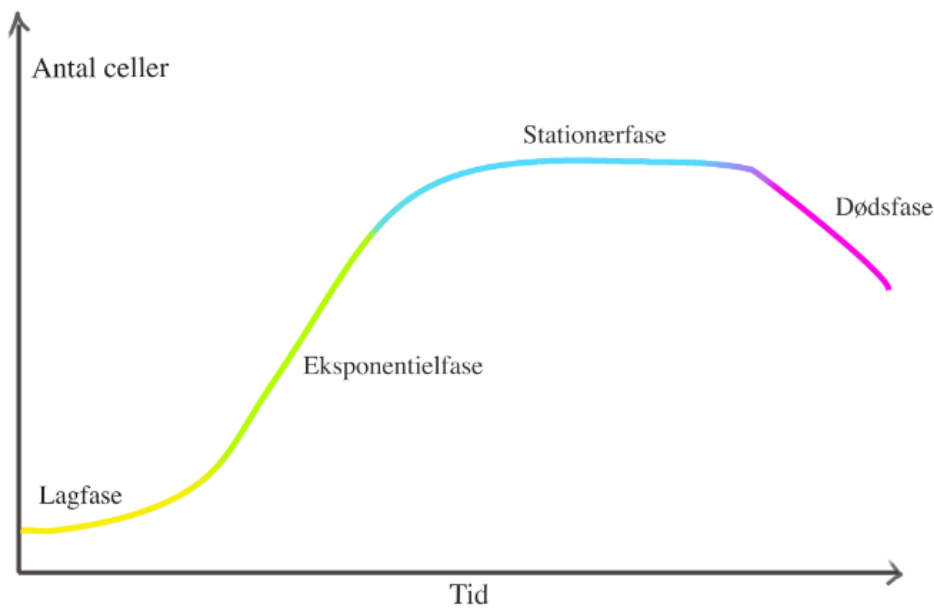
I **den eksponentielle fase** har cellerne vænnet sig til vækstbetingelserne, og de begynder at formere sig igennem celledeling. Antallet af mikroorganismer i denne fase er eksponentielt voksende, da en celle hele tiden deler sig i to. Tiden det tager for cellen at dele sig varierer alt efter typen. Bakterien *Escherichia coli* (*E. Coli*) har 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 eksponentiel 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 til at mikroorganismene deler sig yderligere. Der sker igen en omstrukturering af stofskiftet i mikroorganismene, og de begynder nu at syntetisere cellekomponenter forbundet med



overlevelse og stresshåndtering. Antallet af mikroorganismer vil være nogenlunde konstant, fordi antallet af nydannede celler er nogenlunde lig antallet af døende celler. Nogle af de mikroorganismer, der dør, vil sprænges ved cellelysering, dermed kan deres nedbrydningsstoffer udnyttes som næringsstoffer for 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.



Figur 14: Vækstmodellen for bakterielvækst. På modellen ses de 4 faser, der bruges til at beskrive bakterielvækst. Fase 1 er en tilvænningsfase inden vækst. Fase 2 er den eksponentielle vækstfase. Fase 3 er en stationær fase, hvor antallet af celle ikke ændres markant. Fase 4 angiver et stadie, hvor vækst ikke længere er muligt. Dette resulterer i at alle cellerne til sidst dør.

## Replikation i bakterier

Under en celledeling skal cellen kopiere sit DNA igennem replikation. Det kopierede DNA separeres efterfølgende, og de to DNA-kopier fordeler sig i de to datterceller, der arver den samme genetiske information som modercellen. DNA-replikation er **semikonservativt**, hvilket betyder, at hver af de to strenge i DNA-dobbelthelixen fungerer som en skabelon til syntesen af en ny komplementær streng. Når DNA-replikationen er færdig, er der to DNA-kopier, hvor hver ny DNA-kopis dobbelthelix har en "gammel DNA-streng" og en helt ny DNA-streng. Bakterier kopierer deres DNA meget hurtigt og der skal helst opstå meget få fejl/mutation. Derfor gør bakterier brug af forskellige proteiner, der arbejder sammen for at sikre, at DNA-replikation udføres så nøjagtigt som muligt. Det er disse proteiner, som dette afsnit kommer til at omhandle.

Før DNA'et i en bakterie kan blive kopieret, skal de to DNA-strengene adskilles fra hinanden. Denne proces, bruger specifikke enzymer kaldet **DNA-helikaser**. Disse enzymer binder til et kort segment i DNA'et. Segmentet, hvor DNA-helikasen binder, kaldes for "**Origin of replication**" (**ORI**), og her starter syntesen af ny DNA. DNA-helikase adskiller de to DNA-strengene fra hinanden, og der dannes to Y-formede strukturer, som kaldes for **replikationsgafler** (Figur 15). De to replikationsgafler udgør tilsammen et kompleks kaldet en **replikationsboble**. *E. coli* har, som de fleste bakterier, en enkelt ORI-sekvens på dets kromosom (se Figur 15). Denne DNA-sekvens har overvægt af A / T-basepar. A/T-basepar holdes sammen af færre hydrogenbindinger end G / C-basepar, hvilket gør DNA-strengene lettere at adskille. Dette kunne du også se på Figur 1, hvis du kigger godt efter. For at sikre, at de to adskilte DNA-strengene ikke genforenes og binder sig sammen, binder der sig i stedet 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 replikationsgaflerne er dannet, er DNA'et klar til at blive kopieret. Syntetiseringen af den nye DNA-streng bliver hovedsageligt udført af enzymer kaldet **DNA-polymeraser**. Disse enzymer tilføjer nukleotider til den voksende DNA-streng en efter en. Dette gør DNA-polymerasen ved at bruge den ene DNA-streng som skabelon. På den måde inkorporerer DNA-polymerase de nukleotider, der komplementerer skabelon DNA-strengen. Nukleotiderne bliver altid tilføjet til 3'-enden af DNA-strengen.

