

# Teorikompendium - Biotech Academy Camp 2025

Velkommen til Biotech Academy Camp 2025!

I år kommer Biotech Academy Camp til at handle om genmodificering og hvordan det bruges i videnskaben og industrien. Dette kompendie skal introducere den nødvendige baggrundsviden og give et overblik over de bioteknologiske redskaber, som vi kommer til at bruge under 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, 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 Emily og Asger

## Indholdsfortegnelse

<b>Det genetiske udtryk .....</b>	<b>3</b>
<i>DNA .....</i>	<i>3</i>
<i>RNA.....</i>	<i>4</i>
<i>Proteiner.....</i>	<i>4</i>
<i>Enzymer.....</i>	<i>4</i>
<b>Det Centrale Dogme .....</b>	<b>6</b>
<i>Replikation: Fra DNA til DNA .....</i>	<i>7</i>
<i>Transskription: Fra DNA til RNA.....</i>	<i>9</i>
<i>Translation: Fra mRNA til polypeptid .....</i>	<i>10</i>
<b>Bakterier .....</b>	<b>11</b>
<i>Bakterievækst.....</i>	<i>12</i>
<b>Regulering af transskriptionen og gen ekspression .....</b>	<b>13</b>
<b>Metoder i laboratoriet .....</b>	<b>16</b>
<i>Restriktionsenzymkloning.....</i>	<i>17</i>
<i>Transformation og kompetente celler .....</i>	<i>18</i>
<i>Vækstmedier og selektionsplader.....</i>	<i>19</i>
<i>Polymerase Chain Reaction .....</i>	<i>19</i>
<i>Gelelektroferese .....</i>	<i>22</i>
<i>Protein oprensning ved HisTrap.....</i>	<i>23</i>
<i>SDS-page gel.....</i>	<i>24</i>

## Det genetiske udtryk

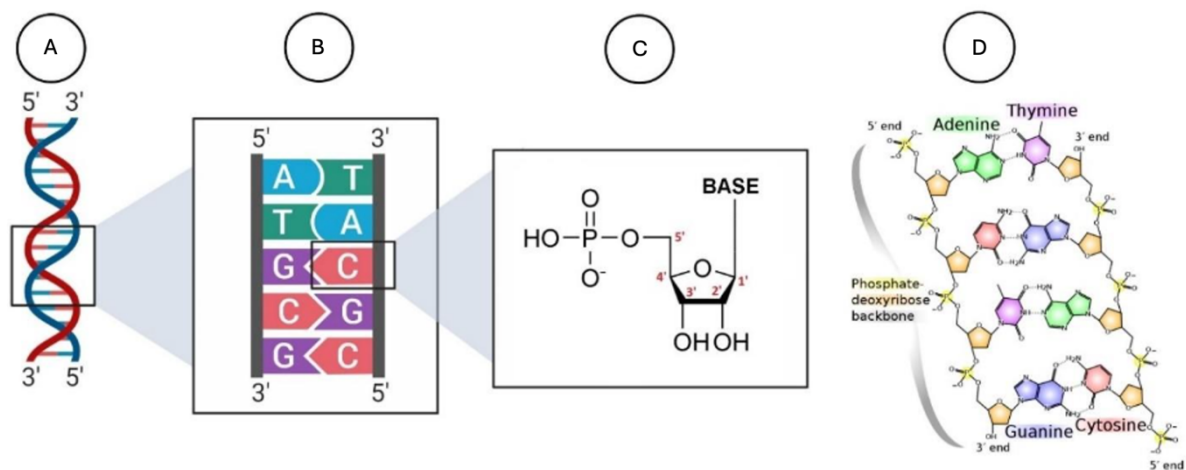
I moderne bioteknologisk produktion, der benytter genmodificerede organismer, er syntesebiologi uundværlig. Syntesebiologi er kombination af ingeniørvidenskab og biologi, der bruges til at designe og konstruere nye biologiske systemer eller dele, der ikke allerede findes i naturen. For at kunne forstå teorien bag syntesebiologi er det dog nødvendigt med en fundamental forståelse for DNA, RNA og proteiner, samt hvordan disse laves i celler. Disse tre komponenter vil du nemlig møde mange steder, når du gennemgår teorikompendiets emner.

## DNA

**DNA** (deoxyribonukleinsyre) bærer de genetiske instruktioner for udvikling, funktion og reproduktion i alle organismer og mange vira. Molekylet består af to strenge opbygget af nukleotider. Et nukleotid består af en fosfatgruppe, et deoxyribose-sukker og en base. Der findes fire baser i DNA, nemlig cytosin (C), guanin (G), adenin (A) og thymin (T) (Figur 1).

DNA-streng har en retning med en 5'-ende (med en fri fosfatgruppe) og en 3'-ende (med en fri hydroxylgruppe). Nukleotid har en fosfatgruppen, som stikker ud fra pentosesukkerets femte carbon atom, derfor navnet 5'-enden. På samme måde sidder der pentosesukkerets tredje carbon en hydroxylgruppe (-OH-gruppe), og denne ende hedder derfor 3'-enden. I 3'-enden skal der bindes den næste nukleotid. Nye nukleotider tilføjes altså kun ved 3'-enden, hvilket sker ved hjælp af enzymet DNA-polymerase under replikation, når der skal laves DNA i cellen.

DNA er en dobbelthelix og består af to strenge. Fosfat- og sukkermolekylerne danner en såkaldt backbone, som vender ud ad, mens baserne vender indad mod hinanden. Baserne på den ene streng binder sig med hydrogenbindinger til baserne på den anden streng via baseparring. Her danner C altid par med G, og A altid med T. Strengene løber antiparallelt, dvs. i modsatte retninger (Figur 1).



**Figur 1: DNA's opbygning.** A) dobbeltstrengt DNA. B) De to strenge sammenholdes af baseparring, hvor A og T bindes til hinanden og G og C bindes til hinanden, alt med hydrogenbindinger. C) DNA er opbygget af nukleotider, som består af en base (A, T, G eller C), samt et sukkermolekyle (deoxyribose) og en fosfat. D) Molekylernes opbygning af DNA. Figur modificeret fra Wikipedia (Madelaine Price Ball)

DNA er arvemateriale og er det der gives videre til næste generation af celler. I cellen er arvematerialet opbevaret og kaldet genomet. Hos eukaryoter ligger det som lineært, dobbeltstrengt DNA i cellekernen, tæt pakket og reguleret. Hos prokaryoter findes genomet som et cirkulært DNA i

cytoplasmaet, og ofte også i små cirkulære DNA-enheder kaldet plasmider, som vi vender tilbage til senere.

## RNA

RNA består, ligesom DNA, af en kæde af nukleotider, og det har utrolig mange forskellige funktioner i cellen. Der er tre hovedforskelle på opbygningen af DNA og RNA. 1) RNA er oftest enkeltstregnet og DNA dobbeltstregnet. 2) RNA indeholder basen uracil (U) i stedet for thymin (T). Og 3) suktermolekylet i RNA er ribose fremfor deoxyribose. 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 translationen.

## 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**, se figur 2. Der er 20 forskellige aminosyrer, der kan bruges til at lave et protein, og hver aminosyre har forskellig struktur og kemisk funktion. 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. Tilsammen er proteiner livsnødvendige for cellens overlevelse. Under årets camp kommer vi også til at arbejde med proteiner og enzymer.



*Figur 2: Opbygningen af proteiner. Den grundlæggende enhed i proteiners struktur er aminosyrer hvoraf, der findes 20. De sættes sammen til peptider (korte kæder) eller hele proteiner (længere kæder, typisk med en mere kompleks struktur og funktion) af ribosomet.*

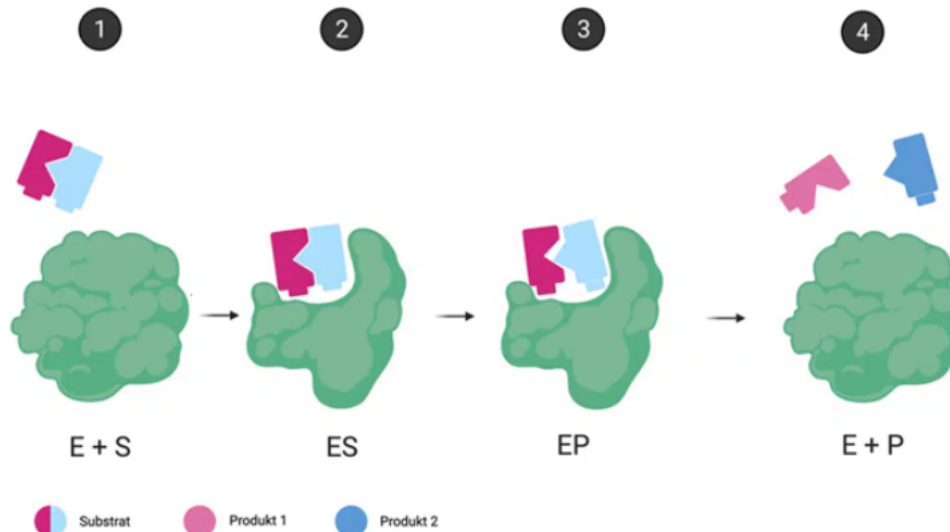
## Enzymer

**Enzymer** er en særlig gruppe proteiner, som fungerer som biologiske **katalysatorer** i alle levende celler. De blev først opdaget i gær, men findes i alle organismer. Enzymer er essentielle, fordi de katalyserer de kemiske reaktioner i cellernes metabolisme. Uden enzymer som katalysatorer ville reaktionerne foregå ekstremt langsomt, i nogle tilfælde først efter millioner af år. Uden enzymer ville celler derfor ikke kunne overleve.

