

BIO101 INTRODUKSJON I BIOTEKNOLOGI OG KJEMI

(5 studiepoeng) 2024

PROGRAM

Mandag 12. august.

Sted: Auditoriet i Bioteknologibygningen (BT 1A.07)

10:00-11:00 Kort presentasjon av fakultetet og studiene

- Velkommen til studiet og KBM, ved dekan *Sigrid Gåseidnes*.
- Informasjon om studiene, ved studieleder *Hilde Vinje*
- Hvordan er det å være student ved KBM, studenter ved KBM forteller.
- Presentasjon av Studentsamfunnet ved leder *Magnus Schie Larsen*
- Rådgivning for NMBU-studenter ved studentprest *Øystein Solberg Mathisen*.
- Presentasjon av studieveilederne ved KBM.
- Informasjon om forkurs i matematikk ved *Ole Elvetun* (RealTek).

11:00-11:15 Pause, hvor studentene deles i fire grupper. BIO101-studentene fortsetter i BT1A.07 (gjelder B-BIOTEK, B-KJEMI og M-KB, 1. år)

11:15 –12:00 Informasjon om BIO101 fra emneansvarlig, *Linda Bergaust*.

12:00 → Felles lunsj for alle nye studenter og ansatte ved KBM, Vrimlehallen, Bioteknologibygget.

TIRSDAG 13. august

08:15 – 09:00 BT 1A.07. **Innføring i labrutiner og -sikkerhet**, ved *Else Marie Aasen* og *Hanne Devle*
Info om posteroppgavene og føring av labrapporter ved *Linda Bergaust*
Deling av studentene i laboratoriegruppe I og II.

09:15 – 11:30 BT 2A.08 **Gruppe I:** Grunnleggende laboratorieferdigheter.

09:15 – 11:30 BT 2A.05 **Gruppe II:** Grunnleggende laboratorieferdigheter.

12:15 – 15:00 BT 2A.11 **Gruppe I:** Kjemi. Alkohol, aldehyd og karboksylsyre, Metanol/Etanol

12:15 – 15:00 BT 2A.05 **Gruppe II:** Molekylærbiologi. Krimgåte (DNA isolering og PCR).

15:00 → Diagnostisk test i matte i Canvas:

<https://nmbu.instructure.com/courses/11173/assignments/44869>

ONSDAG 14. august

08:15 – 12:00 BT 2A.11 **Gruppe II:** Kjemi. Alkohol, aldehyd og karboksylsyre. Metanol/Etanol.

08:15 – 12:00 BT 2A.05. **Gruppe I:** Molekylærbiologi. Krimgåte (DNA isolering og PCR).

12:00 – 16:00 "Graskurs" på Samfunnet – presentasjon av lag og foreninger.

TORSDAG 15. august

08:15 – 12:00 BT 2A.08. **Gruppe I:** Mikrobiologi. Mikroorganismer i nærmiljøet.

08:15 – 12:00 BT 2A.05 **Gruppe II:** Biokjemi del 1. Ulike metoder for å felle ut proteiner i melk og soyamelk.

12:15-14:00 Biblioteket BTB **Felles studieveiledning** ved Heidi Rudi og Janne Beate Utåker (obligatorisk)

- Spør oss om StudentWeb, Canvas, time-/eksamensplan + +
- Eksempelplanene - studieprogrammer og –retninger
- Hvilke emner må jeg ta i første studieår?

14:00 -> Jobb med labrapporter.

FREDAG 16. august

08:15 – 12:00 BT 2A.05 **Gruppe I:** Biokjemi del 1. Ulike metoder for å felle ut proteiner i melk og soyamelk.

08:15 – 12:00 BT 2A.08. **Gruppe II:** Mikrobiologi. Mikroorganismer i nærmiljøet.

Ettermiddag **Immatrikulering** (obligatorisk oppmøte, pent antrekk)

MANDAG 19. august

EKSKURSJON TIL BIOTECH OG KJEMI BEDRIFTER I SARPSBORG, TØNSBERG OG MOSS

09:00 Avreise med buss fra Bioteknologibygningen (presis!)

10:00 Besøk på Borregård i Sarpsborg.

14:00 Avreise til Stavern folkehøyskole (<https://www.stavernfhs.no/>)

Viktig! Ta med sovepose/lakenpose eller sengetøy + håndkle. Ta gjerne med treningstøy/badetøy.

Fadderne arrangerer aktiviteter og quiz om kvelden. PS! Ekskursjonen er alkoholfri.

TIRSDAG 20. august

07:30 Frokost

08:30 Avreise fra Stavern folkehøyskole

09:30 Besøk hos Biowater Technology, Tønsberg

11:00 Avreise fra Biowater Technology til Gentian i Moss

12:30 Pizza og omvisning hos Gentian

16:00 Avreise til NMBU, Ås

ONSDAG 21. august

08:15 – 12:00 BT 2A.08. **Gruppe I:** Mikrobiologi. Mikroorganismer i nærmiljøet avsluttes.

08:15 – 12:00 BT 2A.05 **Gruppe II:** Biokjemi del 2: Amylase fra potet, nedbrytning av stivelse.

12:00 -> Jobb med labrapporter.

TORSDAG 22. august

08:15 – 10:00 BT 1A.07 **Hvordan lage poster m/ PowerPoint.** m/ Morten Sørлие og Birgit Hvoslef Dahl. Linda informerer om valg av posteroppgave og møte med veileder (alle gruppene).

10:15 – 14:00 BT 2A.08 **Gruppe II:** Mikrobiologi. Mikroorganismer i nærmiljøet avsluttes.

10:15 – 14:00 BT 2A.05 **Gruppe I:** Biokjemi del 2: Amylase fra potet, nedbrytning av stivelse.

14:00 -> Jobb med labrapporter.

FREDAG 23. August

Hele dagen: Jobb med labrapporter.

FRIST for valg av tema for posteroppgave! Husk å avtale veiledning til **posteroppgaven** når dere har valgt oppgave. Dere finner all informasjon dere trenger i Canvas («Poster» modulen).

MANDAG 26. august

08:15 – 09:00 TU101 **Bioinformatikk** – livets tre ved *Torgeir Hvidsten*

09:15 – 12:00 T201/T230 **Bioinformatikk** - gruppearbeid

Tema «En sunn og vellykket studenttid».

Sted: Aud Max på Studentsamfunnet (felles for introkurs på KBM og Biovit)

13:10 – 13:45 Informasjon fra **Helsestasjonen for ungdom** på Ås. Ved Gry Paus Vadem De Mik, Marit Raaf fra SiÅs

14:00 – 14:45 **Hvordan få en perfekt studietid?** *Lasse Bredal-Knutsen* fra Follopsykologene gir gode tips

15:00 – 15:45 **Rus og spill.** Foredrag ved *Helge Bjørnsen* fra KORUS.

TIRSDAG 27. august

Tema: «Tankevekkende om biologi, studier og fagmiljø» (felles for introkurs på KBM og Biovit)

NB: Digitalt

09:15-10:00 Kognitiv læring ved Solve Sæbø ([videolink](#))

Sted: Aud Max på Studentsamfunnet

10:15 – 12:00 **Hvordan finne og bruke faglitteratur?** Plagiering og bruk av KI, ved Universitetsbiblioteket.

12:15 – 14:00 **Bioetikforelesning** ved seniorrådgiver *Stine Hufthammer Indreid*, Bioteknologirådet

14:15 - 16:00 **Solve Sæbø** (tidligere prorektor for utdanning), **Hvordan lære å lære. Gruppearbeid, 5 studenter pr gruppe.**

ONSDAG 28. august

Arbeid med posteroppgaven og laboratorierapporter.

TORS DAG 29. august

12:00 **Frist for innlevering/opplasting av poster i Canvas!** Studentvikarer i studieadministrasjonen printer posteren dere har lastet opp på en egen posterprinter.

14:15-16.00 BT 1A.07 **Stud001 Studentdemokratiet ved NMBU** (alle gruppene + MVI100)

- <https://www.nmbu.no/student/livet-rundt/studenttinget>
- Representanter fra Studenttinget og Studentrådet på KBM orienterer
- Valg av «klassekontakter» B-BIOTEK, B-KJEMI og M-KB

- Molekylet informerer

14:15– 16:00

FREDAG 30. august

Hele dagen Forberedelse til posterfremvisning og jobbing med laboratorierapporter.

MANDAG 2. september

08:00 – 09:30 Montering av postere i Vrimlehallen i Bioteknologibygget etter oppsatt liste (se Canvas eller liste i vrimlehallen – festemateriell finner dere på resepsjonssranken)

10:00 – 13:00 **Posterne presenteres for sensorene etter oppsatt liste.**

13:00 **Plasseringstest i matematikk (i Canvas)**

16:00 **Siste frist for innlevering av laboratorierapportene.** Rapportene leveres i Canvas dersom ikke annet er avtalt.

EVALUERING AV BIO101

1. **Øvelsene er obligatoriske**, og det er obligatorisk innlevering av rapporter fra alle laboratorieøvelsene. Studentgrupper (maks tre personer) kan levere felles rapport, hvis ønskelig.

Øvelsene må merkes med fullt navn og e-mail-adresse. Rapportene lastes opp i Canvas (egen innlevering for hvert labkurs. Ved eventuell sykdom må dette meldes til labansvarlig per e-mail. Hvis rapporten ikke blir godkjent, vil det være mulig å forbedre rapporten én gang. Du får beskjed om rapporten er godkjent eller ikke i Canvas. Dersom den ikke er godkjent, får du en ny frist for innlevering av rettet rapport.

2. **Posteren og posterpresentasjonen må være bestått.** Ved ikke bestått må det leveres en revidert oppgave med presentasjon senest torsdag 12. september, som må godkjennes. Posteren skal blant annet dokumentere ferdighet i bruk av dataverktøy som PowerPoint, samt søking og bruk av litteratur. **NB! Kilden til benyttet litteratur og nettsider må refereres fullt ut på posteren.** Nyttig informasjon om hvordan posteren skal lages får dere av Morten Sørli og Birgit Hvoslef Dahl 22. august.

Det anbefales at to studenter samarbeider om å lage og presentere posteren. Hver oppgave kan maksimalt tolkes av to studentgrupper. Her gjelder «førstemann til mølla» og oppgavene er tilgjengelige i Canvas fra 13. august. Veiledning for gruppene gis av oppgavestiller. Tidspunkt for veiledning avtales fredag 23. august.

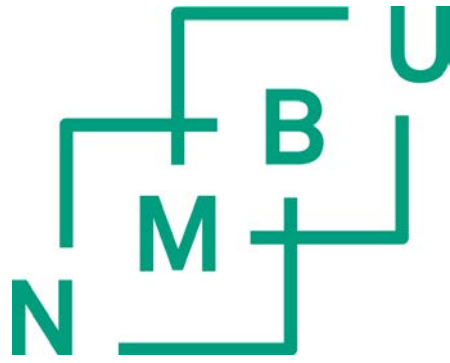
Posteren må leveres (lastes opp) innen kl 12:00 torsdag 29. august i Canvas og vil bli printet av studenthjelp før helgen. Posterne settes opp (av dere selv) i Vrimlehallen i løpet av helgen eller mandag 2. september før kl 09.15. Posteren presenteres muntlig (5 minutter) for en sensorgruppe mandag 2. september, etter oppsatt liste. Følg med i Canvas for informasjon om dette.

Posterne tas ned fredag 20. september. **Dette er studentgruppenes eget ansvar!**

Kontaktpersoner 2024:

Emneansvarlig	Linda Bergaust	linda.bergaust@nmbu.no
Studieveiledere	Janne Beate Utåker Heidi Rudi	janne-beate.utaker@nmbu.no heidi.rudi@nmbu.no
Laboratoriekursansvarlige:		
Grunnleggende	Else Marie Aasen	else-marie.aasen@nmbu.no
Lab-ferdigheter:	Ellen Hasle Kokkim Lene Ruud Salima Fjeld	ellen.kokkim@nmbu.no lene.ruud@nmbu.no salima.fjeld@nmbu.no
Mikrobiologi:	Geir Mathiesen Else Marie Aasen	geir.mathiesen@nmbu.no else-marie.aasen@nmbu.no
Biokjemi:	Tove Gulbrandsen Devold Gustav Vaaje-Kolstad	tove-guldbrandsen.devold@nmbu.no gustav.vaaje-kolstad@nmbu.no
Molekylærbiologi:	Ingrid Malien Duister Rebekka Moe	ingrid.malien.duister@nmbu.no rebekka.moe@nmbu.no
Kjemi og Power Point:	Morten Sørлие Lene Ruud Salima Fjeld	morten.sorlie@nmbu.no lene.ruud@nmbu.no salima.fjeld@nmbu.no
Bioinformatikk	Torgeir Hvidsten	torgeir.r.hvidsten@nmbu.no

Med forbehold om endringer - se info om dette på Canvas.



FAKULTET FOR KJEMI, BIOTEKNOLOGI OG MATVITENSKAP

LABORATORIEØVELSER

BIO101

2024

INNHOOLD

Føring av laboratorierapport	2
Sikkerhet på laboratoriet	3
Laboratorieøvelse i kjemi	7
Laboratorieøvelse i molekylærbiologi	12
Laboratorieøvelse i mikrobiologi	25
Laboratorieøvelse i biokjemi	38
Laboratorieøvelse i bioinformatikk	54

FØRING AV LABORATORIERAPPORT

Hensikten med å skrive en laboratorierapport er blant annet:

- Hjelp deg til en bedre forståelse av øvelsen
- Lære å vurdere egne resultater
- Lære å formulere et vitenskapelig arbeid
- Beskrive hva du har gjort på en slik måte at forsøket kan gjentas av andre

I BIO101 benytter vi en mal som skal brukes for alle labrapportene dere skal skrive, med unntak av kjemi-delen. Malen finner dere på Canvas-siden til BIO101 (se «Labhefte og labrapporter» modulen). Malen inneholder også informasjon om hvordan en labrapport skal skrives.