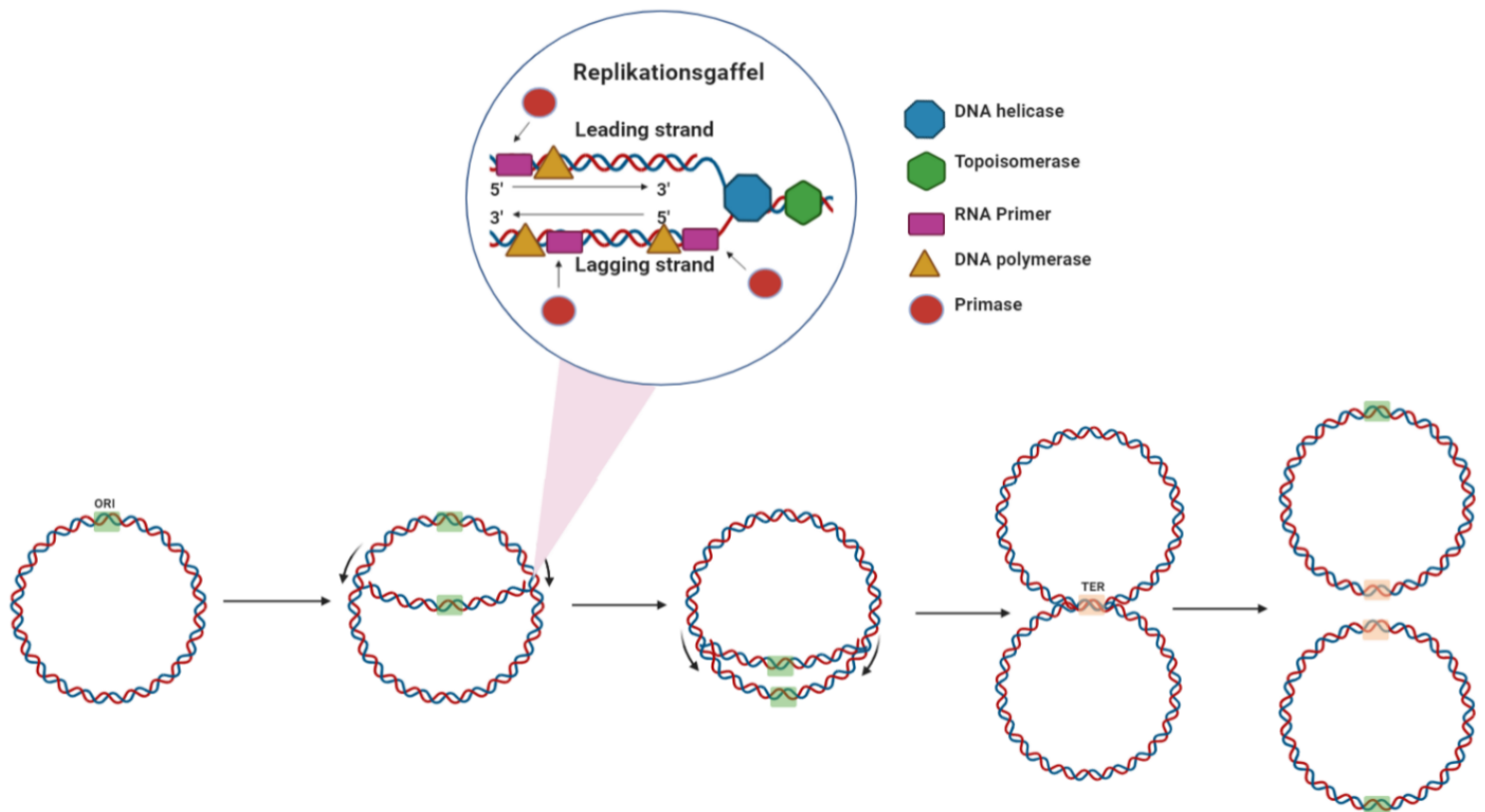
DNA-polymeraser kan ikke starte en ny DNA-streng fra bunden. I stedet kan de kun binde nye nukleotider til en allerede eksisterende streng. DNA-polymeraser har derfor brug for det, man kalder en primer. En **Primer** er et kort stykke RNA, der bliver sammensat af et enzym kaldet **primase**. Primerne sætter sig på skabelon DNA-strengen, så DNA-polymerasen har et sted at starte den nye DNA-streng. Primeren fjernes for DNA-strengen inden DNA-syntesen er færdig, og hullet, som den efterlader, udfyldes af DNA-polymerase (Figur 15).

Det er 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 løber fra 5' til 3' mod replikationsgaflen, er den lette. Strengen kan nemlig her fremstilles kontinuerligt, fordi DNA-polymerasen bevæger sig i samme retning som replikationsgaflen. Denne kontinuerligt syntetiserede streng kaldes for **leading strand**. Den anden streng, der løber fra 5' til 3' væk fra replikationsgaflen, er vanskeligere (Figur 15). Denne streng bliver fremstillet i fragmenter, fordi DNA-polymerasen bevæger sig væk fra replikationsgaflen. Det betyder, at DNA-polymerasen skal genmonteres på det nyligt eksponerede DNA, som replikationsgaflen har efterladt sig. Denne vanskelige streng, der er lavet i fragmenter, kaldes for **lagging strand** (Figur 15). 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.

DNA-replikationen afsluttes, når de to modsat orienterede replikationsgaffler mødes og smelter sammen. På den måde skabes to separate og komplette dobbeltstrengede DNA-molekyler. I cirkulære bakteriekromosomer (plasmider) afslutter DNA-replikationen oftest i et område, der kaldes **terminusregionen (TER)**.