Enzymer er meget specifikke for deres substrater og de reaktioner, de katalyserer. Et enzym kan kun katalysere en specifik reaktion. Som katalysatorer øger de reaktionshastigheden uden selv at blive forbrugt eller ændre reaktionens ligevægt. De virker ved at skabe et kemisk miljø i deres **aktive site**,

hvor substratet bindes. Bindningen af substrat ændrer enzymets struktur, hvilket sænker aktiveringsenergien og gør reaktionen mulig.

Et substrat er fagbegræbet for det eller de molekyle(r), der binder sig i det aktive site og skal reagere. Substrat bundet i enzymet kaldes et enzym-substrat-kompleks. Substrat laves til produkt, som stadig er bundet i enzymet kaldet enzym-produkt-kompleks, outcome er det frigivet produkt, se figur 3.



**Figur 3: Enzym-katalyseret 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).

Kort sagt gælder for enzymer:

1. De binder deres substrat med høj specificitet.
2. Substratbinding medfører strukturelle ændringer, der fremmer reaktionen.

## Restriktion enzymer

**Restriktionsenzymer** er enzymer, der kan klippe specifikke dobbeltstrengt DNA-molekyler over. I naturen bruges restriktionsenzymer af bakterier og arkæer som forsvar mod virusinfektioner. Nogle vira angriber nemlig bakterier – de kaldes bakteriofager – og sprøjter deres DNA ind i værtscellen. For at beskytte sig kan værtscellen producere restriktionsenzymer, som genkender og klipper viralt DNA i stykker, før det når at ødelægge cellen. Det klippede DNA er nu ustabilt og kan blive nedbrudt af andre enzymer (f.eks. **Exonukleaser**) i cellen.

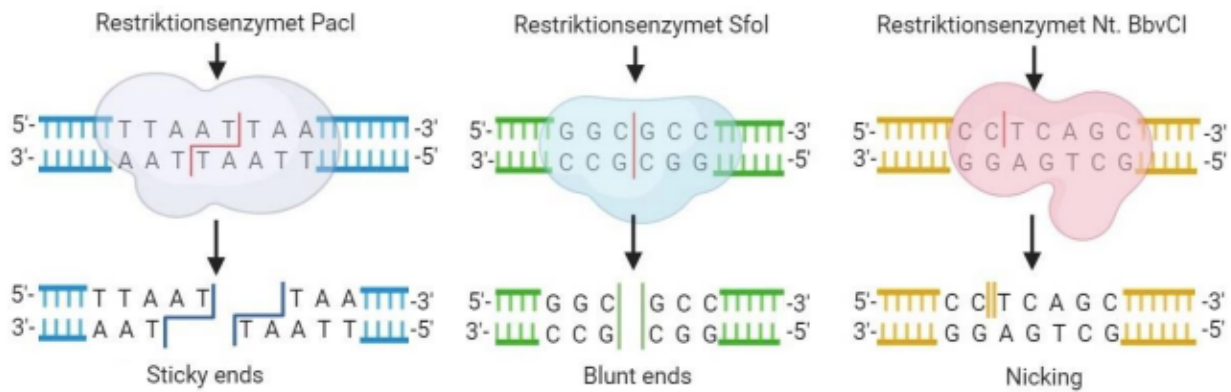
Hvert restriktionsenzym genkender en bestemt **basesekvens** i DNA, kaldet et **genkendelsessite**. Denne præcision er afgørende, da enzymerne ellers risikerer at klippe i cellens eget DNA, hvilket kan være dødeligt. Derfor har forskellige restriktionsenzymer forskellige og meget specifikke genkendelsessites.

Restriktionsenzymer kan derudover klippe DNA'et på forskellige måder. Disse klippemønstre kaldes for sticky ends, blunt ends og nicks (se figur 4):

- 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, hvis DNA-sekvenserne

matcher hinanden korrekt. Dette udnyttes i kloningsteknologier/gensplejsning, og det er også noget vi skal prøve kræfter med.

- Blunt ends er ender på DNA-strengen, hvor begge strenger 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 4).
- Nicking er resultatet af en overskæring af et restriktionsenzym, på kun den ene af de to DNA-strenger, hvilket også gør DNA ustabil og sårbart for nedbrydning (Figur 4).



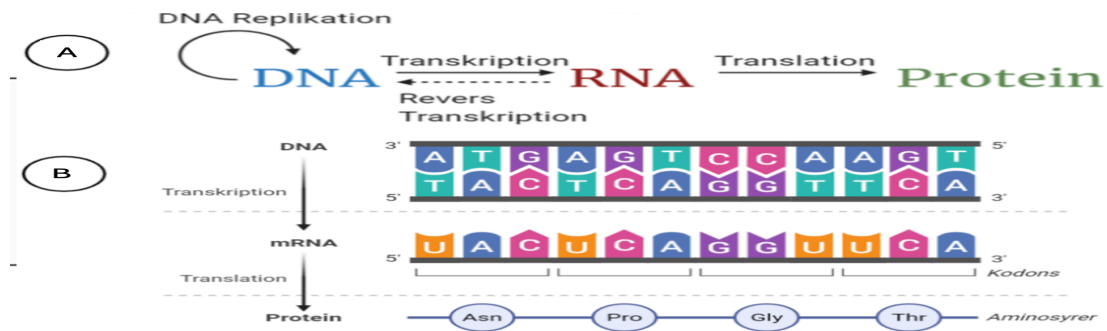
**Figur 4: Klippemønstre og genkendelsessites for tre forskellige restriktionsenzymmer.** 1: Restriktionsenzymet *PstI* genkender sekvensen TTAATTAA, og dens klippemønster resulterer i DNA-ender med overhangs (sticky ends). 2: Restriktionsenzymet *SfiI* genkender sekvensen GGCGAAGGCC, og dens klippemønster resulterer i DNA med blunt ender. 3: Restriktionsenzymet *Nt.BbvCI* genkender sekvensen CCTCAGC, og dens klippemønster resulterer i DNA med et nicks mellem C og T i top strengen.

Restriktionsenzymmer spiller en central rolle i genteknologi og danner grundlag for de kloningsmetoder, vi skal arbejde med under campen.

## 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. **Det Centrale Dogme** beskriver strømmen af genetisk information i en celle. Dette sker i tre trin: 1) replikation, hvor DNA laves til mere DNA, 2) transkription, hvor DNA oversættes til mRNA, og 3) translation, hvor mRNA oversættes til en aminosyresekvens (polypeptidkæde), der kan folde sig sammen og danner et protein (Figur 5.A).

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 5A).



**Figur 5: Det Centrale Dogme.** 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. Transskription oversætter DNA til RNA, og i translationen oversættes RNA til en aminosyre kæde som foldes til et protein.

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

## Replikation: Fra DNA til DNA

Replikationen sker på meget ens måder og ved brug af de samme enzymer i prokaryote og eukaryote celler. På campen arbejder vi dog kun med bakterier og derfor tager dette afsnit udgangspunkt i replikationen i bakterieceller. 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-streng 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-streng fra hinanden, og der dannes to Y-formede strukturer, som kaldes for **replikationsgabler** (Figur 6). De to replikationsgabler udgør tilsammen et kompleks kaldet en **replikationsboble**. *E. coli* har, som de fleste bakterier, en enkelt ORI-sekvens på dets kromosom (se Figur 6). 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-streng 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.