Dere skal gjøre alle øvelsene i grupper på to eller tre, og skal skrive og levere (laste opp) rapportene som labgruppe. Husk å skrive navnene på alle medlemmene i labgruppa på rapporten.

Sikkerhet på laboratoriet

Generelle sikkerhetsregler

- Laboratoriefrakk er påbudt i alle laboratorier.
- Langt hår må holdes på plass. Løst langt hår kan lett bli antent i gassflamme.
- Spising og drikking er forbudt i laboratoriet. Det er ikke tillatt å bruke snus.
- Vesker, sekker og yttertøy skal ikke tas med inn på laboratoriet.
- Alle skal vite hvor nærmeste brannslukker, nød-dusj, øyeskyller og førstehjelpsutstyr befinner seg.
- Gjør deg kjent med egenskapene til de kjemikalierne du skal bruke. Studer HMS-databladene og ta nødvendige forholdsregler.
- Alt arbeid med farlige kjemikalier skal foregå i avtrekk.
- Bruk hansker ved arbeid med etsende, giftige eller allergi-/kreftfremkallende stoffer.
- Hold orden på arbeidsplassen. Fjern søl øyeblikkelig.
- Gjør deg kjent med avfallsrutinene. Husk at glassavfall, spesialavfall og smitte-/risikoavfall skal kastes på anviste steder.
- Gassbrennere som ikke er i bruk, skal være stengt av!
- Vask hendene med såpe og vann etter at de har vært i kontakt med kjemikalier. Alle SKAL vaske hendene før laboratoriet forlates.

Personlig verneutstyr

Verneutstyr skal være tilgjengelig i laboratoriet. Ved planlegging av forsøk, skal den enkelte kontrollere at nødvendig verneutstyr er tilgjengelig. Hva slags verneutstyr som trengs er avhengig av hvilke kjemikalier som skal brukes, og hvordan de skal anvendes.

Laboratoriefrakk

Frakk er påbudt i alle kjemilaboratoriene og skal brukes for å beskytte klærne og huden under. Laboratoriefrakken skal være av bomull eller en blanding av bomull og kunstfiber. Bruk ikke frakk laget bare av kunstfiber. Kunstfiberstoffer vil smelte ved brann og kan gi stygge brannsåre.

Vernebriller

Vernebriller skal brukes i de laboratorier der det er påbudt og ellers ved arbeid som kan medføre sprut. Ved spesielt farefylt arbeid skal hel ansiktsskjerm benyttes dersom arbeidet ikke kan utføres i avtrekk. Vær oppmerksom på at små mengder av etsende væske kan komme innunder kontaktlinser. Noen typer myke linser absorberer damper som senere kan frigjøres i øyet. Kontaktlinser vil hindre rask og effektiv skylling av øynene etter kjemikaliesprut.

Hansker

Hansker *skal* brukes ved håndtering av etsende, allergifremkallende, giftige og ellers helseskadelige kjemikalier. Det er mange hansketyper på markedet, valg og anvendelse av hansker er viktig.

Anbefalt hanskemateriale skal være oppgitt i HMS-databladet når bruk av hansker er nevnt som vernetiltak ved håndtering av stoffet.

Ta alltid av hanskene når du forlater laboratoriet. Søl på hanskene kan være kilde for kontaminering med skadelige kjemikalier.

Skift hansker ofte. Skift alltid hansker ved søl og våte flekker.

Avtrekkskap

Bruk av flyktige eller brannfarlige kjemikalier, eller giftige kjemikalier på pulverform skal foregå i avtrekkskap. Alternativ til avtrekkskap kan være punktavsug og eller friskluftmaske/filtermaske.

Dersom det er fare for *eksplosjon* eller kraftig *sprut*, skal arbeidet foregå i avtrekkskap med nedtrykket luke.

For at avtrekkskapet skal fjerne forurensninger på en god og effektiv måte må du:

1. Plassere arbeidet (flyktige væsker, materiale som støver etc.) mest mulig i sentrum av skapet. Her suger skapet vanligvis best.
2. Arbeide med lukeåpningen trukket lengst mulig ned. Når skapet ikke er i bruk skal luken alltid være nede.
3. Arbeide med rolige bevegelser. Da skaper du ikke turbulens, og du slipper å få forurenset luft ut i pustesonen.
4. Oppbevare minst mulig av flasker og utstyr i skapet. Avtrekkskapet er ikke lagerskap. Flasker og utstyr ødelegger det laminære strømningsbildet inne i skapet og reduserer effekten.
5. Bøy aldri hodet inn i skapet.
6. Velge arbeidsstilling (sittende eller stående) utfra risiko for sprut av etsende væsker og varighet på arbeidet. Er det fare for sprut/søl fra konsentrerte syrer og baser bør stående arbeid foretrekkes.
7. Rydde flasker og utstyr på plass etter arbeidet.

Sikkerhet for gravide

Gravide studenter skal snarest mulig melde ifra til laboratoriepersonale og/eller faglærer med tanke på best mulig tilrettelegging av laboratoriekurset.

Førstehjelp

Kjemikaliesprut i øyet

Start skylling med vann umiddelbart. Bruk øyespylekran der slik finnes. Kontakt Øyeavdelingen på Ullevål sykehus. Alle øyeskader skal direkte dit. Fortsett spyling med øyevaskflaske underveis til Ullevål. Linsebrukere bør om mulig ta ut linsene.

Brannskader. Skyll med kaldt vann fra nærmeste spring. Hold deretter skadestedet neddyppet i lunkent vann lengst mulig, (minst 15 minutter). Kontakt lege hvis nødvendig.

Kuttskader

Skyll med kaldt vann fra springen. Stans blødning, legg på nødforbinding og søk lege for eventuell syng.

Kjemikalier på hud

Skyll med mye kaldt vann, fjern tilsølte klær og skyll under, vask med såpe og vann tilslutt. Sjekk HMS-databladet og kontakt eventuelt lege.

Inntak av kjemikalier

Drink mye kaldt vann. Sjekk HMS-databladet. Giftinformasjonssentralen kan gi ytterligere opplysninger om det aktuelle kjemikaliet.

Gassforgiftning

Frisk luft og fullstendig ro, tilkall lege/ambulansse.

Elektrisk støt

Fjern strømkilden. Ved hjerrestans: Sett straks igang med kunstig åndedrett og hjertemassasje. Kontakt lege.

Bevisstløshet

Stabilt sideleie, sjekk puls og åndedrett. Kontakt lege.

Sjokk (sirkulasjonssvikt)

Den skadde legges med bena høyt. Berolig pasienten og tilkall lege.

Brann

Alle må gjøre seg kjent med NMBUs branninstruks, plassering av nærmeste brannsløkkeutstyr og brannmelder. Hvis brannalarmen går, skal bygningen evakueres. Steng gass og skru av mest mulig øvrig utstyr. Lukk vinduer og dører når rommet forlates.

- Ved branntilløp forsøk rask slokking, men ta ingen sjanser.
- Slukk brann i klær med brannteppe eller nød dusj.
- Varsle laboratoriepersonalet.
- Slå brannalarm.

Viktige telefonnummer

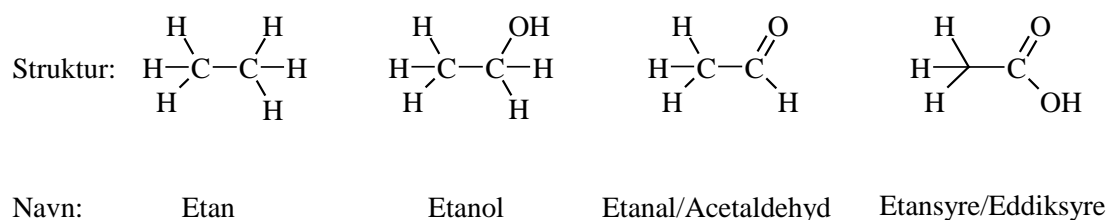
Brann:		110
Medisinsk nødhjelp / Ambulanse:		113
Lege:	Follo legevakt:	64871930
Øyeavdeling Ullevål sykehus:	Hverdager 8.30-11.30:	22 11 86 00
	Utenom disse tider:	22 11 74 33
Giftinformasjonssentralen:		22 59 13 00 (døgnvakt)

Tema: Kjemi

Av Morten Sørli og Anne Gravdahl

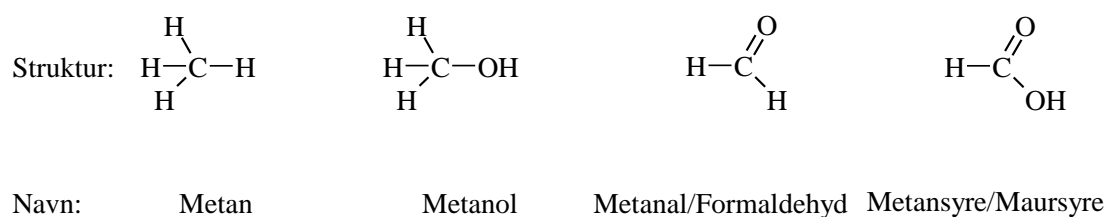
Kjemi er vitenskapen om elektronenes gjøren og laden. Et mantra for å forstå kjemi er: Følg elektronene. Samtlige kjemiske reaksjoner kan deles i to hovedkategorier:

1) Redoksreaksjoner, reaksjoner hvor en forbindelse gir elektroner til en annen forbindelse, og 2) Syre – basereaksjoner, reaksjoner hvor en elektronrik forbindelse reagerer med en elektronfattig forbindelse. Vi skal studere nærmere noen eksempler på både redoksreaksjoner og syre – basereaksjoner. Først ut er redoksreaksjoner. Som eksempler benytter vi oss av noen enkle organiske forbindelser.



Mest redusert \longleftarrow Minst redusert

Minst oksidert \longrightarrow Mest oksidert



Mest redusert \longleftarrow Minst redusert

Minst oksidert \longrightarrow Mest oksidert

Beckmanns reagens inneholder kromat ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) som er en oransje forbindelse. Kromat er en meget sterk oksidant (fjerner elektroner fra andre forbindelser). Når kromat oksiderer, blir det selv redusert (får elektroner). Når kromat reduseres dannes krom ioner (Cr^{3+}) som er en grønn forbindelse. Det er derfor enkelt å se om en redoksreaksjon har foregått ved å se på fargeforandringen. Dersom våre organiske forbindelser reagerer, dannes det en syre.

1. **Eksperimentelt: Tilsett 10 dråper Beckmanns reagens til 5 dråper av etanol, etanal (acetaldehyd), eddiksyre og en spatelspiss glukose i 4 ulike reagensrør. Observer fargen etter 2-3 minutter.**

Sølv ioner (Ag^+) er et svakere oksidasjonsmiddel enn kromat. Når sølv ioner oksiderer en annen forbindelse blir det selv redusert og danner metallisk sølv (Ag). Dersom våre organiske forbindelser reagerer, dannes det en syre.

2. **Eksperimentelt: Ha 5 mL 0,5 M AgNO_3 i et reagensrør. Tilsett 6 M NH_3 dråpevis til utfellingen som først dannes, er løst opp igjen. Bruk reagensrør-rister. Fordel Tollens reagens i 4 reagensrør. Tilsett 3 dråper etanol, etanal (acetaldehyd), eddiksyre og en spatelspiss glukose i hvert sitt reagensrør med Tollens reagens. Varm på vannbad ved 70°C noen minutter. Observer reaksjonen.**

Fehlings løsning inneholder kobber(II)ioner (Cu^{2+}) og er også et svakt oksidasjonsmiddel. Når Cu^{2+} reduseres, dannes kobber(I)oksid (Cu_2O) som er rød/brunt. Dersom våre organiske forbindelser reagerer, dannes det en syre.

3. **Eksperimentelt: I fire reagensrør skal du ha 0.5 mL Fehling A og 0.5 mL Fehling B, varm til koking på et vannbad. Tilsett 5-6 dråper av etanol, etanal (acetaldehyd), eddiksyre og en spatelspiss glukose i hvert sitt rør, og la rørene stå på oppvarming i vannbad i ca. 5 min. Observer reaksjonen.**

Syrer, baser og pH

Syrer og baser er stoffer som reagerer med vann og spaltes til ioner. En syre og en base reagerer med hverandre, og det blir dannet salt og vann i en syre-/base-reaksjon, også kalt nøytraliseringsreaksjon.

Sterk syre/base: Stoff som har stor evne til å avgi/ta opp et proton.

Svak syre/base: Stoff som har liten evne til å avgi/ta opp et proton.

Når en syre, HB, løses i vann får vi dannet oksoniumioner, H_3O^+ , og korresponderende base, B^- , ved protonoverføring fra syren til vann.

Når en base, B^- , løses i vann får vi dannet hydroksidioner, OH^- , og korresponderende syre, HB, ved tilsvarende protonoverføring fra vann til basen.

Vi bestemmer surhetsgraden i vannløsninger, ved å måle pH.

$\text{pH} = -\log[\text{H}_3\text{O}^+]$.

pH-verdiene varierer vanligvis mellom 0 og 14 og kan settes opp i følgende skala:

$\text{pH} < 7.0$.

i sur løsning

$\text{pH} = 7.0$

i nøytral løsning.

$\text{pH} > 7.0$

i basisk løsning.

4. Eksperimentelt: Test pH med pH-staver. Drypp en dråpe av etanol, eddiksyre, metanol og maursyre på staven. Les av pH ved hjelp av fargeskalaen.

5. Eksperimentelt: Test pH med pH-staver på Coca Cola, melk, lakris, Lovehearts, sitron, såpe, JIF badetrom og JIF kjøkken. Les av pH ved hjelp av fargeskalaen.

Syrenøytraliserende midler

Syrenøytraliserende midler kan være redningen hvis man er plaget av sure oppstøt og halsbrann. Disse midlene inneholder stoffer som nøytraliserer magesyren, for eksempel kalsiumkarbonat (CaCO_3), magnesiumkarbonat (MgCO_3) og aluminiumhydroksid ($\text{Al}(\text{OH})_3$). Du skal bestemme virkestoffet i Samarin som er et populært syrenøytraliserende middel og deretter måle pH på «magesyre» før og etter tilsetning av Samarin.