Figur 15: 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 i det originale kromosom. DNA-polymerasen sørger for at syntetisere den anden streng ved hjælp af primerne fra primasen. Replikationen starter i ORI, og den slutter i TER regionerne på kromosomet.

## Kompetente celler

En celledens kompetence beskriver dens evne og villighed til at optage fremmed DNA fra dens omgivelser. Processen, hvor fremmed DNA optages i en værtcelle, kaldes for transformation. Transformationer kan forekomme spontant i naturen, og det sker, at bakterier optager fremmed DNA og inkorporere det i dens genom eller optager det som et plasmid. Denne form for deling af genetisk materiale kaldes for horisontal genoverførsel.

Man kan dog ikke regne med, at der spontant vil ske en transformation, hvis man blot blander celler med DNA. Man har derfor udviklet en metode, som garanterer at en succesfuld transformation kan finde sted. Kompetente celler er celler, hvis cellemembran er blevet gjort modtagelig for overførelsen af fremmed DNA. Cellerne kan blive kompetente ved, at man laver små porer i cellemembranen og neutralisere cellemembranens negative ladning. Du vil komme i løbet af ugen til at benytte dig af kemisk

kompetente celler, det vil sige celler, der er gjort kompetente ved hjælp af kemiske saltopløsninger. For at lave kemisk kompetente celler neutraliserer man først cellemembranens negative ladning med et saltbad. Efterfølgende udsættes cellerne for et varmekok, der skaber små porer i cellemembranen. Grunden til, at man først neutraliserer cellemembranens negative ladning, er for at facilitere fæstningen af plasmidet (som jo er DNA og derfor negativt ladet) på ydersiden af cellen. Den kemiske saltopløsning, som man bruger til dette i første trin, er saltet kalciumklorid. For at få DNA'et ind i cellens cytosol, udsætter man cellerne i andet trin for et varmekok, der resulterer i små porer i cellens membran. Disse porer er store nok til, at plasmiderne kan blive transporteret gennem cellemembranen og komme ind i cellens cytosol. Når plasmidet er inden i cellen, så kan den udtrykke plasmidets gener. På den måde har den kemiske kompetente celle nu optaget nyt genetisk materiale, og det nye genetiske materiale bidrager nu med nye egenskaber til cellen.

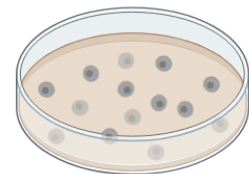
## Vækstmedie

Før at bakterierne kan gro, skal man sørge for, at de har de rigtige vækstforhold. Bakterierne har brug for organiske stoffer, som f.eks. simple kulhydrater, mineraler og salt for at kunne vokse. Hvis man blander disse stoffer i de rette mængder, kan man producere et **vækstmedie**. Der findes mange forskellige vækstmedier med forskelligt indhold og forskellige forhold af indholdsstoffer. Dette skyldes, at det ideelle vækstmedie er forskelligt for forskellige organismer og til forskellige formål.

Når celler podes til (tilsættes) et flydende vækstmedie, vil cellerne gro nede i væsken. Alternativt kan man tilsætte 15 g/L agar når man blander sit vækstmedie, og støbe det til et fast medie. Når agar varmes op over 85 °C, smelter det og bliver flydende. Agar størkner ved igen ved 32-40 °C så inden da skal man hælde blandingen i en petriskål.



Agar plade uden kolonier



Agar plade med kolonier

Figur 16: Agarplader med og uden vækst.

Petriskåle, der indeholder et fast vækstmedie 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 lige op ad hinanden (Figur 16). Alle cellerne i en koloni antages altså at være genetisk identiske. Det er vigtigt at kunne sprede cellerne rigtigt ud på en agarplade, så hver enkelt koloni kan tælles.

## Selektion af bakterier

Der findes mange mikroorganismer i luften, der kan falde ned på en agarplade og kontaminere den, mens den står uden låg (eller hvis man sidder og snakker når man plader ud). Der findes forskellige metoder, hvorpå man kan sikre sig, at det kun er den bakterie man arbejder med, som gror 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. Her tilsætter man antibiotika til sin flydende agarblanding. Det betyder, at når man udplader sin bakterie med antibiotikaresistensgenet, så vil den gro, mens bakterier uden antibiotikaresistens vil blive hæmmet af antibiotikaen. Dette er også en god måde at se om ens transformation er lykket, da bakterier, der f.eks. ikke har optaget et plasmid med antibiotikaresistens ikke vil kunne gro på agaren. En selektionsmarkør kan også være et farveprotein, hvorved ens bakterie på den måde adskiller sig fra andre bakterier.
2. Agarpladen er selektiv. På denne type agar er det kun muligt for en specifik gruppe bakterier at gro. Dette skyldes, at petriskålens vækstmedie har et særligt fordelagtigt næringsindhold til