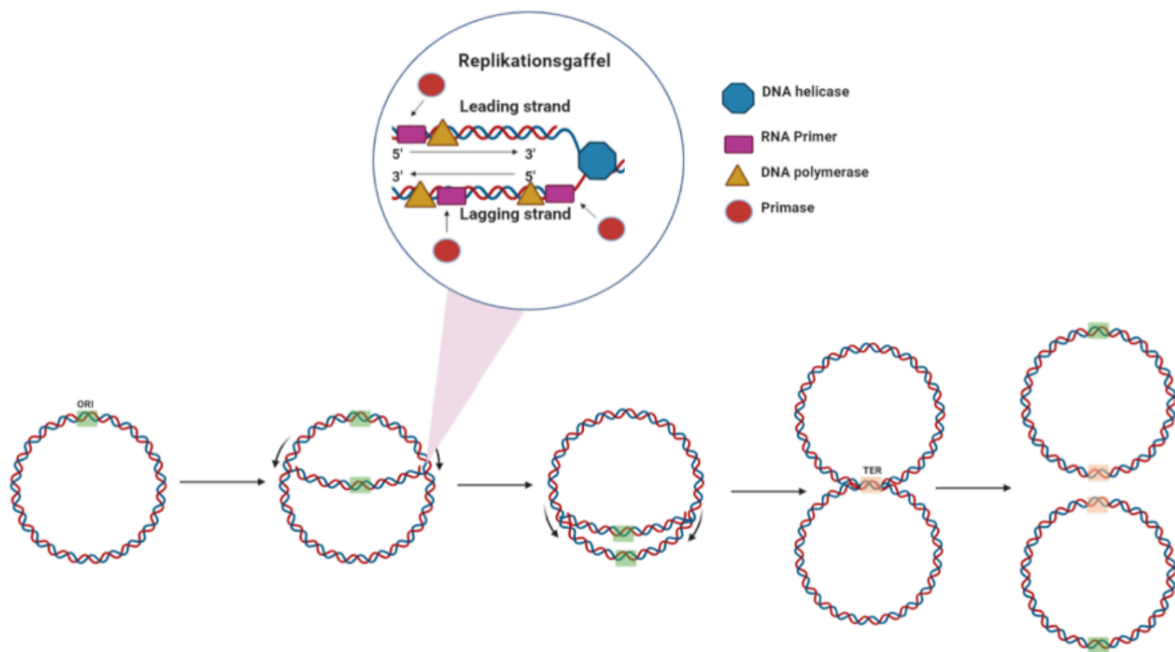
Når DNA-helikasen har adskilt de to DNA-streng fra hinanden, og replikationsgablerne er dannet, er DNA'et klar til at blive kopieret. Syntetiseringen af den nye DNA-streng bliver hovedsageligt udført af enzymer kaldet **DNA-polymeraser**. Disse enzymer tilføjer nukleotider til den voksende DNA-streng 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 6).

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 replikationsgafflen, er den lette. Strengen kan nemlig her fremstilles kontinuerligt, fordi DNA-polymerasen bevæger sig i samme retning som replikationsgafflen. Denne kontinuerligt syntetiserede streng kaldes for **leading strand**. Den anden streng, der løber fra 5' til 3' væk fra replikationsgafflen, er vanskeligere (Figur 6). Denne streng bliver fremstillet i fragmenter, fordi DNA-polymerasen bevæger sig væk fra replikationsgafflen. Det betyder, at DNA-polymerasen skal genmonteres på det nyligt eksponerede DNA, som replikationsgafflen har efterladt sig. Denne vanskelige streng, der er lavet i fragmenter, kaldes for **lagging strand** (Figur 6). 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.



**Figur 6: 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.

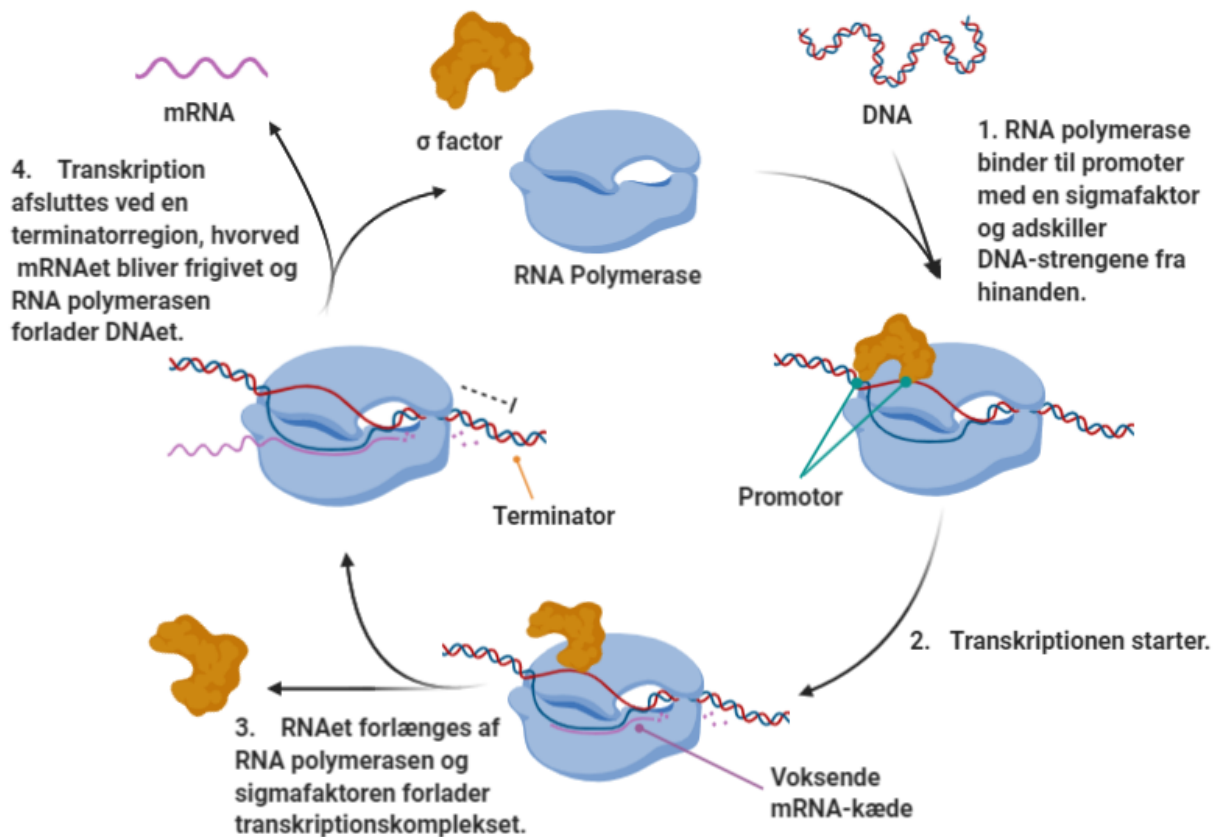
DNA-replikationen afsluttes, når de to modsat orienterede replikationsgaffler mødes og smelter sammen. På den måde skabes to separate og komplette dobbeltstrengede DNA-molekyler. I cirkulære bakteriekromosomer (plasmider) afslutter DNA-replikationen oftest i et område, der kaldes **terminusregionen (TER)**.

## 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. Hele processen katalyseres af enzymet DNA-polymerase, som påsætter nukleotider. Transskription af et gen foregår i tre trin: 1. Initiating, 2. Elongering og 3. Terminering (se Figur 7).

- Initiating: RNA-polymerase binder sig til en promoter (en del af DNA'et, som fortæller RNA-polymerasen, hvor reaktionen skal starte). Helt specifikt er det proteinet kaldet sigma-faktoren, som genkender promotoren.
- Elongering: Nukleotiderne sættes på en af gangen ud fra DNA-skabelonen.
- Terminering: Til sidst transskriberes en såkaldt terminator, som fortæller RNA-polymerasen at reaktionen skal stoppe.

De færreste gener bliver transskriberet konstant. Cellerne regulerer omhyggeligt transskription af alle individuelle gener 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, hvorved cellen sparer på sin energi.

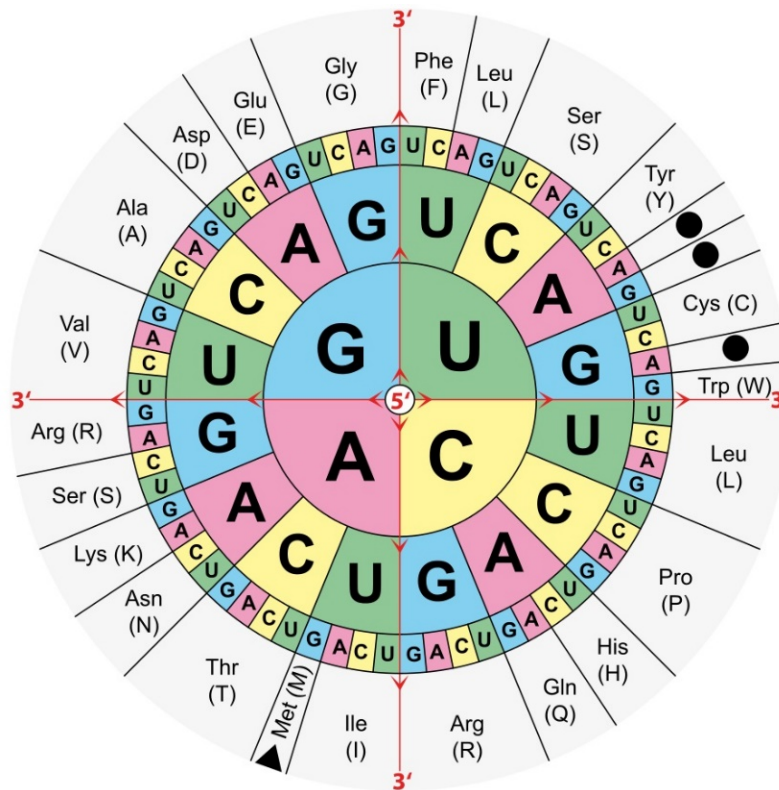


**Figur 7: Transskriptionen af DNA til RNA** udføres af enzymet RNA-polymerase, der binder til en specifik promotorregion på DNA'et, med hjælp fra en specifik sigma-faktor. RNA-polymerasen er derefter i stand til at initiere transskription ved at åbne det spiralformede DNA, hvilket tillader, at det enkeltstrengede 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 bruger cellen informationen i mRNA til at opbygge en kæde af aminosyrer, også kaldet et polypeptid. En aminosyre-kæde/polypeptid dannes i ribosomet og foldes efterfølgende til et funktionelt protein.

mRNA'et aflæses i **kodons**, som er grupper af tre baser (A, U, C eller G). Hvert kodon koder for én bestemt aminosyre. Dog kan flere forskellige kodons godt kode for den samme aminosyre. Sammenhængen mellem kodons og aminosyrer kaldes **den genetiske kode**, se Figur 8.