6. Eksperimentelt:

a) Noter deg virkestoffet i Samarin.

b) Løs Samarin i et begerglass med 25 mL vann. Bruk dosen som er anbefalt på pakningen.

c) Mål opp 25 mL 0,2 M HCl.

d) Mål pH med pH-meter først i løsningen med Samarin og deretter i HCl.

e) Bland sammen løsningene og mål pH med pH-meter.

f) Noter reaksjonslikningen.

Journal kjemi – BIO101

Navn:

1) Hva reagerer? Skriv reaksjonslikning og beskriv reaksjonen der du observerer positiv reaksjon.

2) Hva reagerer? Skriv reaksjonslikning og beskriv reaksjonen der du observerer positiv reaksjon.

3) Hva reagerer? Skriv reaksjonslikning og beskriv reaksjonen der du observerer positiv reaksjon.

4) Sett opp løsningene etter stigende pH.

	Surest			Mest basisk
Forbindelse				
pH				

5) Test av pH i ulike produkter

	Cola	Melk	Lakris	Lovehearts	Sitron	Såpe	JIF kjøkken	JIF bad
pH								

6)

Hva er virkestoffet i Samarin?	
pH Samarin i 25 mL vann	
pH 25 mL 0,2M HCl	
pH Samarin i 50 mL magesyre	

Skriv reaksjonslikning:

Tema: Molekylærbiologi

Hvordan løse en kriminalgåte ved hjelp av biologiske spor

Ansvarlige: Ingrid Malien Duister og Rebekka Moe



Figur 1: Andehuset i andedammen. De ulike studentorganisasjonene har en tradisjon om å male Andehuset i fargene til studentorganisasjonen de tilhører. Bilde fra Tuntreet.

Introduksjon

I denne øvelsen trenger vi deres hjelp til å løse en kriminalgåte.

Natt til torsdag ble andehuset på campus stjålet.

Politiet har gjort undersøkelser på åstedet og **gjort funn av et biologisk spor**. Tre mistenkte er tatt inn til avhør. Hver har avgitt en prøve som må analyseres og sammenlignes med prøven som ble funnet på åstedet. Kan dere finne ut hvem som er den skyldige?



Mistenkt nummer 1: Morten Sørлие



Morten Sørлие var en av tre ansatte som befant seg på KBM tidspunktet da forbrytelsen ble begått. Morten har som vane og jobbe en del netter, uten at kollegene hans forstår hvorfor.

Mistanken mot ham er sterk da Morten ikke har noe alibi. Han har tidligere blitt observert luskende rundt Andedammen. Selv mener han at han har alibi, da loggen på hans PC viser aktivitet hele natta. Han forklarer selv at han ofte går rundt Andedammen, for da kan han kjøpe seg is og tab-extra brus på veien. Siden hans kollega Anne ikke finner ham der, så slipper han å dele iskremen sin med henne.

Mistenkt nummer 2: Gustav Vaaje-Kolstad



Gustav mener selv at han befant seg på kontoret sitt på KBM da forbrytelsen ble begått. Det var ingen andre på jobb i etasjen der Gustav har kontor denne natten, så Gustav har ikke alibi.

Gustav har flere ganger vært i konflikt med de andre foreningene som stadig maler andehuset i fargene til sin studentforening. I tillegg har opplyser kolleger om at de ofte ser rester av rød maling på Gustav sine hender. Dette er rart, da huset til Gustav er hvitt.

Mistenkt nummer 3: Anne Gravdahl



Anne mener hun har alibi for natten da Andehuset forsvant. Hun var i bursdag hos ei venninne i Oslo til langt på natt. Politiet har sjekket dette alibiet, og det viser seg at Anne snakker sant. Noen av de andre på festen opplyste om at Anne kjørte hjem i to tiden på natten. Hun må kjøre forbi NMBU parken for å komme seg hjem. Politiet mistenker derfor at Anne har stoppet ved Andedammen på vei hjem fra Oslo, og stjålet Andehuset.

Hensikten med denne øvelsen er å sammenlikne det biologiske sporet som politiet fant på åstedet med biologiske prøver som de mistenkte i saken har måttet avgi. En DNA-profil må lages for hver av de mistenkte, og denne skal sammenliknes med DNA-profilen fra åstedet.

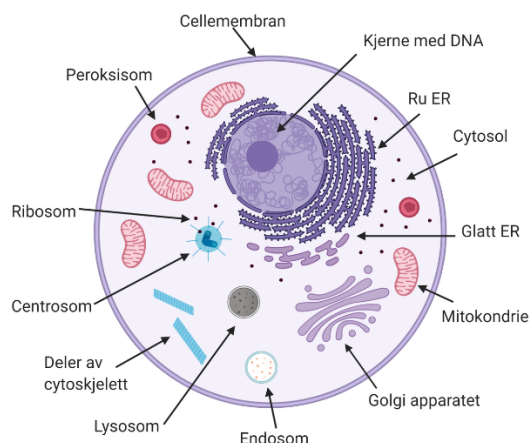
1. Lysering av celler

1.1. Hensikt

På åstedet har man funnet celler. Biologiske prøver tatt av de mistenkte er også celler. For å kunne lage en DNA-profil, trenger man DNA. Vi må åpne cellene slik at de sprekker, og innholdet av cellene kommer ut. Når vi har fått DNAet ut av cellene kan vi lage en DNA-profil.

1.2. Teori

DNA finnes inne i cellene, og for at vi skal kunne arbeide videre med dette DNAet må vi åpne cellene for å få DNA ut. Det å åpne celler kalles for å lysere celler. For å kunne bruke DNA fra celler til å lage en DNA-profil, må vi alltid starte med å lysere cellene.



Figur 2: Tverrsnitt av ei celle. DNAet befinner seg inne i cellekjernen. For at man skal kunne lage en DNA-profil må vi få DNAet ut av cellen. Bilde lånt fra det store norske leksikon.

Det finnes mange måter å lysere celler på. I denne oppgaven skal vi lysere cellene ved hjelp av mekanisk påkjenning. Celleprøvene skal overføres til rør sammen med små glasskuler, og

ristes i en kraftig ristemaskin. I denne prosessen vil cellene bli bombardert av glasskulene slik at de sprekker. Andre metoder for cellelysis er å bruke enzymer eller utsette cellene for store temperaturforskjeller.

1.3. Fremgangsmåte

Dere har fått utdelt et rør som inneholder glasskuler og biologisk materiale fra én av de mistenkte. Andre grupper jobber med biologiske prøver fra de to andre mistenkte. Noter ned hvilken biologisk prøve dere har fått.

1. Behandle prøven to ganger i en MagNA Lyser ved 6200 rpm i 40 sekunder for å lysere cellene.
2. Spinn ned prøven i en sentrifuge ved 13000 rpm i 5 minutter.
3. Overfør supernatanten (væskefasen) til et mikrorør. Pass på å ikke røre pelleten (fast fase). DNAet er nå i supernatanten.

Dere har nå isolert DNA fra den biologiske prøven. Videre skal DNAet brukes til å lage en DNA-profil ved bruk av PCR. DNAet skal også appliseres direkte på gel for å undersøke om DNA-isoleringen var vellykket.

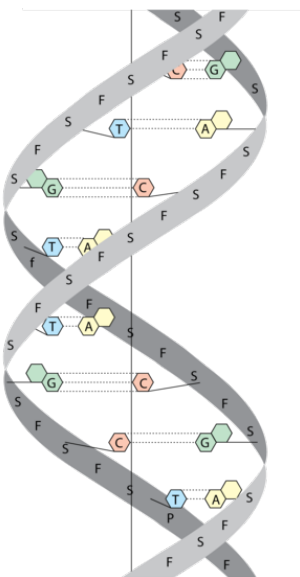
2. PCR på genomisk DNA

2.1. Hensikt

Hensikten med denne deloppgaven er å lage en DNA-profil for de tre mistenkte i saken, som kan sammenlignes med profilen fra prøven som ble funnet på åstedet. For å gjøre dette skal vi bruke en av de viktigste teknikkene i molekylær biologien, polymerase kjedereaksjon. På engelsk heter dette "polymerase chain reaction" og forkortes PCR.

2.2. Teori

PCR- teknikken går ut på å **masseprodusere** den delen av DNA-sekvensen som vi er interessert i (kalles heretter ”**målsekvensen**”). For å kunne gjøre DNA-profilen synlig for oss, så må vi lage millioner av kopier. Utgangspunktet vårt er genomisk DNA fra biologisk materiale fra de tre mistenkte. En etterforsker kan i virkeligheten ta celleprøvene fra munnhulen, hud, blod, eller andre kroppsvæsker.



Figur 3: Bilde av en DNA tråd. Bildet hentet fra det store norske leksikon.

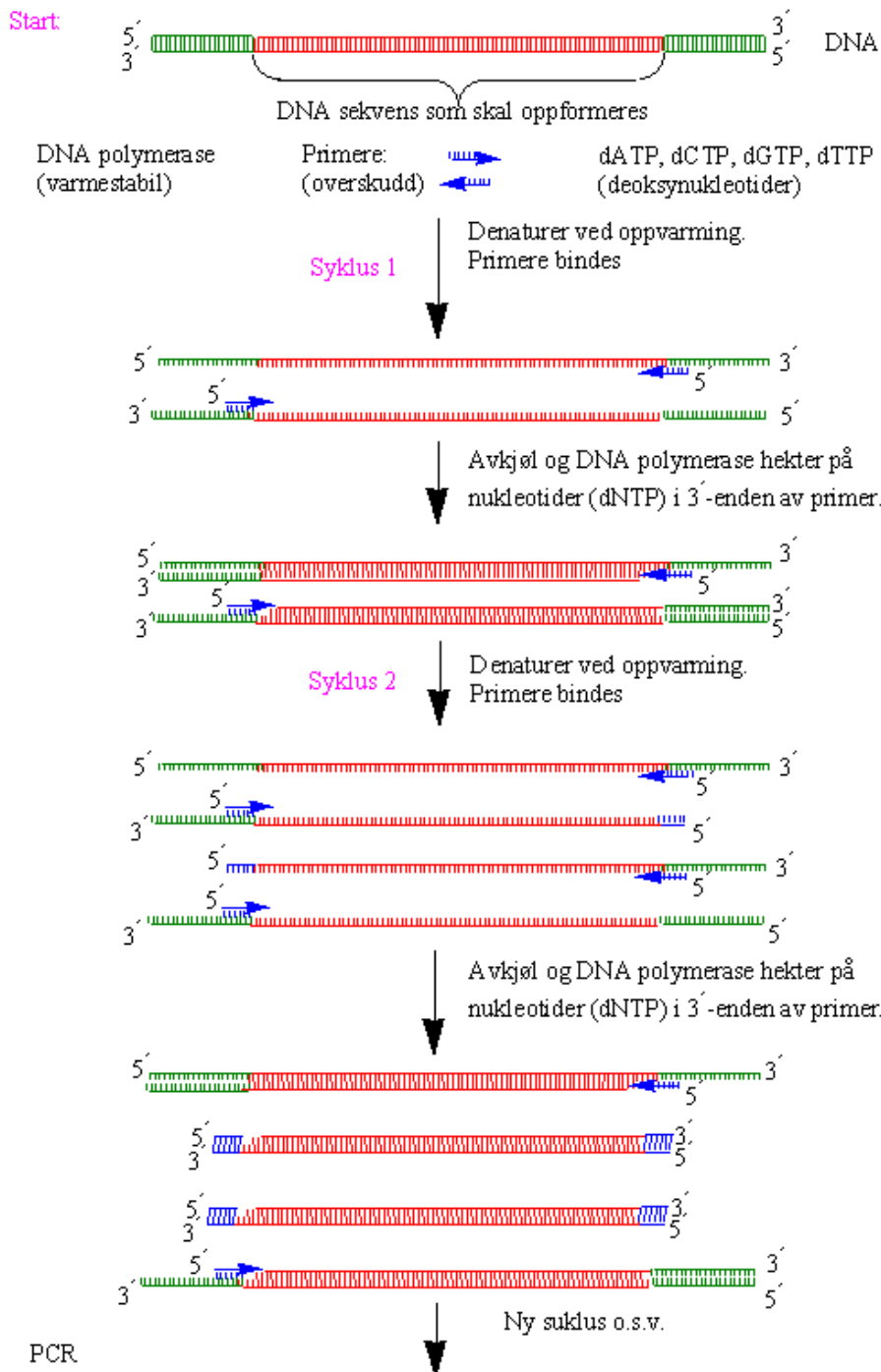
DNA består av 4 baser; Guanin, Cytosin, Adenin og Tymin. Cytosin og Guanin vil alltid danne et basepar, mens Adenin og Tymin vil alltid danne et basepar.

DNA vi bruker som utgangspunkt i PCR-reaksjonen kalles **templat**. Inne i hver eneste celle i en menneskekropp har vi en kopi av hele DNA sekvensen vår. Den består av omtrent $3,4 \cdot 10^9$ (3,4 milliarder) basepar inni hver eneste celle. Det området på DNA sekvensen som koder for et protein kalles et **gen**. DNAet til oss mennesker koder for omtrent 31 tusen gener.

Når vi skal sammenlikne DNA-profilen fra åstedet med de mistenkte sin DNA-profil, kan vi ikke sammenlikne alle 31 000 genene mellom prøven funnet på åstedet og prøvene de mistenkte har avgitt. Vi må velge ut et gen. I denne oppgaven har vi valgt ut genet *vntr*. Dette genet benyttes blant annet i farskapstester. Vi mennesker har to like kromosomer, vi har derfor to stykk *vntr* gener. Ett på hvert kromosom. Noen mennesker har like *vntr* gener på begge kromosomene, mens de fleste har to forskjellige varianter av dette genet. Man får det ene kromosomet fra far, og det andre fra mor. Ulike varianter av *vntr* genet har ulike størrelser. Når man lager en DNA-profil med *vntr* genet, så sammenlikner man størrelsen på *vntr* genet på begge kromosomene.