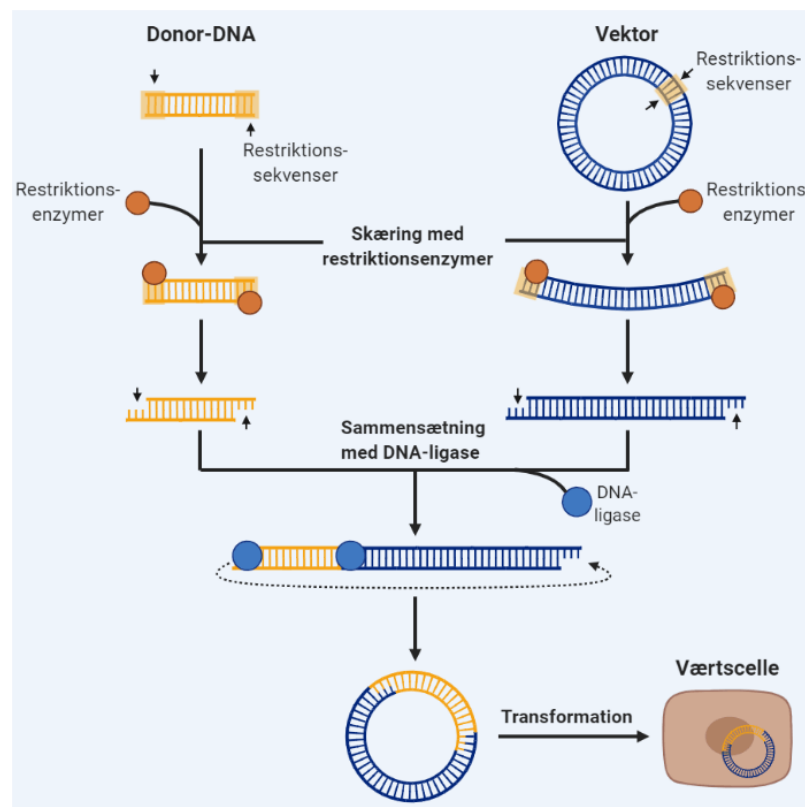
denne gruppe, mens det hæmmer andre gruppers vækst. Et eksempel på dette kunne være at tilsætte galde til agar, som derved selekterer for tarmbakterier som *E. coli*.

## Cellefabrikker

Syntesebiologi er kunsten at opfinde nye biologiske funktioner, ud fra det væld af genetiske elementer man har opdaget igennem de seneste 50 år. En af de meget praktiske, men også vigtige anvendelser er det vi kalder cellefabrikker: mikroorganismer, der er optimeret til at producere et ønsket produkt (fx et enzym, som i dette projekt).

Cellefabrikker kan overordnet inddeles i naturlige producenter eller gensplejsede (ikke-naturlige) producenter. Produkterne spænder bredt og kan være alt fra relativt store molekyler (enzym, antistoffer, insulin) til små organiske molekyler som syrer, alkoholer, etc., der bruges som råstof i andre produktioner. Det er også vigtigt at bemærke, at mange forskellige slags organismer kan udvikles til cellefabrikker, ikke kun prokaryoter. Også mammale (pattedyr) celler, skimmelsvampe, og forskellige arkæer kan bruges i bioteknologisk produktion.

Naturlige producenter er producenter, der naturligt producerer det ønskede produkt. Naturlige producenter er dog ofte langt fra tilpasset livet i en fermenteringstank. Dette kan gå hen og blive et problem, når produktet skal produceres i store mængder i industrien. Man kan dog ofte omgå dette problem, enten gennem gentagen selektion af produktionsorganismen (forædling), eller tilpasning af produktionsforholdene (ændre form, størrelse, eller andre parametre), så forholdene er mere passende til organismens behov.



Figur 17: Princippet bag gensplejsning. Ved gensplejsning bruges en donor, en vært og en vektor: Donoren er den organisme, som leverer det pågældende gen, værten er den organisme, som modtager det pågældende gen, og vektoren er den bærer, der bringer donor-DNA'et til værtscellen. Vektoren er typisk et plasmid, dvs. et lille, cirkulært DNA-molekyle. Donor-DNA og plasmid klippes med et restriktionsenzym, hvorefter de klistres sammen igen med DNA-ligasen. Ved transformation overføres vektoren, og dermed genet, til værtscellen.

En mere direkte metode er at benytte gensplejsede producenter, der er genetisk modificeret, så de kan producere det ønskede produkt meget effektivt. Ofte er de modificeret ad flere omgange, hvorefter de tilegner flere og flere gunstige egenskaber, i at producere et givent produkt.

Gensplejsede producenter har fået indsat et eller flere fremmede (heterologe) gener i deres genom, eller på et plasmid, der er mindre stykker selvstændigt replikerende DNA. For at få det ønskede produkt, indsætter et eller flere gener, som stammer fra andre organismer, der naturligt kan producere produktet. Ofte optimerer man desuden producenten genetisk, ved fx at indsætte eller fjerne gener, som gør dem til mere effektive producenter, men ikke direkte er genet/generne for produktet. Dette kunne være ved at slette gener som kun skal bruges i deres naturlige miljø (forsvar, robusthed), men som er overflødige i det beskyttede miljø i en fermenteringstank, eller en stærkere promotor for genet, fra en helt tredje organisme (fx fra fager, som har nogle ekstremt kraftige promotere). På Figur 17 kan man se en opsummering af gensplejsningsprocessen. Her sættes et fremmed gen ind i en vektor, som overføres til værtscellen via transformation.

Cellefabrikker er et vigtigt industrielt værktøj, og der er derfor stort fokus på, hvordan man kan optimere cellefabrikkerne. For at en cellefabrik kan komme i betragtning til at blive brugt i en produktion, er der mange krav, som den skal leve op til. Den skal f.eks. være nem at dyrke, have et godt udbytte af en god kvalitet, være billig i drift og gerne være nem at genmodificere. Optimering af cellefabrikker er omstændigt arbejde og foregår i en cyklisk proces, hvor man hele tiden må efterprøve sine ændringer (optimeringen) i praksis.