**Figur 8: Den genetiske kode.** Figuren viser, hvilke aminosyrer som de forskellige kodon koder for. For at finde ud af hvilken aminosyre ens kodon svarer til, starter man i 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).

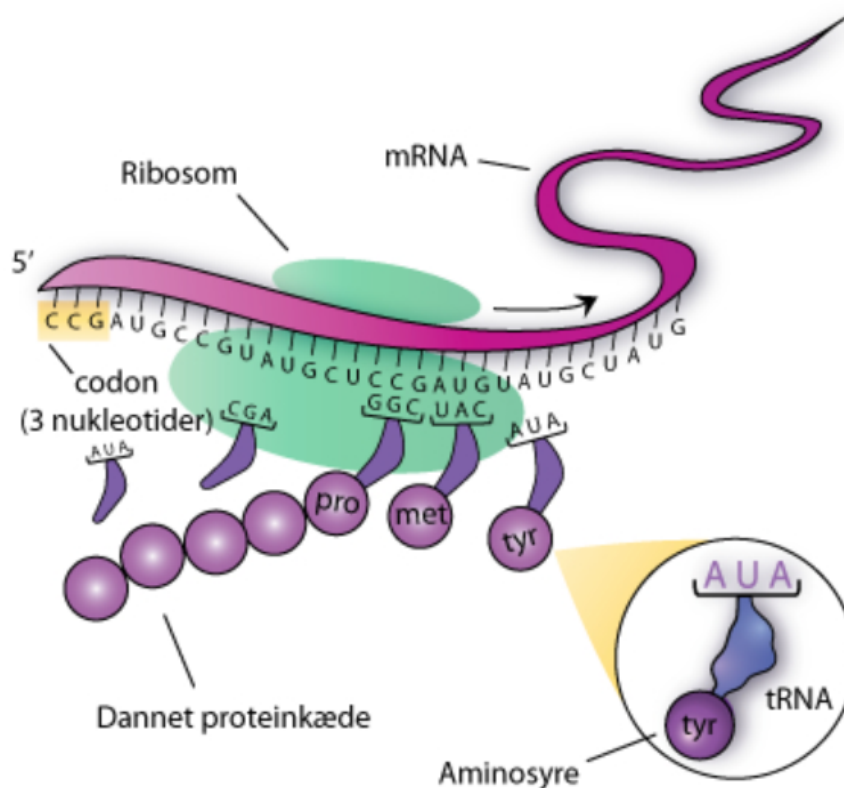
Translationen starter altid ved et **startkodon**, som næsten altid er AUG (methionin). Herefter læses mRNA'et kodon for kodon. Ved aflæsning af hvert kodon påsættes en aminosyre. Til sidst når ribosomet møder et **stopkodon** (UAA, UAG eller UGA), som koder ikke for en aminosyre, men markerer afslutningen på translationen. Translationen er ligesom transskriptionen opdelt i tre trin:

- **Initiering:** Ribosomet samles omkring mRNA, og det første tRNA med methionin binder til startkodonet (AUG). Dermed dannes initieringskomplekset.
- **Elongering:** Ribosomet læser mRNA kodon for kodon, og den tilsvarende aminosyre tilføjes til kæden. tRNA afleverer aminosyrer og forlader ribosomet igen.
- **Terminering:** Når et stopkodon (UAA, UAG eller UGA) nås, frigøres polypeptidet fra ribosomet. Herefter kan det foldes og evt. modificeres til et funktionelt protein.

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 9. 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.

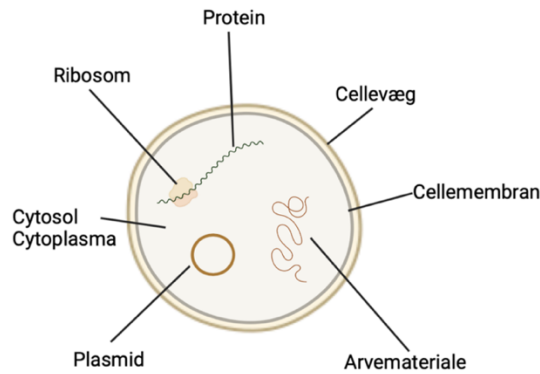
**Ribosomerne** er de strukturer, hvor i polypeptiderne bliver bygget. De består af protein og **ribosomalt-RNA (rRNA)**. Hvert ribosom har to underenheder, en stor og en lille, der samles omkring mRNA'et, der skal oversættes. Ribosomet fungerer samtidig også som et enzym, der binder aminosyrerne sammen og skaber en kæde, se Figur 9.



*Figur 9: 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.*

## Bakterier

**Bakterier** er prokaryote celler uden cellekerne, hvilket betyder, at deres DNA ligger frit i cytosolen i modsætning til eukaryote celler. De fleste har et stort cirkulært kromosom med de livsnødvendige gener samt små cirkulære DNA-stykker kaldet **plasmider**, der ofte giver ekstra egenskaber som fx antibiotikaresistens. Selvom bakterier kan være meget forskellige, har de den samme grundlæggende struktur, se Figur 10.



Figur 10: En bakteriecelle med dens vigtigste organeller.

Cytosolen består hovedsageligt af vand, ioner og proteiner, mens **ribosomer** står for proteinsyntesen. Cellen er omgivet af en **cellemembran**, som regulerer transport ind og ud, og udenpå ligger en **cellevæg** af peptidoglycan, der beskytter cellen og giver form, se Figur 10. Bakterier opdeles i **grampositive** og **gramnegative** ud fra opbygningen af cellevæg og membran

### Bakterievækst

Mikroorganismers vækst kan beskrives med vækstmodellen, der ses på Figur 11. I vækstmodellen inddeles væksten i fire faser: nølefasen, den eksponentielle fase, den stationære fase og dødsfasen.

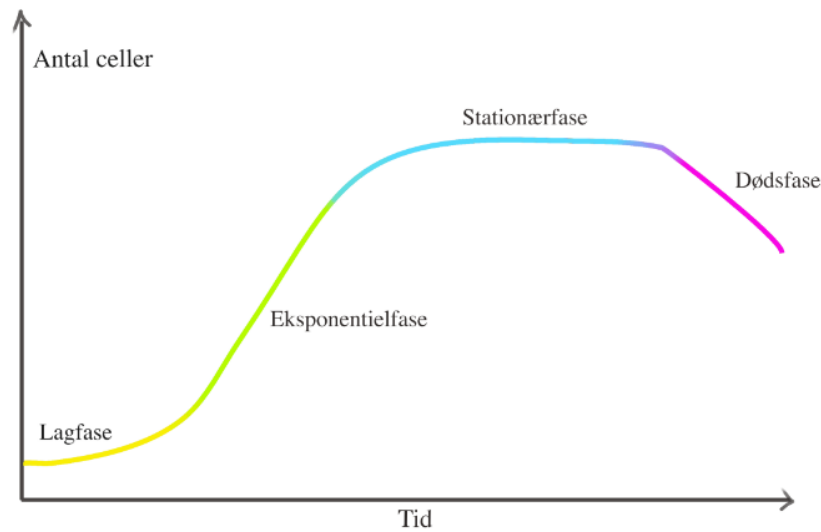
I **lag-/nølefasen** er cellerne lige blevet overført fra et gammelt/brugt vækstmedie til et friskt, og cellerne er derfor ved at vænne sig til de nye vækstbetingelser. Mikroorganismene tilpasser sig ved at omstrukturere deres stofskifte, og de begynder at syntetisere cellekomponenter forbundet med vækst. 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 cellysning, 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.