Når man skal bruke PCR til å lage millioner av kopier av *vntr* genet, så må man kjenne DNA-sekvensen til ca. 20 baser på hver side av target-sekvensen, for å kunne lage primere. En PCR-reaksjon trenger to primere. En primer er en liten DNA bit på omtrent 20 baser som fungerer som et startpunkt for PCR-reaksjonen. Den ene primeren må binde rett oppstrøms for *vntr* genet, og den andre primeren må binde rett nedstrøms for *vntr*.

Når primerne har bundet seg til disse flankerende områdene opp og nedstrøms for *vntr* genet, vil disse fungere som startpunkt for syntese av den nye DNA-tråden. Det er enzymet **DNA polymerase**, som vandrer langs DNA-tråden, leser av DNA-koden på målsekvensen, kobler sammen nye baser og lager en ny tråd som er **komplementær** til tråden som leses av. Vi må derfor alltid tilsette frie baser til en PCR-reaksjon som fungerer som byggesteiner. Disse kalles for **dNTP**.



Figur 4: PCR av templat DNA. Rød farge representerer målsekvensen mens blå farge representerer primere.

Når PCR-reaksjonen er ferdig har man har millioner av kopier av denne bestemte målsekvensen. Det gir oss muligheten for å synliggjøre dette DNAet på en agarosegel. En agarosegel separerer DNA-fragmenter etter størrelse. Vi får to bånd da vi har to kromosomer med et *vntr* gen på hvert kromosom. Hvert menneske har sin unike DNA-profil. På denne måten kan vi finne den skyldige i forbrytelsen, man sammenlikner DNA-profilen fra åstedet med den mistenkte sin profil.

2.3. Fremgangsmåte

I denne PCR-reaksjonen bruker dere DNA fra de lyserte cellene som templat.

Tilsett DNA og alle løsninger i oppskriften under til et PCR-rør. Hold alle rør på is mens dere jobber! Tilsett Taq polymerase helt til slutt. Merk røret med tallet 1, 2 eller 3, etter hvilken mistenkt sitt DNA dere fikk utdelt.

PCR-reaksjonsløsning:

5 µl DNA
2 µl 10x PCR buffer
4 µl dNTP mix
2 µl primer (forward + reverse)
0,5 µl Taq polymerase
6,5 µl dH₂O
Totalt 20 µl

Rørene settes på PCR-maskinen. En PCR-maskin kjører sykluser med ulike temperaturer for de tre stegene i PCR (denaturering, annealing, elongering).

Program:

97 °C – 10 min
94 °C – 45 sek (denaturering)
54 °C – 30 sek (annealing)
72 °C – 1 min (elongering) } 24x

De tre siste stegene repeteres 24 ganger.

For hver syklus doubles antall kopier av målsekvensen.

3. Gelelektroforese

3.1. Hensikt

Hensikten med gelelektroforese er å separere og visualisere DNA-fragmenter av ulik størrelse.

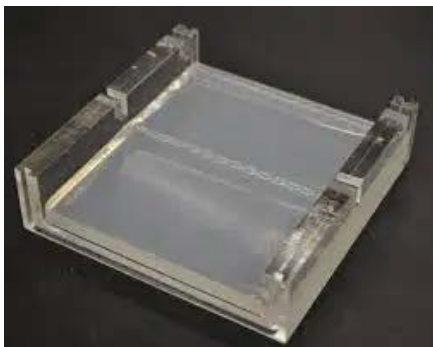
3.2. Teori

Gelelektroforese er en teknikk som går ut på å skille DNA-molekyler etter størrelse. Elektroforesesystemet består av en agarosegel lagt i en bufferløsning. Fordi DNA er negativt ladet, vil det vandre mot den positive polen i et elektrisk felt.



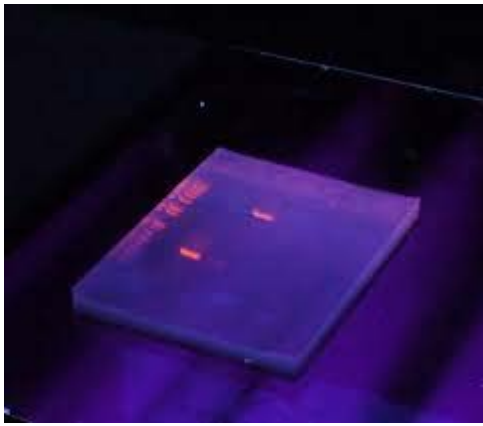
www.biorad.com

Små DNA-fragmenter migrerer raskere i agarosegelen enn større fragmenter. Vi får derfor separert DNA molekyler ut fra deres størrelse. Gelen tilsettes Peqgreen, som binder til DNA og fluorescerer under UV-lys, slik at DNAet blir synlig. For å bestemme størrelsen på DNA-fragmentene, bruker vi en størrelsesmarkør (ladder). Denne markøren har flere fragmenter av kjent størrelse og vi kan sammenlikne hvor langt vårt DNA-fragment har vandret i gelen med ladderen.



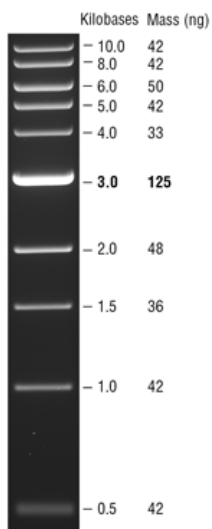
www.jove.com

Vi støper agarosegeler ved å smelte agarosekorn i en buffer. Så heller vi den varme smeltede agarosen over i en form og setter i kammer. Agarosen vil stivne til en gel, og vi kan fjerne kammene. Der kammene har vært, har vi nå fått brønner i gelen. Det er i disse brønnene vi appliserer våre prøver i, før vi setter på strøm og separerer DNA-fragmentene etter størrelse.



www.ntnu.no

Når vi har tilsatt Peqgreen i gelen vil DNAet fluoresere under UV lys. Våre DNA-fragmenter vil derfor lyse opp som bånd på gelen. Ladder er applisert i brønn helt til venstre.



www.neb.com

Ladder vi skal bruke i denne oppgaven heter 1Kb ladder. Denne består av mange DNA-fragmenter med ulik størrelse. Siden vi kjenner størrelsen på alle de ulike fragmentene i ladder, kan vi bruke ladder til å finne ut hvor stort våre DNA-fragmenter er. Da sammenlikner man hvor langt våre DNA-fragmenter har vandret i gelen med hvor langt ladder har vandret. Da kan vi estimere omtrentlig størrelse på våre DNA-fragmenter.

3.3. Fremgangsmåte

Dere får utdelt ferdig lagde agarosegeler. Fordi dere skal skrive lab rapport om dette, står fremgangsmåten under.

Tillaging av 1 % agaroseløsning:

- Vei opp 0,6 gram agarose.
- Tilsett 60 ml 1x TAE.
- Kok opp løsningen i mikrobølgeovnen til alle agarosekornene er fullstendig løst. Pass på at det ikke koker over.
- Kjøøl ned løsningen til ca. 50-60°C
- Tilsett 2 µl Peqgreen og bland forsiktig.

- Hell løsningen i støpeformen, sett i kammen og vent til den er stivnet.
- Fjern kammen fra den stivnede gelen.
- Flytt gelen over i elektroforesekar.
- Hell over 1xTAE buffer til gelen er dekket.

Applisering av prøver og kjøring av gel:

1. Bland 5 µl genomisk DNA (fra del 1) og 5 µl dH₂O i et mikrorør med loading buffer.
2. Bland 5 µl PCR-produkt (fra del 2) og 5 µl dH₂O i et mikrorør med loading buffer.
3. Appliser de to blandinger på hver sin gel.
4. Sett på strøm: 90 V.
5. La gelen kjøre i 30 min.
6. Ta bilde under UV-lampe.

Sammenlign størrelsen av target-sekvensene fra de tre mistenkte med sekvensen fra åstedet.

Hvem er den skyldige?

4. Rapport

Det skal skrives en kort lab-rapport hvor dere beskriver hva dere har gjort og hva dere har funnet ut. Denne rapporten skal også inneholde svar på spørsmålene under. Rapporten skal være på 2-3 sider. Dere skal skrive rapport for alle delene i laboppgaven, selv om lærerne har utført noe for dere. **Isolering av DNA, PCR på genomisk DNA, støping av agarosegeler og selve gelelektroforesen skal beskrives i rapporten.**

Rapporten skal leveres inn i en egen mappe i Canvas. NB! Husk å merke rapporten med navn og e-postadresse!

4.1. Tips til rapportskrivning

- IKKE kopier (klipp-og-lim) fra laboratorieheftet! Skriv med egne ord.
- Ta med bildene av agarosegelene. Disse vil dere vil finne på Canvas. Lag figurtekst og beskriv hva bildene viser.
- Hold rapporten ryddig og oversiktlig, bruk avsnitt!
- Rapporten skal være kort og konsis. Bruk malen («Mal for laboratoriejournal i BIO101») som ligger tilgjengelig i Canvas.

4.2. Spørsmål som skal besvares i rapporten

Svarene skal fortrinnsvis bakes inn i rapporten, eventuelt besvares i et eget avsnitt på slutten av rapporten. Svar kort på spørsmålene, maks. 3-4 setninger.

- Beskriv kort hva som skjer i hvert steg av PCR.
- Hva slags jobb gjør taq polymerase i PCR-reaksjonen?
- Hva skjer med DNAet når vi kjører gelelektroforese?
- Hvorfor må vi tilsette Peggreen til agarosegelen?
- Hvordan kan vi finne størrelsen på våre DNA-fragmenter?
- Hvem er den skyldige i forbrytelsen?

Mikroorganismer i nærmiljøet

2024

Geir Mathiesen, Else Marie Aasen og Kristine Lindtveit

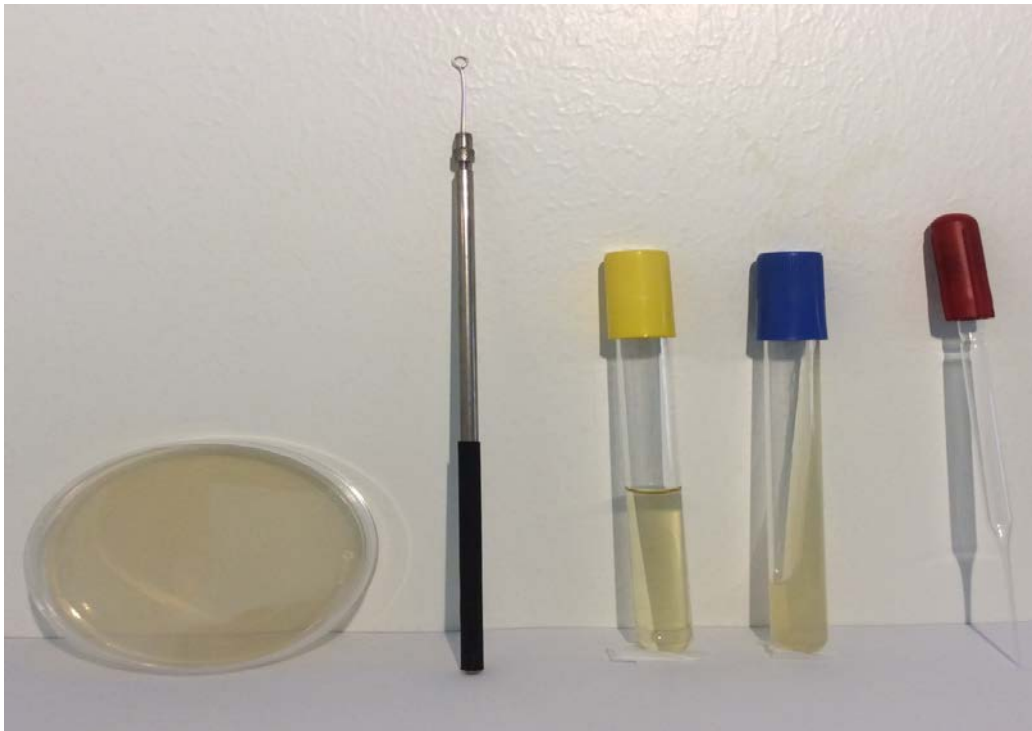
ASEPTISK ARBEIDSTEKNIKK

Mikroorganismer finnes overalt. Når man skal arbeide med mikroorganismer må en ha kontroll på hva man jobber med. For å ha kontroll, og for å lære noe om de enkelte mikroorganismene må vi ofte arbeide med renkulturer. En renkultur, er en kultur som inneholder bare en type mikroorganisme. Siden mikroorganismer fins overalt, vil vårt materiale lett bli forurenset av andre mikroorganismer. For å hindre dette må vi lære oss **aseptisk arbeidsteknikk**. Disse teknikkene går ut på at vi hindrer at:

1. Forsøksmaterialet blir forurenset (kontaminert) av andre mikroorganismer
2. Mikroorganismer fra forsøksmaterialet blir spredd til omgivelsene

For å hindre forurensing må alt utstyr som kan komme i kontakt med forsøksmaterialet være sterilt. Etter bruk må utstyret tas hånd om på en forsvarlig måte. Søl må unngås.

BASISUTSTYR. BRUK OG BEHANDLING



Petriskål

Podeøse

Kulturrør

Pasteur-pipette

Figur 1. Basisutstyr som benyttes i mikrobiologi.

Petriskåler blir brukt til dyrking av mikroorganismer på faste medier. Petriskåler i plast blir levert i sterile pakninger.

Kulturrør med plasthette blir brukt til dyrking av mikroorganismer på faste og flytende medier. Når en bruker faste medier, blir rørene lagt på skrå før mediet (agaren) stivner. Slike rør kalles skråagarrør.

Podeøse blir brukt for å overføre mikroorganismer fra et medium til et annet.

Pasteur-pipetter blir brukt til å ta ut små volumer (fire dråper tilsvarer ca 0,1 ml). Sterile pipetter har en bomullspropp i den øvre enden, og blir oppbevart i et aluminiumshylster. **Ta aldri ut mer enn 1 pipette av gangen, og sett lokket på hylsteret umiddelbart etter at pipetten er tatt ut.** Bruk ”smokk” til oppsuging.