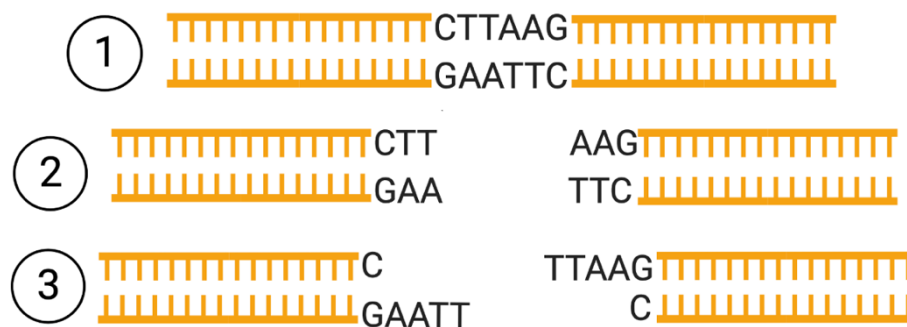
Hvis du vil vide mere om cellefabrikker, så kan du finde yderligere information i linket nedenfor:

<https://www.biotechacademy.dk/undervisning/gymnasiale-projekter/fermenteringsteknologi/cellefabrikker/>

## Metoder i laboratoriet

### Restriktionsenzymkloning

På Campen skal vi i år 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 ved en bestemt DNA-sekvens. Der findes som tidligere beskrevet restriktionsenzymer, der laver ”blunt cuts”, hvor begge DNA-strengene skæres i samme position, ”sticky ends”, som også kaldes overhangs, hvor DNA-strengene skæres forskudt, se Figur 18.

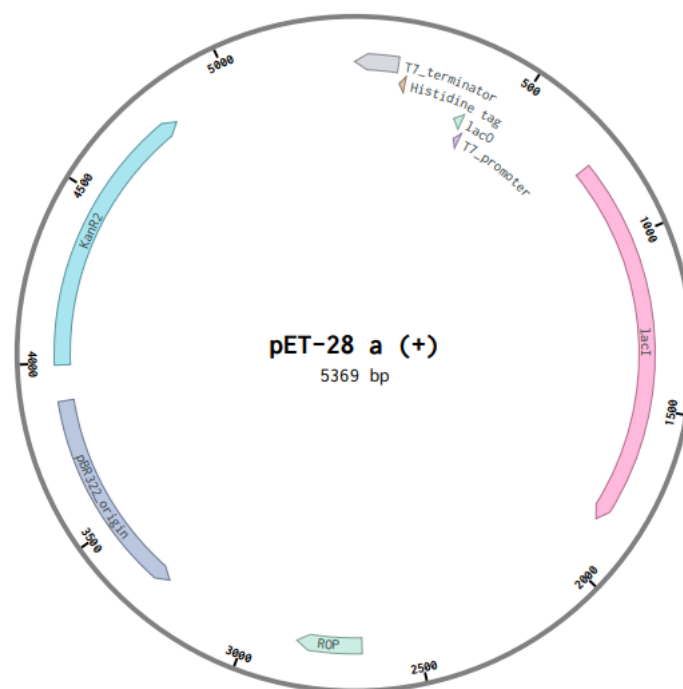


Figur 18: Restriktionsenzymer kan klippe i DNA-sekvenser på forskellige måder. (1) Den oprindelige DNA-sekvens. (2) Blunt ends lavet af et restriktionsenzym. (3) Sticky ends (overhangs) lavet af et restriktionsenzym.

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. Dette gælder også selvom det f.eks. er humant og bakterielt DNA, der blandes. Man kan desuden gøre brug af DNA-ligase, som katalyserer dannelse af kovalente fosfodiesterbindinger mellem de to rekombinante DNA-sekvenser, for på den måde at ”reparere DNA’et”. Dette forøger ofte effektiviteten af kloningsproceduren.

DNA’et skal efterfølgende opformeres, hvilket kan gøres i en værtsorganisme f.eks. *E. coli* eller ved brug af PCR. PCR-teknikken beskrives senere i dette afsnit. Herefter kan DNA’et overføres til den ønskede organisme. Denne proces kaldes **transformation**, og kræver at værtscellerne er gjort ”**kompetente**”, det vil sige, at cellerne, som beskrevet, er gjort modtagelige for DNA ved fx at svække cellemembranen. Det er vigtigt at disse kompetente celler hele tiden holdes så kolde som muligt for at sikre, at cellemembranen ikke repareres. Når både de kompetente celler og det rekombinante DNA er klar, skal de to komponenter blandes. Selve transformationen kan foregå ved at give cellerne enten et heatshock eller et elektrochok, hvorefter cellerne skal gro ud i et vækstmedie. Efterfølgende er det vigtigt, at man sikrer sig, at de rette gener er overført til organismen. Dette kan man gøre ved f.eks. at bruge selektive plader.

Vi kommer til at benytte os af en standardvektor, der hedder pET28a, en såkaldt ekspressionvektor, som ofte bruges til at udtrykke heterologe proteiner i *E. coli*. Den indeholder et multiple kloningsite (MCS), hvor restriktionsenzymene XhoI og NcoI klipper og danner sticky ends. Derudover indeholder den flere resistansmarkører til selektion samt en His-tag-sekvens ved siden af MCS. Desuden indeholder den også en T7-promotor, der er en stærk promotor, som sikrer høj transkription af ens gene of interest (GOI). Afslutningsvis indeholder plasmidet selvfølgelig en origin of replication (ori), så plasmidet kan reproducere i *E. coli*. Nedenfor på Figur 19 kan ses et kort over plasmidet vi bruger.



Figur 19: “Plasmid map”/plasmidoversigt over pET28a. Plasmiddet indeholder bl.a. et origin of replication, resistansmarkører, promotor, terminator, og koder for et His-tag lige inden terminatoren.