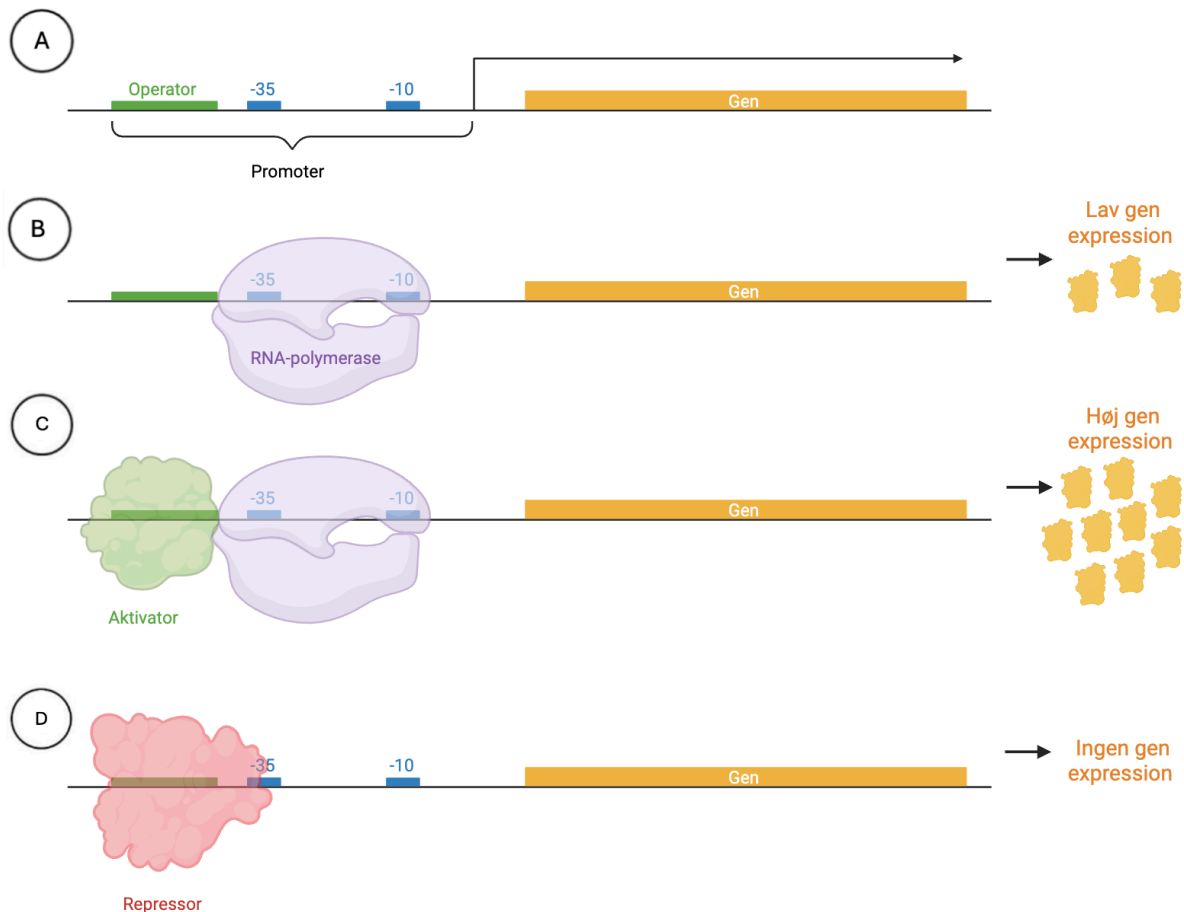


**Figur 11: Vækstmodel for bakterievækst.** På modellen ses de fire faser, der bruges til at beskrive bakterievækst. Fase 1 er en tilvænningsfase inden vækst. Fase 2 er den eksponentielle vækstfase. Fase 3 er en stationær fase, hvor antallet af celler ikke ændres markant. Fase 4 er dødsfasen, hvor vækst ikke er muligt og cellerne til sidst vil dø pga. Manglende næring.

## Regulering af transskriptionen og gen ekspression

Regulering af gener er en grundlæggende mekanisme, der gør det muligt for celler at tilpasse deres genekspression til skiftende behov og omgivelser. Denne regulering sker på flere niveauer, men en central del foregår ved transkriptionskontrol, hvor bestemte proteiner kan fremme eller hæmme RNA-polymerasens aktivitet gennem promoter regulering. Promotoren er navnet på det DNA-stykke, der ligger lige foran et gen. Den består af to genkaldelsesregioner,  $-10$  og  $-35$ , hvor RNA-polymerasen genkender og binder til DNA'et ved hjælp af sigmafaktoren, som er et protein. Promotere kan også indeholde en **operator**, hvor regulatoriske proteiner som **aktivatorer** eller **repressorer** kan binde og regulere gen ekspression.

En **aktivatorer** og **repressorer** kan henholdsvis stimulere eller blokerer transskriptionen af et gen. En aktivator er et molekyle, der binder til operatoren og hjælper bindingen af RNA-polymerasen til DNA'et, hvorved gen ekspressionen øges (Figur 12C). En repressor er et molekyle, der binder til operatoren og inhiberer bindingen af RNA-polymerasen til DNA'et, hvorved gen ekspressionen hæmmes helt (Figur 12D).

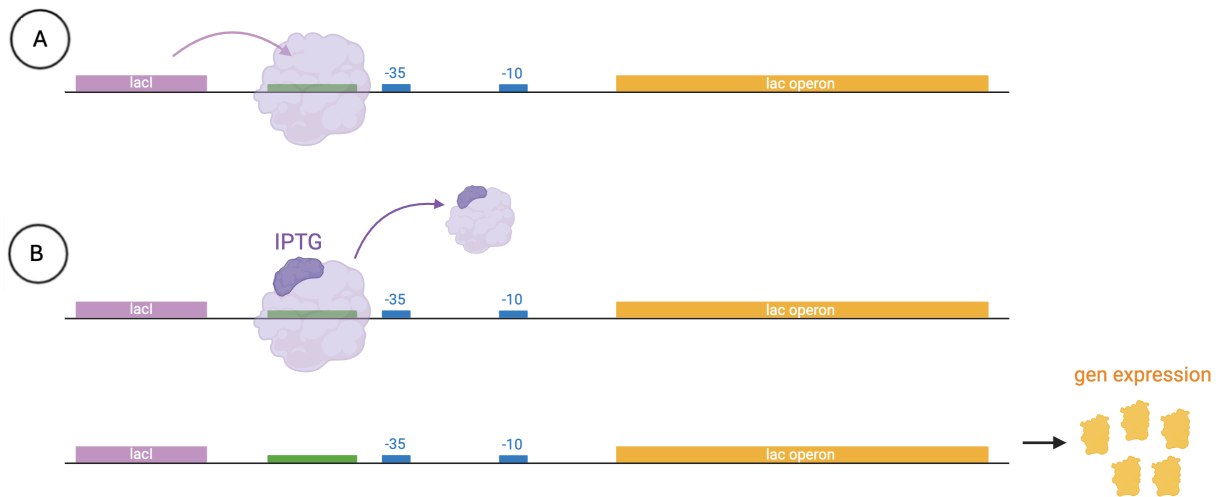


**Figur 12: Regulering af gen expression.** A) DNA med angivet promoter foran et vilkårligt gen med  $-10$ ,  $-35$  og operator indtegnet. B) Generelt binder RNA-polymerasen og der sker transskription, derefter translation og proteinet bliver lavet, dette kan dog være i lav grad. C) En aktivator binder til operatoren og hjælper bindingen af RNA-polymerasen til DNA'et, hvorved gen expressionen øges. D) En repressor binder til operatoren og inhiberer bindingen af RNA-polymerasen til DNA'et, hvorved gen expressionen hæmmes helt.

Der findes yderligere reguleringsproteiner som f.eks. en **inducer**. Når en inducer er til stede, kan den binde til repressoren, ændre dens form og frigøre operatoren, så der igen sker gen expression. En inducer kan også kaldes en anti-repressor, da den ødelægger repressorens funktion, så længe den er bundet hertil. Et klassisk eksempel på promoter regulering, som vi skal arbejde med på campen er *lac*-promotoren i *E. coli*, hvor et repressorprotein normalt binder til operatoren og dermed forhindrer RNA-polymerasen i at starte transkriptionen. Men når der tilføjes en inducer vil gen expression ikke længere være forhindret, da repressoren fjernes fra operatoren.

Lac-promoteren sidder foran lac-operonet. Et operon er en samling af gener i bakterier, der deler den samme promoter, så når transkriptionen starter, bliver alle generne udtrykt samtidigt. Dette adskiller bakterier fra eukaryote celler, hvor hvert gen typisk har sin egen promoter. Operoner er effektive, fordi de ofte indeholder gener, der koder for proteiner, som skal bruges samtidig. Et af de mest kendte er **lac-operonet**, som består af generne **lacZ**, **lacY** og **lacA**. Disse koder for enzymer, der gør det muligt for cellen at optage og nedbryde laktose til glukose og galaktose, som efterfølgende kan omsættes til energi i cellen. Genekspressionen reguleres af **lacI**, som ligger uden for operonet og koder for en repressor. Når repressoren er bundet til operatoren, forhindres transkription (Figur 13A). Hvis laktose er til stede, binder det til repressoren og fungerer som en inducer (Figur 13B og 13C), så lac-generne aktiveres, og laktosen kan nedbrydes. På den måde udtrykker cellen kun generne, når laktose er til stede, hvilket sparer energi.