STERILISERING AV UTSTYR

Det meste av utstyret som benyttes er sterilisert på forhånd. Unntak er podeøser, glasstaver og pinsetter som steriliseres under eksperimentet. En bruker da flammen fra en Bunsenbrenner. **Podeøsa** blir sterilisert ved at en holder den på skrå inn i gassflammen til den blir rødglødende. Etter avkjøling er den klar til bruk. Etter bruk må den glødes på nytt for å fjerne rester av podematerialet.

Pinsetter og glass-staver skal først plasseres i 96% etanol. Restene av etanolen blir brent av i gass-flammen. Etanolen vil ta fyr med en gang du setter den inn i flammen. **Ikke** hold glass-staven i flammen, da blir den for varm og glasstaven sprekker. NB! Sprit antennes lett – NB! IKKE SETT VARM GLASSSTAV ELLER PINSETT TILBAKE I SPRITEN!

PLASSERING AV KURSMATERIALE OG BEHANDLING AV BRUKT UTSTYR

Materialer til daglig bruk vil bli utlevert i plastkurver eller settes ut på anviste plasser. Etter at arbeidet er ferdig, skal utstyr til vask plasseres i trillevogn.

Søl på benken må tørkes opp straks og benken vaskes med sprit (70% etanol). Bruk tørkepapir.

NÆRINGSMEDIER OG AGAR

For å kunne leve og vokse må mikroorganismene ha tilgang på næringsstoffer. Næringsstoffene er nødvendige både for syntese av cellemateriale, vekst og for energiproduksjon. Et næringsmedium (ofte bare kalt medium) er en blanding med alle nødvendige næringsstoffer organismen trenger. Ulike mikroorganismer har ulike næringskrav og dette må en ta hensyn til når man skal velge næringsmedium. Et medium som er myntet på en organisme eller en gruppe organismer må inneholde alle de næringsstoffene organismen trenger, og disse må være tilgjengelig i rett konsentrasjon. For liten mengde av et nødvendig næringsstoff vil redusere veksten, mens for høy konsentrasjon av et nødvendig næringsstoff kan virke veksthemmende eller toksisk. Medier blir brukt i fast eller flytende form. For å oppnå et fast medium tilsettes vanligvis agar. **Agar** er et komplekst polysakkarid ekstrahert fra rødalger. Agar har fire egenskaper som gjør det perfekt som geldanner i mikrobiologisk arbeid.

- ✓ Agar smelter ved 100°C og er derfor i fast form i alle temperatur-områder der det er aktuelt å dyrke mikroorganismer.
- ✓ Smeltet agar holder seg flytende ned til ca 45°C. Agarmediet kan derfor blandes med suspensjoner av mikroorganismer uten at organismene blir drept.
- ✓ I stivnet form gir agar en klar og fast gel.

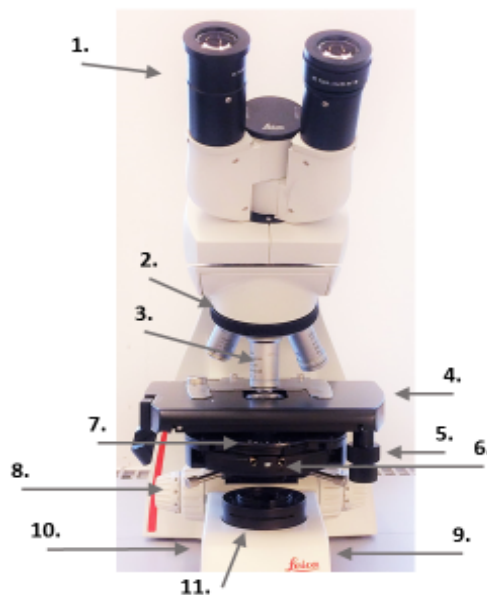
Få mikroorganismer kan bryte ned agar. Agarmedium infisert med mikroorganismer går derfor sjelden over fra fast til flytende form.

LYSMIKROSKOPET, VIKTIGE KOMPONENTER OG BRUK

Mikroskopet er et av de viktigste instrumentene i mikrobiologisk arbeid. Det blir brukt til å studere enkeltceller og den mikrobielle sammensetningen i en prøve (renkultur/blandingskultur) og til å undersøke effekt av ulike forbindelser på mikroorganismene.

Til mikrobiologiske studier kan det benyttes lysmikroskop eller elektronmikroskop. Lysmikroskopet (Fig. 2.) blir brukt i rutineanalyser, og elektronmikroskopet når detaljer i cellestrukturer skal studeres.

1. Okkular
2. Objektivholder med 4 Objektiv
3. Objektiv
4. Preparatbord
5. Skruer for å forflytte preparatbord
6. Fase-ring som skifter mellom lysfelt (H/BF), fasekontrast (PH), og mørkefelt (D).
7. Aperturblender (PH for fasekontrast, variabel PH for Lysfelt)
8. Fin- og grovinnstilling (fokusering)
9. Av/På-bryter
10. Justering for lysstyrke
11. Blender



Figur 2. De viktigste komponentene på et lysmikroskop.

Det fins ulike typer av lysmikroskop:

- ✓ Lysfeltmikroskop
- ✓ Fasekontrastmikroskop
- ✓ Mørkefeltmikroskop
- ✓ Fluorescensmikroskop

I dette kurset skal vi bruke de to første typene.

Lysfeltmikroskopi blir brukt til elementært mikroskopiarbeid. Med dette mikroskopet blir cellene gjort synlige på grunn av forskjell i kontrast mellom cellene og omgivelsene. Kontrasten oppstår fordi cellekomponentene absorberer og sprer lyset i forskjellig grad. Siden forskjellen i kontrast

mellom bakterieceller og det omgivende mediet er liten, er det vanskelig å se ufargede bakterier i et lysfeltmikroskop. Man bør derfor benytte et fiksert og farget preparat hvis man skal se på bakterier, mens større mikroorganismer som sopp, gjær, protozoer og alger kan studeres ufarget (levende preparat).

Fasekontrastmikroskopet ble utviklet for å kunne se små celler uten at de er farget. Teknikken bygger på at celler har en annen brytningsindeks enn det omgivende mediet. Forskjellen blir utnyttet til å skape et bilde med vesentlig høyere grad av kontrast enn det en kan oppnå med lysfeltmikroskopi.

Grensen for hvor fine detaljer en kan se i et vanlig lysmikroskop er bestemt av oppløsningsevnen til linsene. **Oppløsningsevnen** er den minste avstanden det kan være mellom to punkt uten at de flyter sammen når en ser de i mikroskopet.

Oppløsningsevnen er avhengig av bølgelengden til lyset, og av diameter og brennvidde på objektivlinsene og kondensorkonsen (numerisk apertur) og av kvaliteten på linsene. For å øke aperturen og dermed oppløsningsevnen for 100x objektivet, plasseres immersjonsolje mellom preparatet og objektivet. Den maksimale oppløsningsevnen for lysmikroskopet vil da være cirka 300 nm / 0.3µm/ 0.0003 mm. Immersjonsolje skal kun benyttes på 100x objektiv.

Rettledning for bruk av Leitz/Leica med lysfelt/fasekontrast/mørkefelt kondensor

Generelt

1. Slå på strømmen med bryter (nr. 9 i Figur 2)
2. Juster avstanden mellom okularene (nr. 1) så den er lik avstanden mellom øynene dine
3. Kontroller med fin- og grovskruen (8) at preparatbord står i øverste stilling (skal alltid stå i øverste stilling)
4. Legg inn preparatet mellom klammene på preparatbordet (4) og fokuser med fin- og grovinnstillingen (8)

Lysfeltmikroskopi

1. **Still fase-ring (6) på H (BF) og aperturblenderen (7) på PH (Tab. 1)**
2. Juster lysstyrken med justeringsbryteren for lysstyrken (10)
3. Juster slik at det du mikroskoperer kommer i fokus vha justeringskruen (8)
4. Ved skifte av objektiv, ta opp igjen punktene 1-3

Fasekontrast/mørkefelt mikroskopi

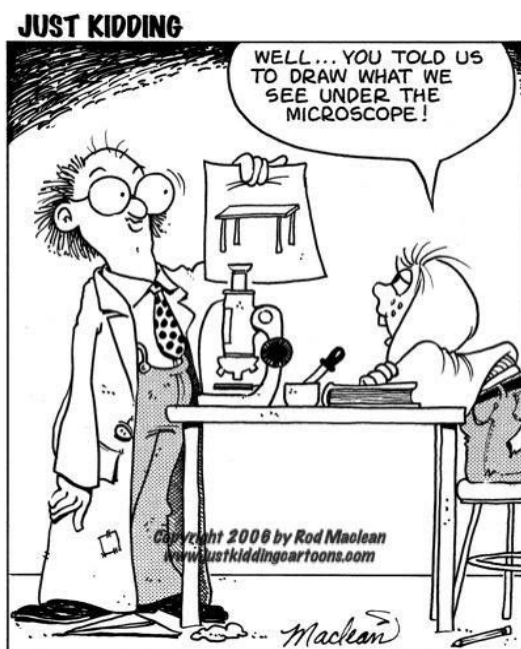
1. **Kontroller at aperturblenderen står på PH**
2. Still inn rett fase-ring (6). Se tabell 1
3. Juster lysstyrken med bryter (10)

4. Juster slik at det du mikroskoper kommer i fokus vha justeringskruen (8)
5. Ved skifte av objektiv ta opp igjen punktene 2-4

Tabell 1. Innstilling av mikroskopet på lysfelt og fasekontrast.

Objektiv	Stilling på fasering*		Type	Innstilling av aperturblender
	Grått Leitz	Hvitt Leica		
4x, 10x, 25x, 40x, 100x	H	BF	Lysfelt	Variabel-PH
10X	1	PH1	Fasekontrast	PH
25X, 40X	2	PH2	Fasekontrast	PH
100X	3	PH3	Fasekontrast	PH

*Fasekontrastobjektivene er merket med hvilken fasering de skal brukes sammen med.



MIKROORGANISMER I NÆRMILJØET

Første kursdag

(2 studenter pr lag)

Utstyr:

- 1 flaske smeltet KPG-agar
- 1 flaske smeltet Malt-agar
- 12 sterile Petriskåler
- Ferdigstøpt KPG, Malt-agar skåler
- Sterile Q-tips
- Jord
- 70 % etanol (til vask av benk)
- Næringsmidler
- Plastposer til inkubering av skålene

1A. Støping av skåler

OBS! Den ene studenten på laget støper 6 KPG-agar skåler, den andre 6 Malt-agar skåler

1. Plasser 6 Petriskåler på benken
2. Merk skålene med forsøksnummer (skal brukes i forsøk **1C**), agartype (KPG eller Malt), dato og navn/initialer
3. Hent en flaske med riktig næringsagar fra varmeskapet som er innstilt på 50°C
4. Skru av korken på flasken. Løft lokket på en av skålene slik at flaskehalsen så vidt kommer inn under lokket. Hell til ca. 3/4 deler av bunnen er dekket med agar. Legg på lokket og roter umiddelbart skåla forsiktig til agaren dekker bunnen.
5. Støp resten av skålene. En flaske vil normalt gi **seks** ferdigstøpte skåler. **Pass på at du har tømt flasken.**
6. La skålene stå i ro på benken til næringsagaren har stivnet (skal brukes i forsøk **1C**)

1B. Isolering av sopp og bakterier fra luft

1. Merk 2 ferdigstøpte KPG og 2 Maltagar skåler med **1B**
2. Skålene skal eksponeres på samme plass (lokket fjernes i henholdsvis 2 min og 15 minutter) på ulike steder i og utenfor Bioteknologibygningen. Finn et sted du vil gjøre eksponeringen. Hvor tror du det er mye mikroorganismer?
3. På eksponeringsstedet ta av lokkene på 2 KPG og 2 Maltagarskåler og legg lokkene på kanten av sin bunnskål med toppsiden opp. Vent i 2 minutter før du legger lokket på

en KPG og en Maltagar skål, vent deretter i 13 minutter til før du legger på de siste to lokkene. Merk skålene med eksponeringssted og eksponeringstid!

1C. Isolering av sopp og bakterier fra jord, vann og oss selv

OBS! Begge studentene på gruppa skal gjøre forsøket i punkt 2, 5 & 6, her deler du skålen i to sektorer med tusj. Skål 3 skal deles i tre sektorer

1. Merk skål **1** med "kontroll"
2. Merk skålene **2 uvasket finger**. Stryk en uvasket finger fra samme person lett over overflaten i den ene halvdel av KPG og Maltagarskålen, bruk samme finger. Den andre studenten gjentar forsøket med sin uvaska finger i den andre halvdel av skålene. Legg på lokket,
3. Merk sektorene på skål **3** med stedene du tar prøvene fra. Stryk Q-tips på dørhåndtaket inn til WC (første dør, ikke døra inne på toalettet), en fra håndtaket på utsiden og en fra innsiden av døra. Stryk Q-tipsen deretter utover agaroverflaten både på KPG og Maltagarskålene. Del skålene i flere sektorer med tusj. Ta også en prøve ved hjelp av Q-tips fra et selvvalgt sted og stryk deretter ut på agarskålene. Legg på lokket.
4. Merk skål **4 jord fra ?**. Ta litt jord med en Q-tips og stryk den utover agaroverflaten både på KPG og Maltagarskålen. Legg på lokket.
5. Merk skål **5 vann**. Fukt en Q-tips med vann fra andedammen og fra en vannkran på laben og stryk den utover agaroverflatene, begge skålene. Legg på lokket.
6. Merk skål **6 Navle**. Ta en prøve ved hjelp av Q-tips fra navlen din og stryk ut på agaroverflaten, begge skåler. Begge skal også gjøre dette, del skåla. Legg på lokket.