## 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 brugt som et vigtigt redskab til kloning og genmodificering.

PCR udnytter et af naturens egne enzymer, som også 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 **gene of interest (GOI)**. GOI er en lille 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. Det vil sige, at hvis man starter med 2 ens DNA-streng, så vil man efter første cyklus have 4 DNA-streng. Hvis man kører en PCR med 30 cyklusser, ender man derfor 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 af DNA'et i hver sin retning. DNA-polymerase bygger nemlig udelukkende nye 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 baseparer til startstedet på den ene streng, og den anden baseparer til den anden strengs startsted. Da strengene er modsatrettede, ligger den enes startsted automatisk samme sted som stopstedet på den modsatte streng (Figur 1).

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, se Figur 20, der har hver deres temperatur og varighed. De angivne temperaturer varierer efter hvilke primere, der anvendes.

#### 1. Opvarmning (denaturering af DNA)

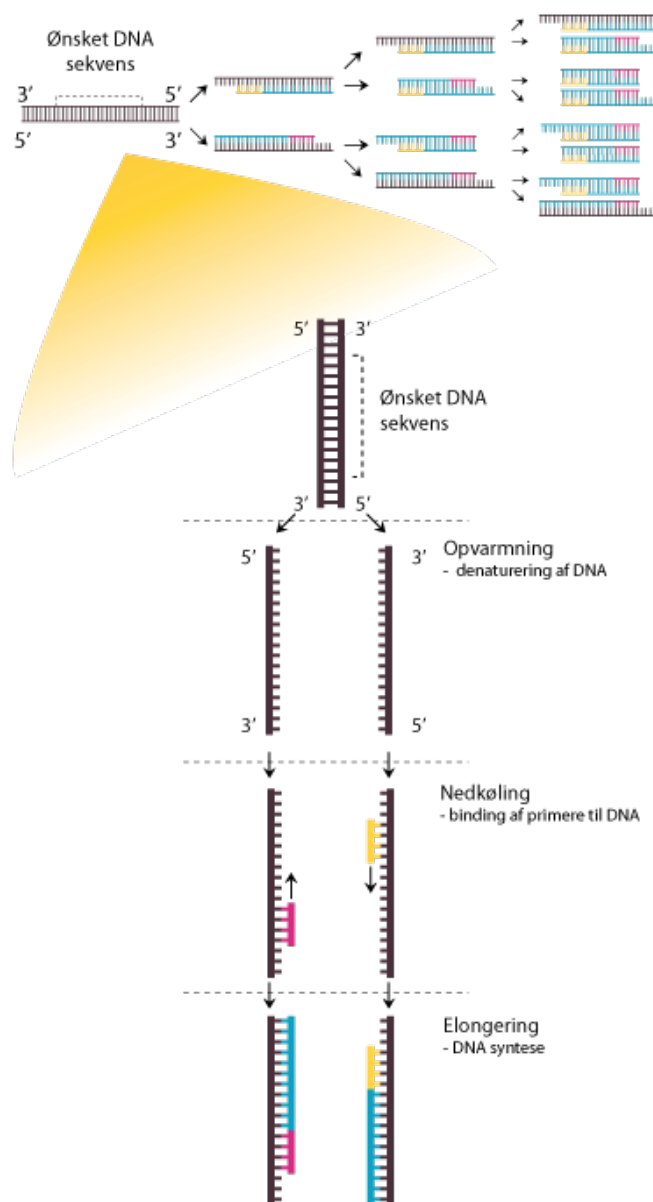
Det dobbeltstrengede DNA, der skal bruges som skabelon i reaktionen, skal først denatureres (adskilles) ved høj temperatur (ca. 95 °C) i nogle sekunder. Dette gør DNA'et enkeltstreng, så hver streng kan få bygget en ny komplementær streng senere i PCR-cyklussen.

#### 2. Nedkøling (binding af primere til DNA)

Temperaturen sænkes til omkring 60 °C (denne temperatur afhænger specifikt af de primere man bruger), hvor de tilsatte primere vil kunne binde til startstederne på det enkeltstrengede DNA.

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

Temperaturen hæves til 72 °C, hvor DNA-polymerase binder til primerne ved startstederne og bygger videre på de nye, komplementære DNA-streng. DNA-polymerasen fortsætter, så længe temperaturen ikke hæves, og så længe der stadig er skabelon-DNA til rådighed. Varigheden af trinnet beregnes derfor, så cyklussen 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 20: Opformering 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 enkeltstrengede DNA-streng.

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

## Colony PCR

Koloni PCR er en undertype af PCR-teknikken, der benytter PCR til at screene kolonier for tilstedeværelsen af et ønsket gen, også kaldet et insert. Til koloni-PCR udvælges en række kolonier, der ønskes undersøgt. Disse kolonier podes til rent sterilt vand. Dette kan man gøre ved hjælp af en tandstik eller en pipettespids. I koloni PCR er det vigtigt at lysere bakterierne inden PCR'en starter, da det er essentielt, at bakterierne frigiver DNA'et, så det kan opsplittes og primerene kan binde til det. Man kan lysere bakterierne ved at koge opløsningen med bakterierne, ved at indstille første trin af PCR'en til 95 °C i 3 minutter, hvilket vil resultere i god nedbrydning for de mest almindelige celsestammer. Efterfølgende kan PCR'en forløbe som beskrevet ovenfor og på den måde opformeres din kolonis genetiske materiale.

Efter PCR'en er fuldstændt kan man analysere PCR product via gelelektroforese. Hvordan din gel kommer til at se ud, for henholdsvis positive og negative kolonier, afhænger af, hvilken en type af primere, man har brugt til PCR'en. Vi kommer til at bruge primere, der targeter vores gene of interest.