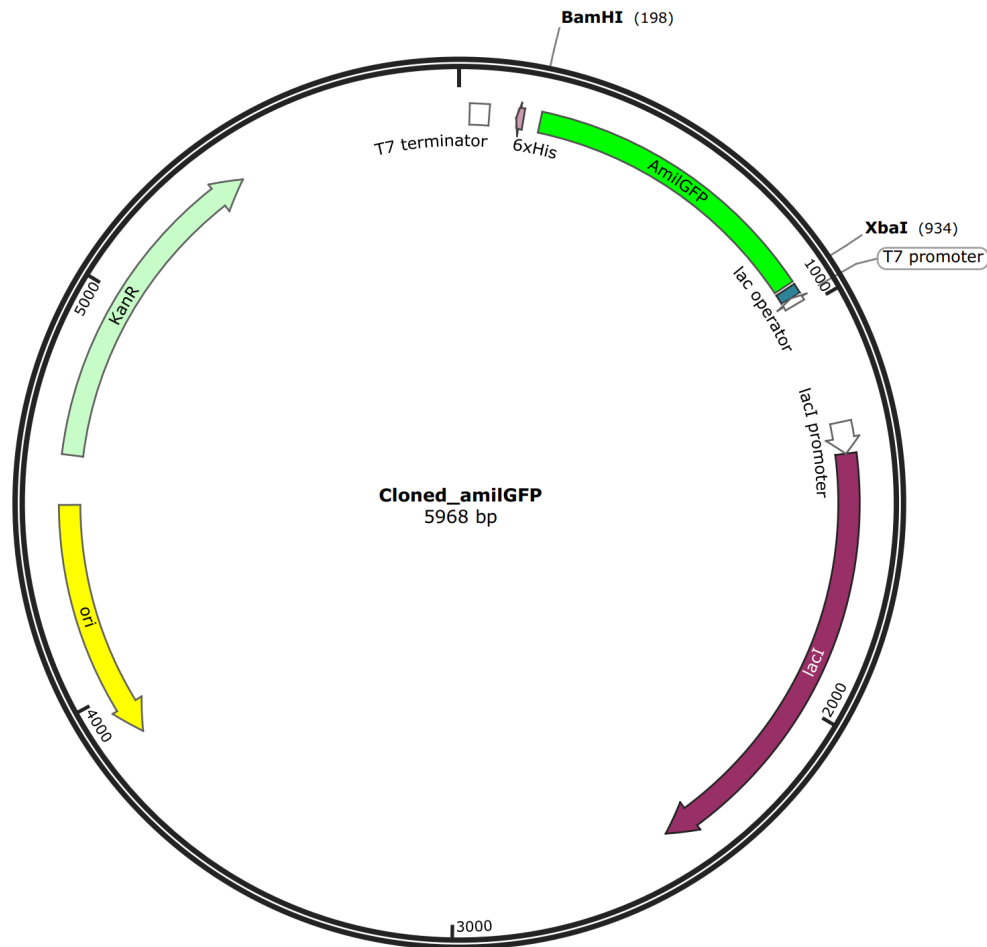
På campen vil vi bruge IPTG i stedet for laktose. IPTG er et syntetisk analog til laktose, der effektivt binder til LacI-repressoren men ikke nedbrydes af cellen. Når IPTG tilsættes, frigøres operatoren fra LacI, og RNA-polymerasen kan frit transskribere operonets gener. Dette gør IPTG til et meget brugbart værktøj til kontrolleret genekspression i bioteknologiske eksperimenter.



**Figur 13: Inducer kontrol af gen ekspression.** A) Under normale forhold, vil lac-operonet være respresset af LacI. B) Ved tilstedeværelse af laktose eller IPTG vil LacI ændre form og kan ikke længere binde operatoren. Gen ekspression forløber nu normalt og lac-enzymet laves, så laktose kan nedbrydes og bruges som energikilde.

Man kan yderligere benytte lacI og lac-operatoren til at styre genekspression af andre gener. Dette skal vi gøre på campen, hvor vi skal kloner gener ind i et plasmid, som har operatoren og LacI-genet. Det gen, vi kloner ind, vil så blive reguleret af LacI og operatoren, hvorved vi kun får lavet vores protein genet koder for, når vi tilsætter IPTG.

Som tidligere nævnt skal vi indsætte generne for fire forskellige fluorescerende gener og dermed lave fire plasmider, der skal indsættes og udtrykkes i *E. coli*. På Figur 14 ses et af de plasmider vi skal lave, nemlig det med genet AmilGFP. På figuren ses, at plasmidet har LacI, der har sin egen promotor og så vores indsatte gen (AmilGFP), som sidder med et histidin tag (gennemgås længere nede), lac-operatoren, sin egen promotor og en terminator. Desuden ses de to restriktionsenzym-site, vi skal bruge til kloning (gennemgås også længere nede), BamHI og XbaI, og ORI (Origin of Replication) til replikation i bakterien, samt KanR, som er et resistensgen mod kanamycin, der bruges som selektionsmarkør (gennemgås længere nede). Den eneste forskel på plasmidet i figur 14 og de øvrige plasmider, vi skal lave, er det fluorescerende gen.

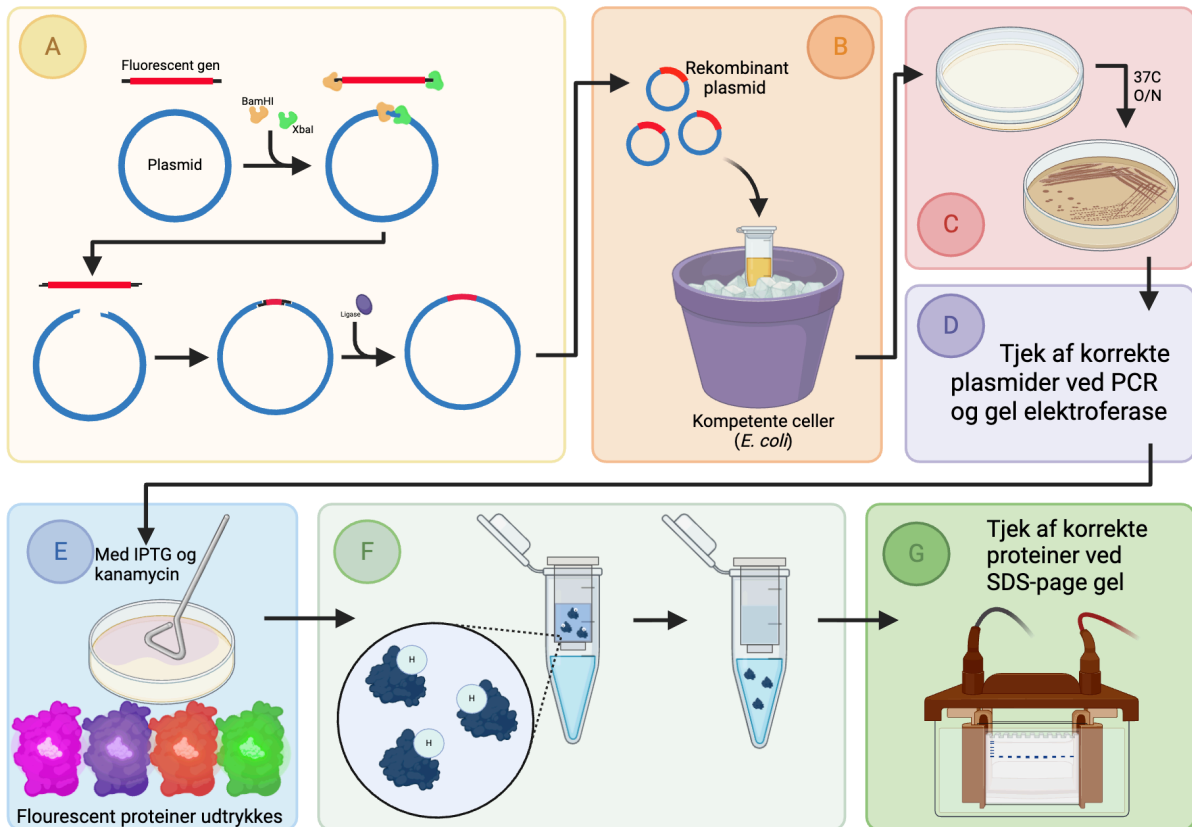


**Figur 14: Plasmid construct med AmilGFP.** KanR: kanamycin resistens gen. ORI: origin of replication, hvor replikationen startes i bakteriet. LacI: Repressor, der binder lac-operatoren.

## Metoder i laboratoriet

Formålet med dette års laboratoriearbejde er at indsætte gener for forskellige fluorescerende proteiner ind i en *E. coli* stamme. På figur 15 nedenfor ses et overordnet flowdiagram af, hvordan dette skal ske.

Der haves et plasmid og et gen, der koder for et fluorescerende protein. I første step (A) bruges restriktionszymer til at åbne plasmidet og klippe enderne af genet. Derved vil genet blive gensplejset ind i plasmidet og klistres ordentligt på plads af ligase. Disse plasmider skal nu transformeres ind i vores *E. coli* stamme (B) og plades ud på et selektivt vækstmedie (C). Herefter kan man bruge metoder som PCR og gel elektroforese til at tjekke, om bakterierne har fået indsat plasmidet korrekt (D). Bakterierne kan nu plades ud igen på plader, der indeholder IPTG. IPTG vil resultere i gen ekspresion af det fluorescerende protein, hvorved bakterierne vil få farve (E). Ud over IPTG indeholder pladerne også kanamycin, som plasmidet indeholder et resistensgen overfor. Hvis ikke der haves kanamycin på plades er plasmidet ikke nødvendigt for cellens overlevelse og vil derfor ikke blive udtrykt. Nu er eksperimentet fuldendt og der skal bare tjekket, om cellen har dannet det rigtige protein. Dette gøres ved først at oprense proteinet ved brug af HisTag proteinoprensning (F), og når man så har fået sit protein, tjekker man det via SDS-page elektroforese (G). Denne proces gennemføres for fire forskellige gener, der koder for fire forskellige fluorescerende proteiner. De følgende afsnit vil gennemgå teori for de labmetoder, som skal bruges undervejs.