1D. Isolering av sopp og bakterier fra næringsmidler

1. Ta en rosin, tørket tomat, blåbær eller med en pinsett og rull den litt i Malt-agarskålen. Legg på lokket (**la næringsmidlet ligge på skåla**) og merk skålen.

2. Merk alle skålene med initialer og legg de i en pose (**9 skåler per student**) og inkuber alle skålene ved 25°C.



Figur 3. Frukt angrepet av sopp.

Andre kursdag



Figur 4. Agarskål med vekst av mikroorganismer

Hent alle skålene dine i inkubatorskapet. Vekst vil vise seg som små prikker (kolonier) på overflaten av næringsagaren. Kolonier av bakterier og gjær vil være glatte, mens kolonier av andre sopper vil være trådformede og ha en matt, eller ”ullen” overflate (Fig. 4). Du skal gruppere koloniene som glatte (bakterier + gjær) eller trådformede (hyfesopp), bestemme antall kolonier, og gi en kort beskrivelse av koloniens utseende fra de ulike forsøkene (fyll inn i tabell 2).

1B. Isolering av sopp og bakterier fra luft

Eksponeringssted:

Tabell 1 vil være en felles tabell for eksponerte skåler fra alle grupper. Fylles ut på tavla (skal med i journalen).

Tabell 2. Antall kolonier på de eksponerte skålene.

Eksponeringstid	KPG		Malt	
	Glatte	Trådformet	Glatte	Trådformet
2 minutter				
15 minutter				
Nedfall pr. minutt*				

*Benytt tallene fra 15 minutter for å beregne (om mulig)

Overfør tabell 2 til journalen og beskriv utseendet til utvalgte kolonier. Før inn eksponeringssted og nedfall pr. minutt i tabell 1 på tavla.

I journalen skal du også føre inn utvalgte resultater fra de andre studentgruppene fra eksponeringen både inne og ute (Tabell 1/Canvas). Diskuter resultatene.

1C. Isolering av sopp og bakterier fra jord, vann og oss selv

Tabell 3. Beskriv koloniene, og om mulig angi antall glatte kolonier (bakterier + gjær) og trådformede kolonier (mycelsopp).

Isolert fra	KPG		Malt (Hagem)	
	Glatte	Trådformet	Glatte	Trådformet
1. Kontroll				
2. Uvasket finger*				
3. Dørhåndtak-inn				
3. Dørhåndtak-ut				
3. Selvvalgt sted				
4. Jord				
5. Springvann/andedam				
6. Navle*				

*Sett inn tall fra begge studenter, skill tallene med /. Før tabellen inn i journalen og diskuter resultatene.

1D. Isolering av sopp og bakterier fra næringsmidler

Beskriv hva du ser på agarskålene og dokumenter eventuelt med egne bilder.

Spørsmål (besvares i journalen):

1. Hva er formålet med kontrollskålen?
2. Hvorfor avsettes prøver både på KPG – og Maltagarskålen?
3. Er det ulike organismer på ulikt næringsmedium? Eventuelt hva skyldes dette?
4. Hvorfor varierer antall mikroorganismer mellom ulike eksponeringssteder?

MIKROSKOPERING AV LEVENDE MIKROORGANISMER

Utstyr:

Kulturskåler fra forsøk 1B, 1C og 1D (Egne agarskåler med sopp, gjær- eller bakteriekolonier, og næringsmidler).

Renkulturer av:

Bacillus megaterium (Bakterie),

Saccharomyces cerevisiae (Gjær),

Botrytis cinerea (Hyfesopp).

Objektglass

Dekkglass

Linsepapir

Vann

Pasteurpipetter

Podeøse

Stereolupe
Mikroskop

1E. Mikroskopering av mycelsopp

1. Still inn på objektiv 4X.
2. Sett petriskåla med lokk med renkultur eller egen kultur på objektbordet.
3. Tegn og beskriv (størrelse, farge) hva du ser (mycel, konidiesporer, konidoforer).
Hvis du ikke får godt bilde i mikroskopet, sett skåla under stereolupa i stedet.

Tegn/ ta bilde av det du ser. Inkluder noen i journalen og sett navn på organismen og dens strukturer (se Fig. 5, side 15).

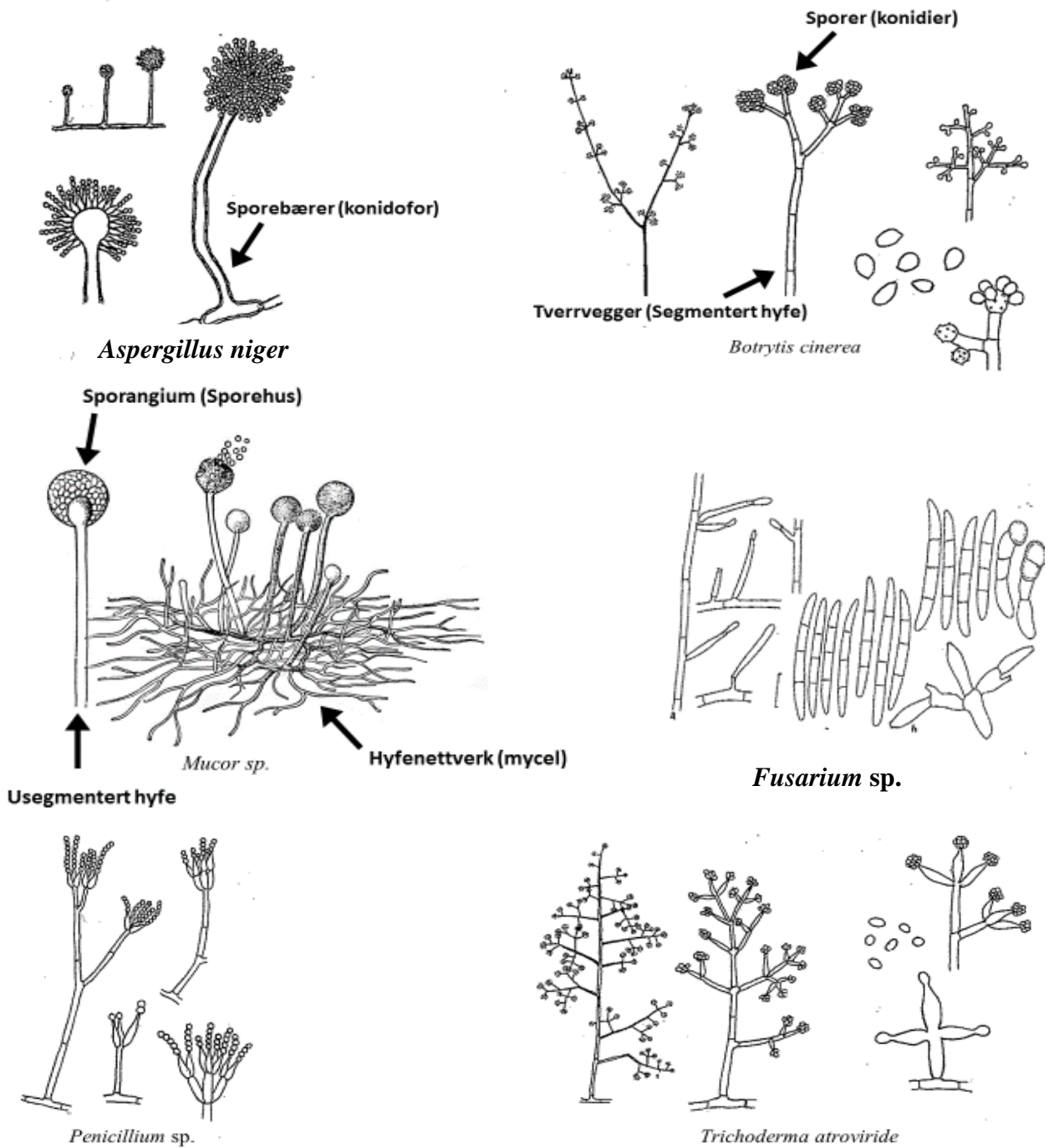
1F. Mikroskopering av bakterier og gjær

1. Plasser en dråpe vann på objektglasset ved hjelp av en Pasteurpipette
2. Ta prøver fra enkeltkolonier (minst en bakterie og en gjærkoloni på hvert sitt objektglass) med podeøsa og rør den ut i vandrdråpen (**kulturen skal bli svakt blakket**).
3. Legg på et dekkglass og press dekkglasset ned med neglen. Mikroskoper med 10X objektivet med fasekontrast (kondensor-ring 1/PH1, blender på PH)
4. Når du ser preparatet klart i mikroskopet, vri over til 40X objektiv, og still kondensoringen på 2/PH2, blender på PH.
5. **Tegn/Ta bilde med mobilen av organismene** fra en del av synsfeltet **i journalen** (noter **hvilken forstørrelse** du har benyttet på mikroskopet).

Spørsmål (besvares i journalen):

1. Hvilken form har *Bacillus megaterium*?
2. Hvilken form har gjær?
3. Hva vil det si at gjær har knoppskyting?
4. Hva er den/de viktigste forskjellene på bakterier og gjær som du kan se i mikroskopet?

Muggsoppkulturer



Figur 5. Tegning av sporer (konidier), sporebærere (konidioforer), ulike hyfer med tverrvegger (segmentert hyfe) og hyfenettverk (mycel).

Sammensetting av næringsmedier

FASTE MEDIER:

Mediene er sterilisert ved autoklaving ved 121°C i 20 minutter

KPG-agar (SORT STREK):

Nutrient broth (kjøttekstrakt + pepton)	8.0 g
Gjærekstrakt	0.5 g
Agar	15.0 g
Springvann	1000 ml

Malt-agar (RØD STREK):

Maltekstrakt	5.0 g
Glukose	5.0 g
NH ₄ NO ₃	0.5 g
KH ₂ PO ₄	0.5 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0.5 g
Agar	15.0 g
Springvann	1000 ml

Tema: Biokjemi og mat

Tove G. Devold & Gustav Vaaje-Kolstad

Del 1: Ulike metoder for å felle ut proteiner i melk og soyamelk.

Del 2: Amylase fra spytt, nedbrytning av stivelse.

Denne labøvelsen består av to deloppgaver. Det skal skrives en journal for hver del. Journalen skrives ihht de retningslinjer som er gjennomgått i dette emnet. Man trenger kun å levere en journal per gruppe (bruk gruppeinnlevering i Canvas). Prøv i størst mulig grad å bruke dine/deres egne ord når journalen skrives.

I del 1 skal vi demonstrere hvorledes proteiner fra ulike råvarer (melk og soyamelk) kan isoleres (oppkonsentreres, felles ut) ved å foreta endringer i pH (surhetsgrad), ionestyrke (konsentrasjon av salt) eller ved tilsetning av spesielle enzymer. Slike metoder er utgangspunkt for å lage ost av melk og tofu av soyamelk, men som vi skal se virker ikke de tre metodene for å isolere proteiner like godt i melk og soyamelk, og det har igjen betydning for hvordan melk og soyamelk behandles på meieri og «soyamelk-fabrikk» for å fremstille ost og tofu som vi kan kjøpe i butikken.

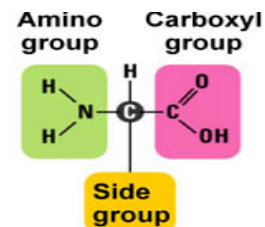
I del 2 skal vi studere hvordan enzymet amylase fra vårt eget spytt bryter ned stivelse.

Proteiner og aminosyrer

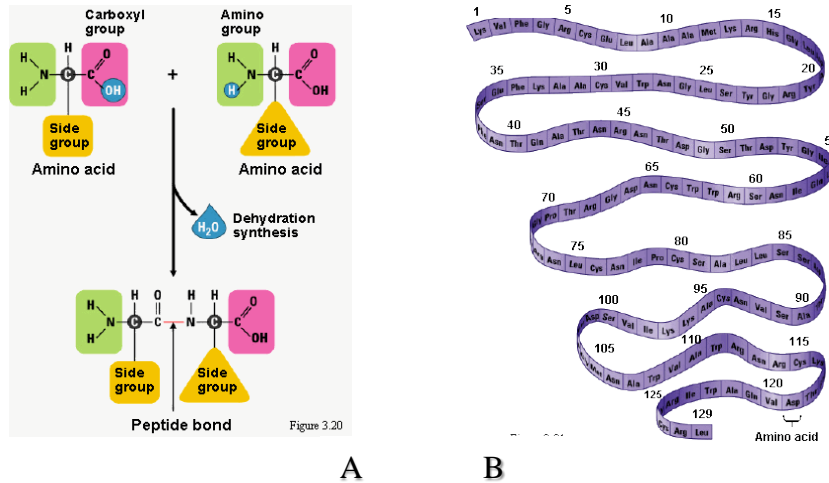
Proteiner er bygget opp av aminosyrer. Det finnes i alt over 400 ulike aminosyrer, og 20 av disse inngår som byggesteiner i proteiner. Aminosyrene som inngår i proteiner består av en aminogruppe (-NH₂), en syregruppe (-COOH) og en sidekjede (R-gruppe) som alle er bundet til ett og samme karbonatom (C), se Figur 1.

Aminosyrene i et protein er bundet sammen via peptidbindinger som dannes mellom syregruppa i en aminosyre og aminogruppa i "nabo" aminosyra. Peptidbindingene danner "ryggraden" i proteinet og aminosyrenes sidekjeder peker ut fra denne, se Figur 2.

Sidekjedene har stor variasjon i kjemiske egenskaper, og aminosyrene deles inn etter sidekjedenes egenskaper. Det er vanlig å dele dem inn i to hovedgrupper; hydrofile og hydrofobe aminosyrer (Figur 3). Legg merke til at hovedgruppe 1 består av flere ulike undergrupper.