## Gelelektroforese

Gelelektroforese er en teknik, hvorved man kan separere og identificere forskellige DNA-streng 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 en DNA-sekvens med 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 stammer 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. Da alt DNA har samme ladning-til-masse-forhold, så vil de korteste DNA-streng rejse længst igennem gelen, da de møder mindre modstand gennem gelen. Dette kan dermed bruges til at skelnes mellem store og små DNA-fragmenter, da store stykker ikke vil løbe så langt som mindre stykker.

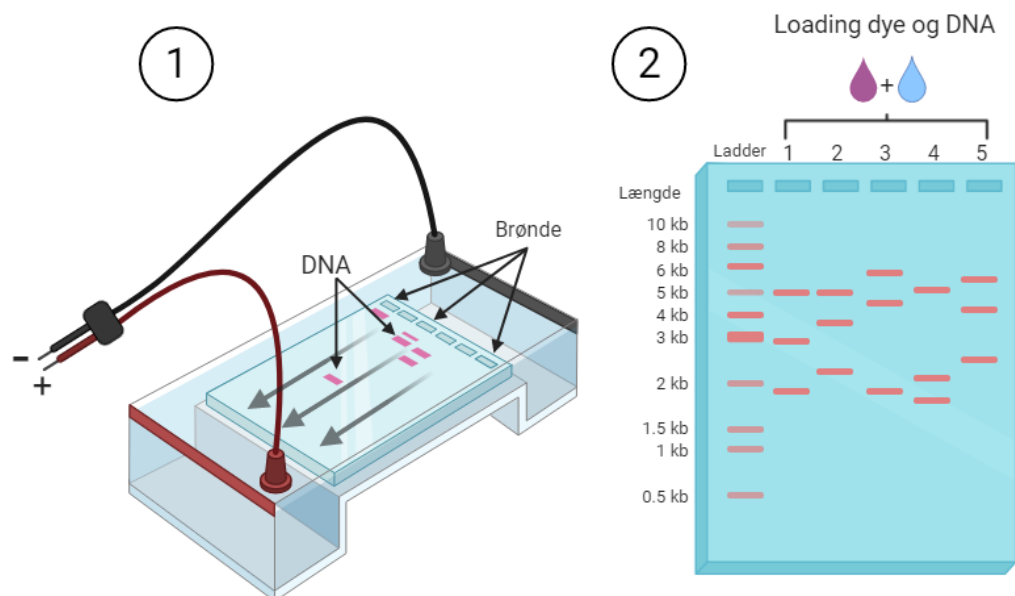
## Opsæt en gel

Der indgår syv komponenter i en gelelektroforese: DNA, en gel, et elektroforesekammer 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**, som I måske husker fra agarplader, der blandes sammen med 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 elektroforesekammer, hvorefter en **bufferopløsning** hældes ned i elektroforesekammeret, 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 21.1).
3. De ellers usynlige DNA-fragmenter bliver 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 fordybninger, kaldet brønde, der er placeret i den ene ende af gelen. Glycerinen, fra loading dye'en, 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 21.2). Da man kender længden på DNA-fragmenterne i DNA-ladder, kan man sammenligne de resulterende bånd fra DNA-prøve med båndene fra DNA-ladder og dermed få et godt overblik over hvor lange DNA-fragmenterne er.

5. Efter at vores DNA-prøve og DNA-ladder er tilføjet til brøndene, starter man gelelektroforesen 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 et 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. Efter at gelelektroforesen er gennemført, kan man ved hjælp af UV-lys se DNA'et som små bånd på gelen (Figur 21.2). 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 21 : Gel elektroforese. (1) Gelen ligger nedsunken i en 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 loading dye og DNA i de resterende brønde. Efter at gele er kørt kan man se, hvordan DNA-fragmenterne har bevæget sig ved hjælp af UV-lys. I brønden til venstre er DNA-ladder, hvor længderne på DNA-fragmenterne er kendt. Ved at sammenligne med DNA-ladder kan man se, hvor lange DNA-fragmenterne er i prøverne, der er i brøndene navngivet 1-5. Hvor lange er fragmenterne f.eks. cirka i brønd 4?

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

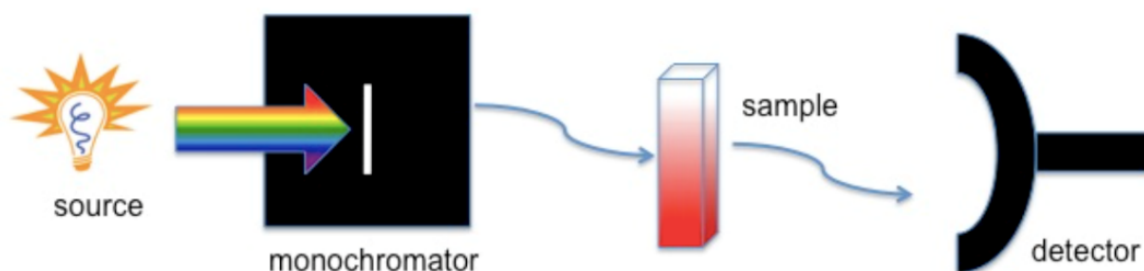
## UV-VIS- Spektroskopi

Ultraviolet-Visible-Spektroskopi benyttes til at fremstille en absorbanskurve for et opløst eller fast stof. Metoden er baseret på stoffets evne til at absorbere lys med en bølglængde på mellem 200-800 nm. Dette svarer til bølglængder, der ligger mellem ultravioletlys og synligt rødt lys<sup>8,9</sup>. Spektrofotometeret måler, hvor stor en del af den elektromagnetiske stråling ved en bestemt bølglængde, der absorberes, når elektroner i det kemiske stof exciteres. Afhængigt af elektronkonfigurationen af de kemiske stoffer kræver det fotoner med forskellig energi at excitere elektronen fra sin grundtilstand til den exciterede tilstand. Absorbansen kan beskrives via Lambert-Beers lov.