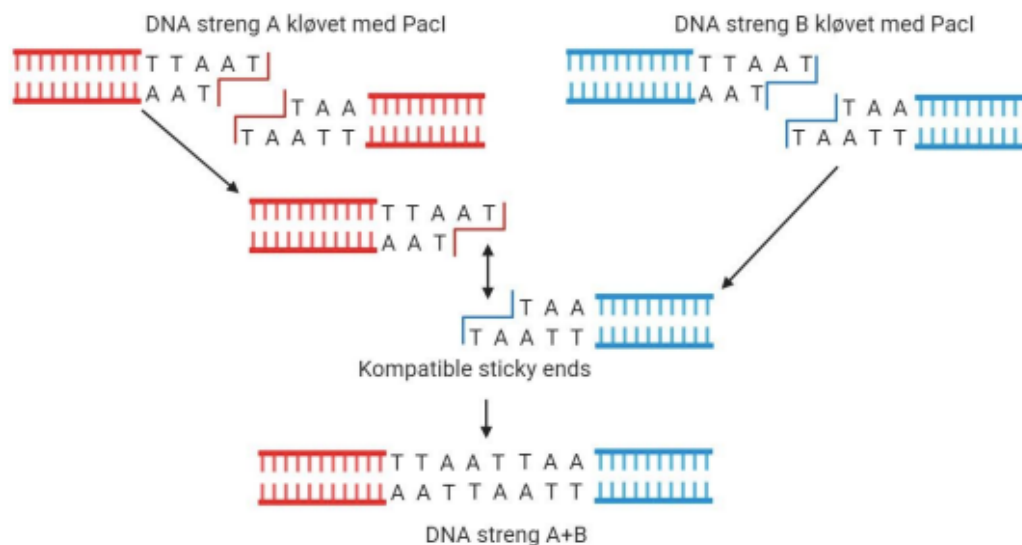
**Figur 15: Overordnet flow-diagram for eksperimenter på campen.** A) Restriktionsenzymkloning. B) Transformering i kompetente celler. C) Udpladning og vækst over natten (O/N betyder over night). D) cPCR og gelelektroforase. E) Udpladning på IPTG og kanamycin, samt vækst over natten. F) Protein omrensning ved brug af HisTrap. G) Tjek af korrekte proteiner ved SDS-page elektroforase.

## Restriktionsenzymkloning

Restriktionszymer kan ikke kun bruges af bakterier som forsvar, som nævnt tidligere, men også som et kraftfuldt værktøj i bioteknologien. Ved at udnytte deres evne til at genkende og klippe DNA på helt bestemte sekvenser, kan forskere skære DNA i præcise fragmenter og sætte dem sammen på nye måder. Denne metode, kaldet restriktionsenzym-kloning, gør det muligt at indsætte gener i plasmider eller andre DNA-molekyler og dermed skabe genetisk modificerede organismer.

Ved restriktionsenzymkloning udnytter man oftest sticky-ends overhangs, da de er nemme at arbejde med. I eksemplet på Figur 16 er der to DNA-streng (streng A og streng B), der begge er blevet klippet med restriktionsenzymet PacI. Da de to DNA-streng er blevet klippet med samme

restriktionsenzym, har de kompatible sticky ends og kan sættes sammen.



**Figur 16: 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".

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, hvilket vi også vil, for at reparere DNA'et.

DNA'et skal efterfølgende opformeres, så man kan få en hel masse. Dette gør vi værtsorganismen *E. coli*.

### Transformation og 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 inkorporerer det i dens genom eller optager det som et plasmid. Denne form for deling af genetisk materiale kaldes for horisontal genoverførsel. I modsætning sker vertikal genoverførsel fra en generation til en anden generation.

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 neutraliserer 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 varmechok, der skaber små porer i cellemembranen. 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 kemisk kompetente celle nu optaget nyt genetisk materiale, og det nye genetiske materiale bidrager nu med nye egenskaber til cellen.

## Vækstmedier og selektionsplader

Før 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.

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. 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.

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 indsættes en **selektionsmarkør** i bakteriens gener. Det kan f.eks. være antibiotikaresistens. Her tilsætter man antibiotika agerpladen, så 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 plasmidet 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.

## Polymerase Chain Reaction

**Polymerase Chain Reaction (PCR)** 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. En PCR tager normalt 2-4 timer.

PCR er delt op i tre forskellige faser (se figur), der har hver deres temperatur og varighed. De angivne temperaturer varierer efter hvilke primere, der anvendes.

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

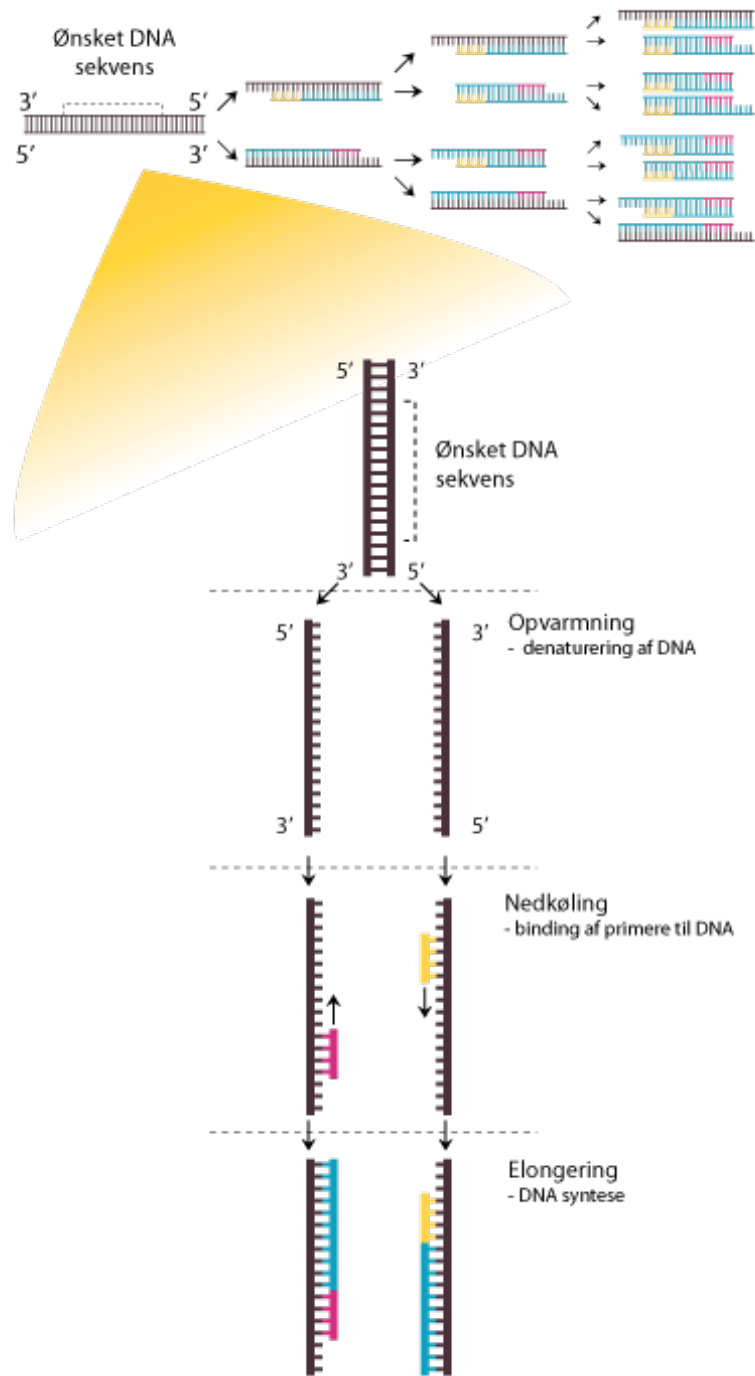
Det dobbeltstrengede DNA, der skal bruges som skabelon i reaktionen, skal først denatureres (adskilles) ved høj temperatur (ca. 95 °C) i nogle sekunder. Dette gør DNA'et enkeltstrengt, så hver streng kan få bygget en ny komplementær streng senere i PCR-cyklussen.