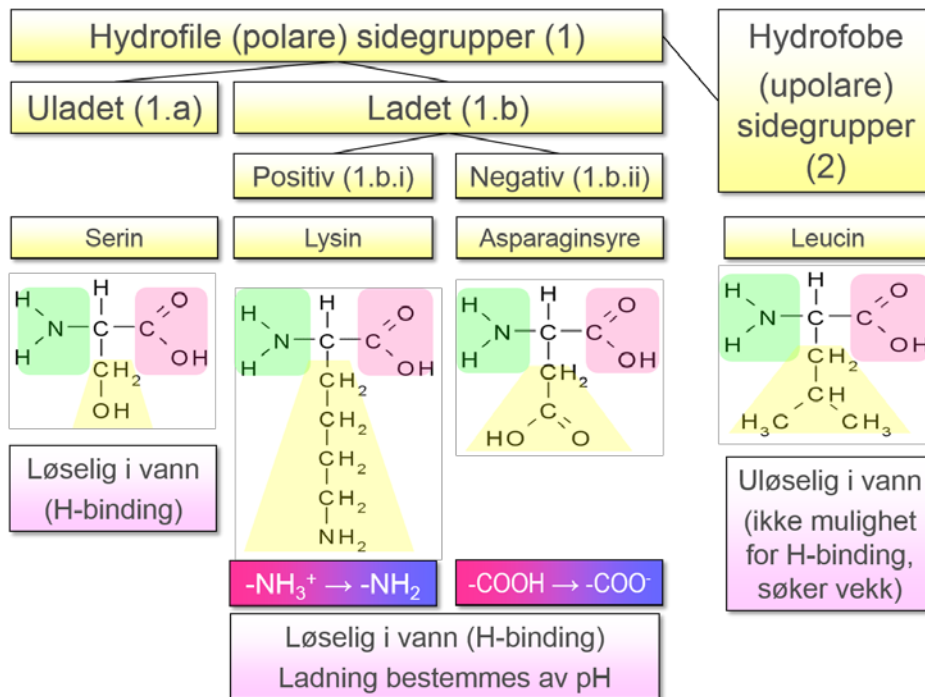


Figur 1. Generell formel for en aminosyre.



Figur 2. A. To aminosyrer danner et dipeptid via en peptidbinding. B. Protein som består av 129 aminosyrer.

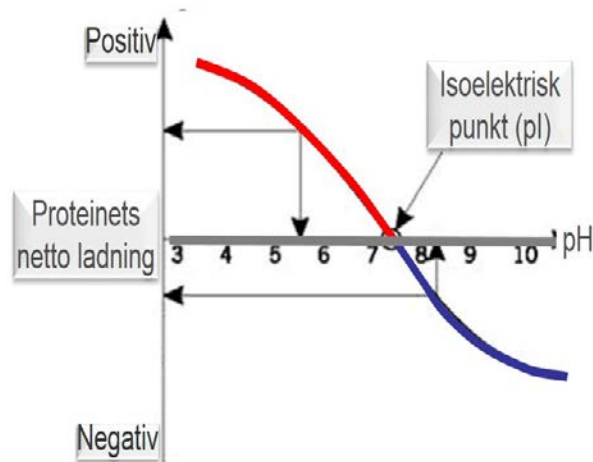
1. **Aminosyrer med hydrofile (polare) sidekjerder** (Hydrofil - "som elsker vann")
 - a. Uladede polare sidekjerder (som eksempel har vi valgt serin).
 - b. Ladede polare sidekjerder
 - i. Positivt ladete sidekjerder (som eksempel har vi valgt lysin).
 - ii. Negativt ladete sidekjerder (som eksempel har vi valgt asparaginsyre).
2. **Aminosyrer med hydrofobe (upolare) sidekjerder** (Hydrofob: "som hater vann"), som eksempel har vi valgt leucin.



Figur 3. Inndeling av aminosyrer etter sidegruppene sine egenskaper.

Aminosyrene med hydrofile sidekjerder (både gruppe 1.a og 1.b) løses godt i vann fordi de er polare og kan danne hydrogenbindinger med vann molekylene. Det er viktig å merke seg at ladningen til de positive og negative ladete sidegruppene (gruppene 1.b.i og 1.b.ii) er avhengig av pH i løsningen som omgir dem (se Figur 3).

Ved den pH-verdien som kalles for isoelektrisk punkt (pI) har protein molekylet like mange negative som positive ladde sidegrupper og molekylet vil derfor være elektrisk nøytralt. Ved denne pH verdien og i pH-området omkring denne, vil løseligheten til proteinet i vann være minimal noe som kan føre til at proteinmolekylene aggregerer (danner interaksjoner med hverandre) og feller ut (danner «klumper» eller bunnfall). Ved pH-verdier som er forskjellig fra pI vil proteinmolekylene være ladet og de vil derfor frastøte hverandre, noe som igjen fører til økt løselighet, se Figur 4 som viser sammenhengen mellom pH og ladning for et protein.



Figur 4. Sammenheng mellom pH og ladning for et protein. Y-aksen viser proteinets nettoladning, x-aksen representerer pH skalaen.

Når $pH > pI$ vil proteinmolekylet ha en negativ overskuddsladning, og når $pH < pI$ er overskuddsladningen positiv.

Det er viktig å merke seg at i de fleste proteiner er de hydrofobe aminosyrene "begravet" i proteinets indre deler. Proteinkjeden kan ofte være kveilet opp som et "nøste" eller som en fiber-liknende struktur.

Proteinenes egenskaper bestemmes av

- det totale antall aminosyrer (50 – 25.000), dette bestemmer proteinmolekylets størrelse
- antall av de 20 ulike aminosyrene
- fordeling av de ulike gruppene av aminosyrer; hydrofile vs hydrofobe. Er disse jevnt fordelt eller «konsentrert» i enkelte områder?
- molekylets form: kuleformet (globulært) eller mer langstrakt
- typene aminosyrer på molekylets overflate; mest hydrofile aminosyrer på overflaten gir en hydrofil overflate og molekylet har god løselighet i vann, er det en høy andel av hydrofobe aminosyrer på overflaten vil dette redusere løselighet i vann og slike hydrofobe områder vil fungere som «knutepunkter» mellom ulike proteinmolekyler

Enzymer

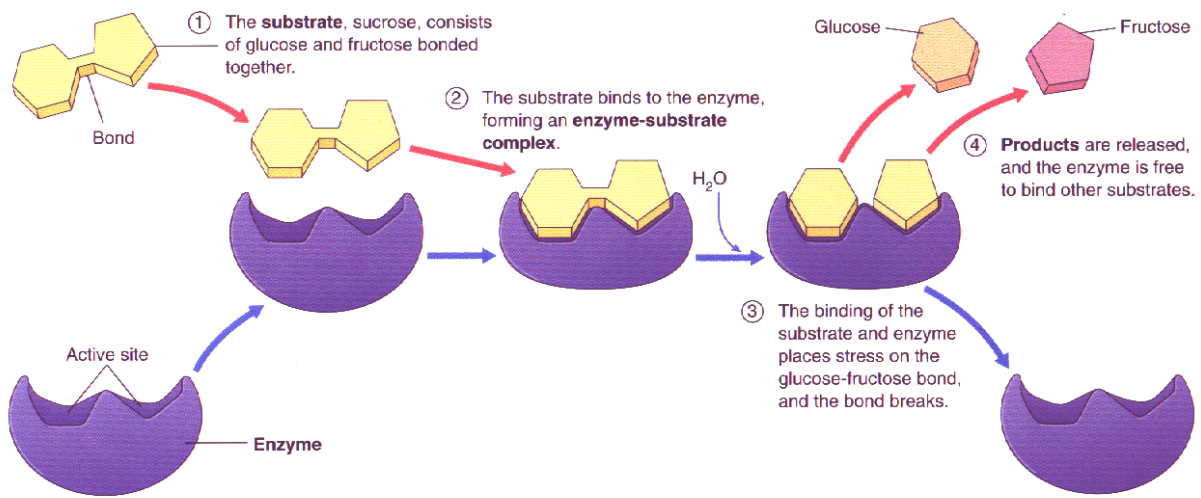
Enzymer er en spesiell type proteiner som katalyserer ulike kjemiske reaksjoner (dvs de blir ikke selv brukt opp under reaksjonen) i og utenfor alle levende celler, slik som vist i Figur 5. Stoffet som enzymet «angriper» omtales som substrat, og stoffet (stoffene) som dannes etter den kjemiske reaksjonen utført av enzymet kalles produkt(er). Enzymer er svært spesifikke; de virker kun på ett eller få substrater og danner ett eller kun få produkter. De klassifiseres etter hvilke type substrat de virker på og hvilke kjemisk reaksjon de katalyserer.

Enzymer er essensielle komponenter i alle levende celler ved at de sørger for at biokjemiske reaksjoner forgår i riktig hastighet og «rekkefølge» etter organismens behov.

I denne oppgaven skal vi benytte to typer enzymer; amylase (del 2) og proteinase (del 1) som bryter ned hhv stivelse og proteiner. Begge disse enzymene er såkalte hydrolaser, og reaksjonen de katalyserer kalles for hydrolyse fordi den forbruker et molekyl vann pr binding som brytes.

Amylaser bryter ned stivelse til glukose. Se del 2.

Proteinaser er enzymer som bryter peptidbindinger i proteiner, slik at proteinene blir brutt ned i mindre deler (peptider). Reaksjonen går motsatt vei i forhold til hva som er angitt i Figur 2A. Se del 2.



Figur 5. Skjematisk illustrasjon av virkemåten til et enzym. Enzymet bindes til sitt substrat (sukrose i eksemplet), katalyserer en kjemisk reaksjon, dvs dannelsen av produkter (glukose og fruktose), frigjøres og er igjen klar for å utføre den samme reaksjonen på nytt.

Del 1: Ulike metoder for å felle ut proteiner i melk og soyamelk.

Tove G. Devold tovede@nmbu.no, Tora Asledottir tora.asledottir@nmbu.no

Innledning

Proteiner er sammen med karbohydrater og fett, hovedkomponentene i kosten vår. Proteiner er viktig for vekst og normal utvikling og bidrar med energi, nitrogen og essensielle aminosyrer (som ikke kroppen vår kan syntetisere selv). I denne øvelsen skal vi demonstrere hvorledes proteiner fra ulike råvarer kan isoleres og være utgangspunkt for produksjon av ulike matprodukter. Vi skal bli kjent med ulike «strategier» som kan benyttes for å isolere proteiner, og vi skal se at ikke alle «strategiene» er like effektive for å isolere alle typer proteiner. Råvarene som skal benyttes i dette forsøket er melk og soyamelk (også kalt soyadrikk). Melk og soyabønner som er utgangspunkt for produksjon av soyamelk, er viktige proteinholdige råvarer.

De «strategiene» vi skal benytte er a) tilsetning av syre, b) tilsetning av spesielle salter og c) bruk av enzymer. Vi har valgt å benytte melk og soyamelk som utgangspunkt for dette forsøket sammen med syre i form av saltsyre, salt i form av kalsiumklorid og en spesiell type enzymer; proteinaser, som ”angriper” proteiner.

Hensikten med denne øvelsen er å demonstrere på en enkel måte at proteiner i ulike råvarer har ulike egenskaper og at de prosessene som skal benyttes for å lage ulike produkter må tilpasses disse egenskapene. Slik kunnskap er særdeles viktig når proteiner fra nye eller lite benyttede råvarer skal tas i bruk. Dette er en av de store utfordringene når det gjelder produktutvikling ved overgang til et mer plantebasert kosthold og når det skal lages såkalte analog-produkter av planteråvarer til erstatning av produkter basert på kjøtt og melk. Det er idag mange ulike plantebaserte analog-produkter på markedet og både antall produkter og salgsvolum er økende. Det kan være verdt å ta en titt på ingrediens-lista (innholdsfortegnelsen) og sammenligne med opprinnelig produkt, f.eks. sammenligne en vegansk ost med en «vanlig» gulost. Ofte kan det være til dels store forskjeller både i næringsinnhold og antall ulike tilsetningsstoffer og mengde brukt av disse når plantebaserte analog-produkter sammenlignes med opprinnelig produkt. En viktig grunn til dette er nettopp at proteiner i fra ulike planter har andre egenskaper enn de proteinene vi finner i melk og kjøtt.

Proteolytiske enzymer (proteinaser).

Proteinaser er enzymer som bryter peptidbindinger i proteiner, slik at proteinene blir brutt ned i mindre deler (peptider) og til slutt til aminosyrer. Slike enzymer produseres i sekresjonsceller i ulike deler av fordøyelsessystemet hos dyr og mennesker og deltar i nedbrytning av proteinene i maten vi spiser. I magesekken produseres pepsin, og trypsin og chymotrypsin produseres i bukspyttkjertelen. Proteinene brytes ned til mindre deler (peptider og aminosyrer) som blir absorbert i tynntarmen.

Enzymet som benyttes i denne øvelsen er chymosin (også kalt løpe) som er produsert av en rekombinant bakterie. Produktet går under handlesnavnet Chymax, og benyttes i meieri-industrien til produksjon av gulost (f.eks. Norvegia og Jarlsberg). Chymosin produseres i fordøyelsessystemet til drøvtyggere så lenge de dier, og enzymets oppgave er å koagulere melka og bryte ned proteinene slik at de kan tas opp i fordøyelsessystemet. I tidligere tider ble løpe produsert fra kalvemager, nå der det mest brukes løpeproduktet Chymax.

Melkesammensetning og proteiner i melk.

Kumelk består av cirka 3,3 % protein, 3,9 % fett, 4,6 % laktose (melkesukker), 0,65 % mineraler (Ca, P, Mg, K, Na, Zn, Cl, Fe, Cu, sulfat) og vann. Innholdet av de ulike næringsstoffene vil variere avhengig av laktasjonstidspunkt (tidspunkt etter at melkeproduksjonen begynner, dvs tidspunkt etter nedkomst), genetiske faktorer, rase, fôring og kuas helsetilstand. Melk fra andre pattedyr inneholder de samme næringsstoffene med mengdene kan variere til dels mye mellom ulike arter.

De fleste melkeproteiner finnes bare i melk. Tradisjonelt deles melkeproteiner inn i to grupper: kaseiner ("ostestoff") og myseproteiner. I resten av denne øvelsen skal vi kun konsentrere om kaseinene.