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \epsilon_{\lambda} \cdot b \cdot c$$

A er absorbansen,  $I_0$  er den målte lysintensitet i opløsningsmidlet, I er den målte lysintensitet af farvestoffet. Det vil sige den målte lysintensitet efter at lyset har passeret igennem prøven. b er kuvettebredden, c er koncentrationen og  $\epsilon_{\lambda}$  ekstinktionskoefficienten.

Et spektrofotometer er opbygget af en lyskilde, monokromator og detektor, se Figur 22. Først udsender lyskilden lys, som derefter bliver splittet til monokromatisk lys af en monokromator. Dette gøres, for at prøven kan undersøges for absorption af helt specifikke bølglængder af lys<sup>10</sup>. Afslutningsvis, når prøven er blevet analyseret ved brug af det monokromatiske lys, kan detektoren måle intensiteten af det lys, der er blevet sendt igennem prøven, og som ikke er blevet absorberet. Detektoren kan på den måde måle, hvor meget af det monokromatiske lys, der er blevet absorberet af prøven. Hvor stor absorptionen er, afhænger, som tidligere fastsat, af koncentrationen af det kemiske stof, også kaldet absorber, i prøven.



Figur 22: Illustration af opbygningen af et spektrofotometer. På figuren ses det, at der er en lyskilde, men monokromator samt en detektor. Lyskilden bliver omdannet til monokromatisk lys i monokromatoren. Dette lys sendes igennem prøven og det resterende lys måles i detektoren [1].

Se eventuelt videoen nedenfor om spektrofotometri fra biostriben:

[https://www.biotechacademy.dk/e-](https://www.biotechacademy.dk/e-learning/biostriben/gymnasie/eksperimentelt_arbejde/#1516016845796-610a9b1c-64c2)

[learning/biostriben/gymnasie/eksperimentelt\\_arbejde/#1516016845796-610a9b1c-64c2](https://www.biotechacademy.dk/e-learning/biostriben/gymnasie/eksperimentelt_arbejde/#1516016845796-610a9b1c-64c2)

<sup>8</sup>[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical\\_Chemistry/Physical\\_Methods\\_in\\_Chemistry\\_and\\_Nano\\_Science\\_\(Barron\)/04%3A\\_Chemical\\_Speciation/4.04%3A\\_UV-Visible\\_Spectroscopy](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Physical_Methods_in_Chemistry_and_Nano_Science_(Barron)/04%3A_Chemical_Speciation/4.04%3A_UV-Visible_Spectroscopy)

<sup>9</sup> <https://tekhist.pastperfectonline.com/webobject/59FE97AC-1CA9-453A-95FA-500113335151>

<sup>10</sup> [file:///Users/amalieslangerupludvigsen/Downloads/MasterthesisKumiko%20\(3\).pdf](file:///Users/amalieslangerupludvigsen/Downloads/MasterthesisKumiko%20(3).pdf)

## Bradford proteinassay

Bradford proteinassayet er en metode, der bruges til at kvantificere mængden af proteiner i en prøve, fx en ukendt opløsning af enzymer, som under dette projekt. Den er baseret på de farveændringer der forekommer, når det specifikke farvestof, Coomassie Brilliant Blue G-250 reagerer med proteinerne i prøven<sup>11</sup>. Farvestoffet er rødt i sin protonerede form, altså når det er i en sur opløsning. Når det binder til proteiner gennem elektrostatiske og hydrofobe interaktioner, stabiliseres den deprotonerede form af molekylet, og det ændrer farve til blåviolet. De grundlæggende principper bag Bradford proteinassayet inkluderer følgende trin:

1. Proteinbinding: Når Bradford-reagenset tilsættes til prøven, binder det til proteinerne i prøven. Farvestoffet i Bradford-reagenset interagerer med aminosyrer i proteinerne, især arginin og lysin, hvilket resulterer i farveændringen. Denne farveændring er proportionel med mængden af protein i prøven, men varierer mellem forskellige typer af proteiner grundet forskelle i aminosyre-sammensætning.
2. Farvemåling: Efter at have ladet reaktionen mellem Bradford-reagenset og proteinerne foregår i et stykke tid (typisk 5-10 minutter), måles farveændringen ved en bestemt bølgelængde, normalt omkring 595 nanometer, ved hjælp af et spektrofotometer.
3. Kalibrering: For at kvantificere mængden af protein i prøven dannes en standardkurve ved at måle farveændringen for en række kendte koncentrationer af et protein (normalt bovint serumalbumin, BSA). Denne standardkurve bruges derefter til at bestemme den ukendte prøves proteinmængde ved at sammenligne dens farveændring med standardkurven.

Ved hjælp af standardkurven og målingen af den ukendte prøves farveændring kan man beregne prøvens proteinmængde i mikrogram eller milligram. Efterfølgende kan man derfra beregne koncentrationen, fordi man normalt kender voluminet af sin prøve.

Det er vigtigt at huske, at Bradford-assayet er en relativ metode, da den sammenligner den ukendte prøve med en standardkurve. Resultaterne kan påvirkes af flere faktorer: proteinets aminosyresammensætning og farvestoffets interaktion med urenheder i prøven. Derfor bør man normalt udføre dette assay meget omhyggeligt. Det vil sige oprense proteinet omhyggeligt inden og fjerne alle urenheder. Derudover er det en god ide at sammenligne resultaterne med andre proteinkvantificeringsmetoder for at bekræfte nøjagtigheden.

---

<sup>11</sup> Congdon, R. W., Muth, G. W., & Splittgerber, A. G. (1993). The binding interaction of Coomassie blue with proteins. *Analytical biochemistry*, 213(2), 407–413. <https://doi.org/10.1006/abio.1993.1439>