2. **Nedkøling, også kaldet annealing (binding af primere til DNA)**

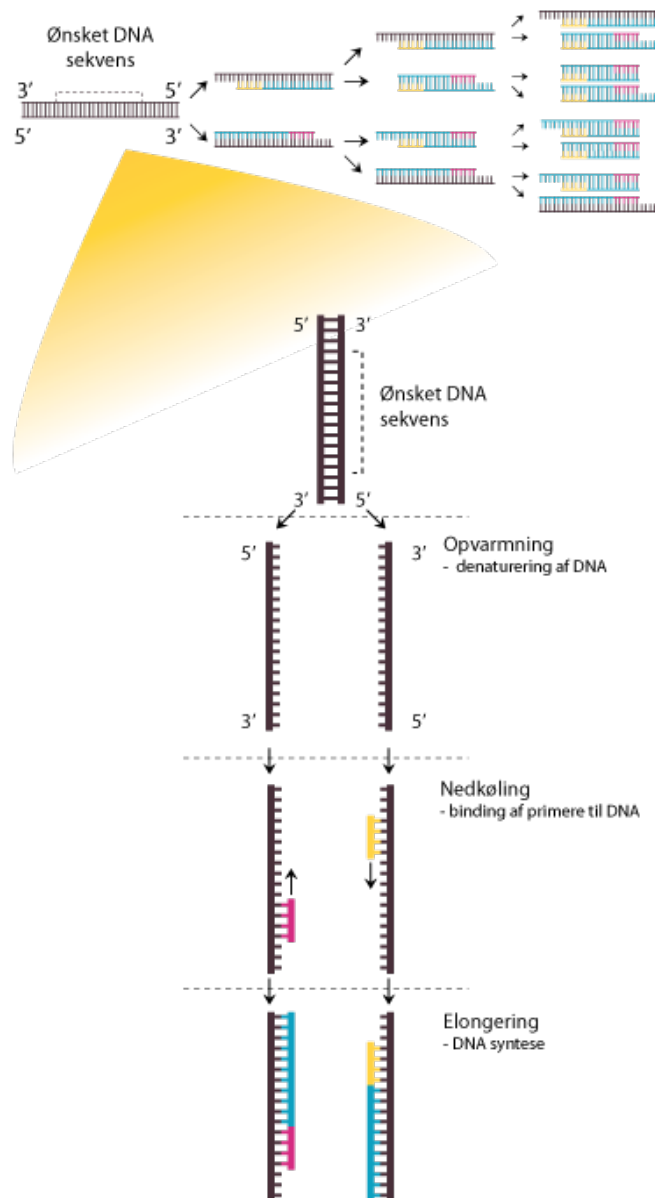
Temperaturen sænkes til omkring 60 °C (denne temperatur afhænger specifikt af de primere man bruger men ligger oftest mellem 50-65 °C), hvor de tilsatte primere vil kunne binde til startstederne på det enkeltstrengede DNA.

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.



Figur 18: Opformering af en specifik DNA-sekvens med PCR ved tilsætning af primere (gul og rød), der binder the



startstedet for kopieringen på hver af de to ender

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

## Koloni PCR

Koloni PCR (cPCR) er en undertype af PCR-teknikken, der benytter PCR til at screene kolonier for tilstedeværelsen af et ønsket gen, for os de fluorescerende gener. 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 cellestammer. Efterfølgende kan PCR'en forløbe som beskrevet ovenfor og på den måde opformerer din kolonis genetiske materiale. Efter PCR'en er fuldendt kan man analysere PCR product via gelelektroforese.

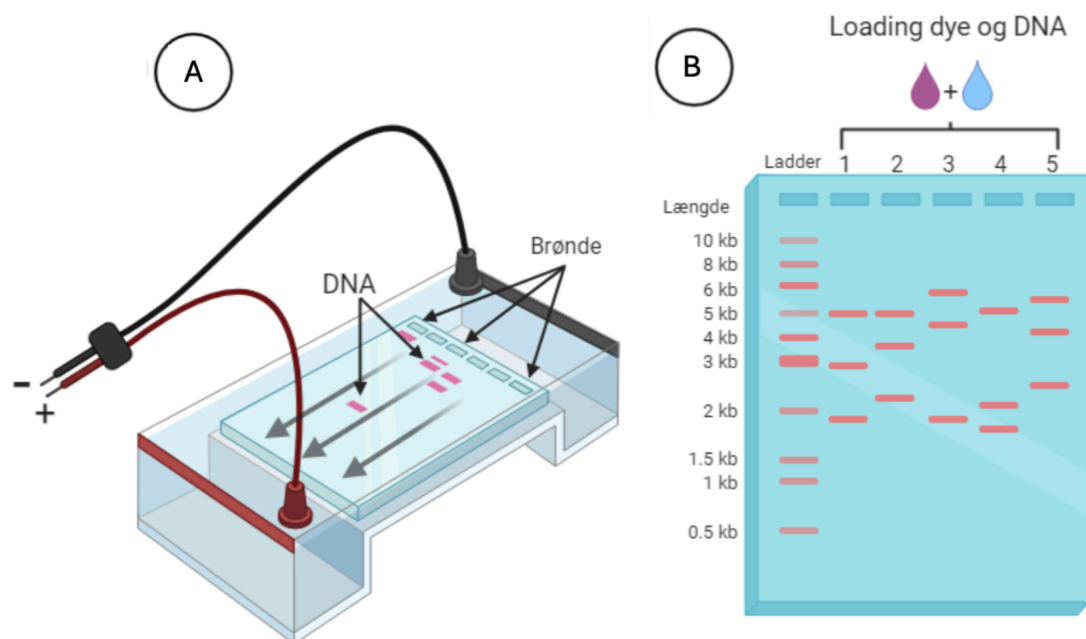
## Gelelektroforese

Gelelektroforese er en teknik, hvorved man kan separere og identificere forskellige DNA-streng eller proteiner i en opløsning ud fra deres størrelser. 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.

I gelelektroforese udnytter man, at DNA naturligt er negativt ladet. Denne negative ladning stammer fra fosfatgrupper i DNA's nukleotider. 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.

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. Først støber man sin gel, som består af polysacchariden **agarose**, buffer og en **DNA-stainer**, der er vigtig for at kunne visualisere båndene under UV-lys.
2. Gelen bliver herefter nedsænket i et elektroforesekammer, hvorefter en **bufferopløsning** hældes ned i elektroforesekammeret.
3. De ellers usynlige DNA-fragmenter bliver blandet med en lille smule **loading dye**, der er farvet og indeholder en koncentreret sukkeropløsning (ofte glycerin).
4. Herefter placerer man sin DNA-prøve i fordybninger, kaldet brønde, der er placeret i den ene enden af gelen. Man tilføjer også en **DNA-ladder**, der er en blanding af DNA-fragmenter i kendte længder (Figur 19). 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. Så starter man gelelektroforesen ved at tænde for spændingsfeltet og venter 20-25 min.



**Figur 19: Gelelektroforese.** 19.1) Gel i et kar, hvor ens prøver skal loades. 19.2) Resultat af gel, hvor man kan se DNA fragmenternes længde i ens prøver. Brønd til venstre er med laddermix, som har en masse DNA-stykker i kendte længder, som kan bruges til referance.

Efter at gelelektroforesen er gennemført, kan man ved hjælp af UV-lys se DNA'et som små bånd på gelen (Figur 19). Grunden til at man bruger UV-lys er, at den tilføjede DNA stain binder sig til DNA'et og lyser op under UV-lys.

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

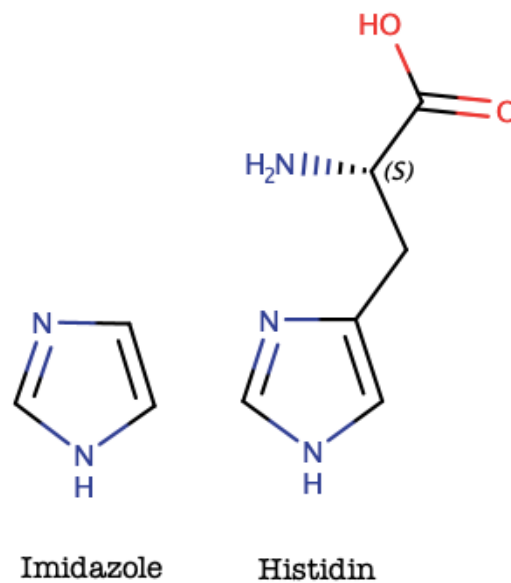
## Protein oprensning ved HisTrap

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. Proteintags er altså et genteknologisk værktøj, der kan gøre livet lettere for molekylærbiologer. Proteintags kan som udgangspunkt introduceres i begge ender af et protein, men ikke alle typer af proteintags kan introduceres begge steder. 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. Fusionsproteinet vil på den måde få den brugbare egenskab proteintagget (f.eks. være lettere at oprense, som i vores tilfælde), 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 via immobilized metal-affinity chromatography (IMAC). I denne form for chromatografi benyttes overgangsmetallerne  $Ni^{2+}$  eller  $Co^{2+}$  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 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 20. 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.



*Figur 20: Den kemiske opbygning af imidazole og histidin. På billedet kan man se, at begge stoffer indeholder den samme ringstruktur.*

## SDS-page gel

**SDS-PAGE** er en metode til at adskille proteiner efter størrelse og fungerer på samme princip som DNA-gelelektroforese, men her bruges en polyakrylamidgel. Før kørslen behandles proteinerne med detergenten SDS, som folder dem ud og giver dem en ensartet negativ ladning. På den måde fjernes forskelle i form og ladning, så adskillelsen kun afhænger af proteinernes størrelse. Når spændingsfeltet tilsluttes, vandrer proteinerne gennem gelen mod den positive pol, og deres vandringshastighed afhænger udelukkende af deres størrelse: små proteiner bevæger sig hurtigt og langt, mens store proteiner bevæger sig langsomt og kortere.