Det finnes 4 ulike typer kaseiner; α_{S1} -, α_{S2} -, β - og κ - kasein. I melka finnes kaseinene i store aggregater som kalles kaseinmiceller. En kaseinmicelle består av flere tusen molekyler av de fire ulike kaseinvariantene som er nevnt over og holdes sammen av forskjellige kjemiske interaksjoner mellom kasein-molekylene. Det ytre "laget" av micellene består av κ - casein. En spesiell del av proteinkjeden dette kaseinet stikker ut fra overflaten som "hår", se Figur 2A. Ved den pH-verdien som normalt er i fersk melk, har "hårene" negativ ladning. Dette bidrar til at micellene frastøter hverandre. Dersom denne negative ladningen reduseres eller fjernes, blir kaseinmicellene ustabile, dvs de kan ikke lenger frastøte hverandre og felles ut (presipiteres, «klumper seg»). Prosessene som er beskrevet nedenfor benyttes i meieriindustrien til å produsere ulike typer kasein pulvere. I tillegg er disse prosessene også blant de innledende trinn i produksjon av ulike ostetyper.

Isolering av kasein med syre (isoelektrisk presipitering)

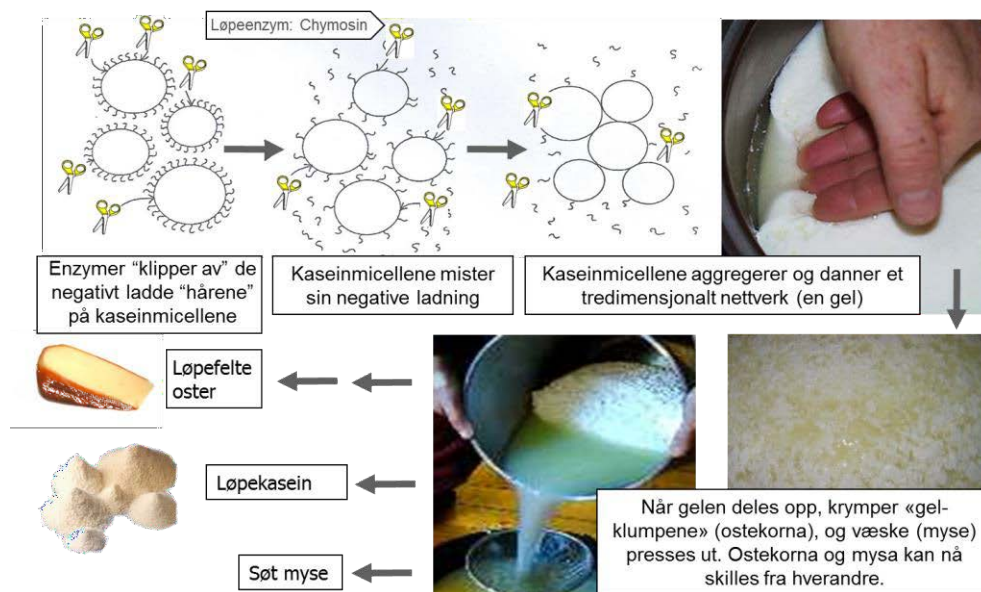
Ved melkas normale pH har kaseinmicellene en negativ overskuddsladning som nevnt over. Når vi senker pH til kaseinmicellenes isoelektriske punkt (pH 4,6) ved å tilsette syre, blir micellene elektrisk nøytrale (ingen nettoladning). De kan ikke lenger frastøte hverandre, løseligheten avtar og de vil felles ut. Syrekasein produseres industrielt på denne måten; utløselig (utfelt) kasein separeres fra "resten" og tørkes. Syrekasein har lav grad av løselighet og benyttes som ingrediens i ulike matprodukter.

Såkalte syrefelte oster (f. eks. kremoster) produseres også ved utfelling av kasein med syre, men i dette tilfellet tilsettes melka en bakteriekultur som produserer ulike organiske syrer som bidrar til at pH synker og at kaseinet feller ut når riktig pH nås.

Isolering av kasein med løpeenzymer - produksjon av løpekasein

Når løpeenzymer tilsettes til melk ved nøytral pH, vil enzymene "klippe av" (hydrolysere) den negativt ladde delen av κ -kasein som stikker ut fra overflaten på kaseinmicellene, se Figur 1. Kaseinmicellene mister sin negative overskuddsladning (uten at pH i løsningen forandres). De kan ikke lenger frastøte hverandre og vil nå danne interaksjoner (bindinger) med hverandre. Det dannes et tredimensjonalt nettverk av kaseinmiceller, dette kaller vi en gel eller koagel. Vi observerer dette ved at melka blir «stiv» eller «puddingaktig». Når denne gelen deles i mindre biter, krymper proteinnettverket og væske presses ut (på samme måte som når man kryster en svamp). Disse gelbitene (også kalt ostekorn) kan nå skilles fra væsken.

Løpekasein produseres industrielt på denne måten; gelbitene av kasein separeres fra "resten" og tørkes. Løpekasein har lav grad av løselighet og benyttes som ingrediens i ulike matprodukter. Slik isolering av kasein med løpe er også første trinn i produksjon av gulost (Norvegia, Jarlsberg mm).



Figur 1. Isolering av kasein med løpeenzymmer – produksjon av løpekasein

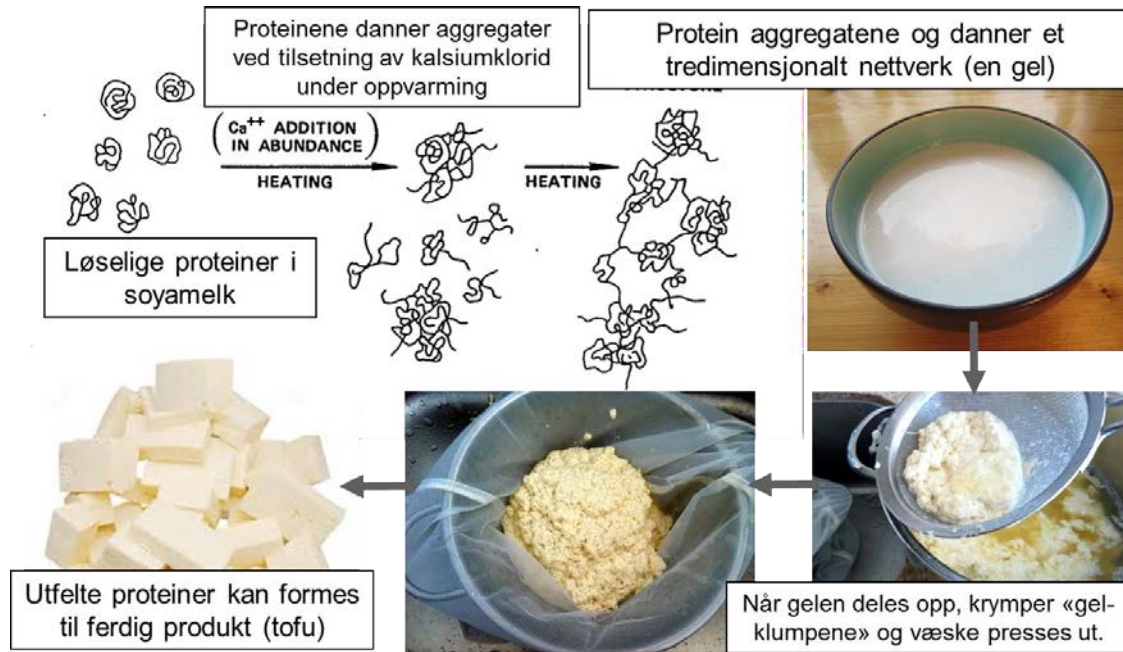
Sammensetning av soyabønner og soyamelk.

Tørre soyabønner består av ca 40% protein, 20% olje, 35% karbohydrat og 5% mineraler. Proteinene i soya bønnene består av to hovedtyper; 10 % albuminer (som er vannløselige) og 90 % globuliner (som er løselige i svake saltløsninger). De «viktigste» globulinene er glycinin og beta-conglycinin, i tillegg finnes mindre mengder av ulike enzymer og trypsin inhibitorer. Innhold av sistnevnte bidrar til at rå soya bønner er giftige for mennesker og andre enmagede dyr, og er årsaken til at alle soya produkter må varmebehandles slik at inhibitorene denatureres (ødelegges).

Soyamelk fremstilles fra tørkede bønner som legges i bløt og deretter homogeniseres. Selve soyamelken er den løselige delen etter at bunnfallet er skilt vekk. Soyamelk inneholder ca 90 % vann, 3 % protein, 1,6 % fett, 1,6 % karbohydrat og 0,5% mineraler.

Isoalsjon av proteiner fra syamelk med kalsiumklorid - Produksjon av tofu.

Tofu fremstilles ved tilsetning av kalsium- eller magnesiumsalter til soyamelk under oppvarming. De toverdige Ca og Mg ionene danner interaksjoner med negativt ladde sidegrupper på proteinene se Figur 2. Over tid blir soyamelken «stiv» og vi får det vi kaller en gel. Når gelen skjæres opp i mindre biter, blir en del av væsken den inneholder presses ut. Nå kan soyaprotein gel bitene skilles fra væsken og presses sammen i former til tofu.



Figur 2. Isolering av proteiner fra soyamelk ved tilsetning av kalsiumklorid under oppvarming – produksjon av tofu.

Utstyr og reagenser

- Melk (hmelk, TINE) og soyamelk (Alpro)
- Saltsyre (1 M)
- Løpe (ferdig fortynnet)
- Kalsiumklorid (6 %)
- Blåtopp sentrifugerør (50 ml)
- Pasteur pipette (Kun til dråper og "ca" mengder, brukes til dosering av syre, lut, kalsiumklorid og løpe: 20 dråper ~ 1 ml)
- Skjeer og spateler
- Sentrifuge
- pH-meter
- Vannbad (30 °C)
- Vannbad (70 °C)



Blåtopp rør (50 ml)



Pasteur-pipette

Fremgangsmåte

- 1) Mål opp 20 ml melk i 3 blåtopprør og 20 ml soyamelk i 3 blåtopprør (tilsammen 6 rør). Mål pH i ett rør med melk og ett med soyamelk.

Legg merke til at i de tre behandlingene under så er fremgangsmåten den samme for pkt c, d, e og f.

2) **Behandling med løpe**

- a) Tilsett ca. 1 ml løpe (20 dråper) fra en Pasteur-pipette til ett rør med melk og ett rør med soyamelk og bland godt.
- b) Inkuber rørene ved 30 °C i ca 30 min i vannbad, ikke rist på rørene underveis.
- c) Ta ut rørene og observer eventuelle endringer. Hva har skjedd?
- d) Rør opp innholdet i rørene med en skje eller spatel og observer endringer. Hva skjer?
- e) Sentrifuger rørene ved 2.000 g i 5 min.
- f) Har det blitt dannet bunnfall? I tilfelle hvor mye? Les av antall ml på skalaen på røret.

3) **Behandling med kalsiumklorid**

- a) Tilsett ca. 1 ml kalsiumklorid løsning (20 dråper) fra en Pasteur-pipette til ett rør med melk og ett rør med soyamelk og bland godt.
- b) Inkuber rørene ved 70 °C i ca 30 min i vannbad, ikke rist på rørene underveis.
- c) Ta ut rørene og observer eventuelle endringer. Hva har skjedd?
- d) Rør opp innholdet i rørene med en skje eller spatel og observer endringer. Hva skjer?
- e) Sentrifuger rørene ved 2.000 g i 5 min.
- f) Har det blitt dannet bunnfall? Og hvor mye? Les av antall ml på skalaen på røret

4) **Behandling med saltsyre (pH 4,6)**

- a) Tilsett saltsyre dråpevis fra en Pasteur-pipette, pH skal til slutt være 4,6 ($\pm 0,1$). Begynn med å tilsette 20 dråper til ett rør med melk og 25 dråper til ett rør med soyamelk. Tilsett ca 5 dråper av gangen og miks godt før du tilsetter mer. Observer eventuelle endringer. Kan du se at proteinene feller ut («klumper seg»)? La rørene stå i 5 min og rist noen ganger underveis slik at syren får blandet seg

med innholdet i røret.

- b) Mål pH i begge rørene og juster til pH 4,6 hvis nødvendig med mer saltsyre (dråpevis). Observer eventuelle endringer. Hva skjer?
- c) Sentrifuger rørene ved 2.000 g i 5 min.
- d) Har det blitt dannet bunnfall? Og i tilefelle hvor mye? Les av antall ml på skalaen på røret

Sammenlign mengde bunnfall i alle rørene. Var de tre typene behandling like effektive for å felle ut proteiner i melk og soyamelk? Mengde bunnfall sammenlignes med prøver som er sentrifugert uten å tilsettes løpe, salt eller syre. Disse prøvene lages av labpersonalet. Resultatene presenteres i tabellform, se under.

Tabell 1. Resultater for pH målinger og mengde bunnfall i melk og soyamelk behandlet med løpe, salt og syre.

	pH	Mengde bunnfall etter sentrifugering (mL)			
		Ubehandlet*	Løpe	Kalsiumklorid	Saltsyre
Melk					
Soyamelk					

*Lages av labpersonalet

Journal skriving

Lab journalen skrives som beskrevet innledningsvis (side 1). Den skal inneholde svar på spørsmålene nedenfor, og de passer best i diskusjonsdelen av journalen..

- Hva er den normale pH-verdien i melk og soyamelk?
- I hvilken type «melk» felles proteinene ut med tilsetning av
 - Løpe?
 - Saltsyre?
 - Kalsiumklorid?
- Sammenlign mengde bunnfall i alle rørene. Var de tre typene behandling like effektive for å felle ut proteiner i melk og soyamelk?
- Stemmer dette med hva vi forventet basert på teorien som er presentert i introdelen til denne øvelsen?

Litt ekstra info om pH og pH måling

Begrepet pH og surhet er også gjennomgått i «kjemi-øvelsen». Nedenfor følger en kort forklaring:

pH (Hentet fra <http://no.wikipedia.org/wiki/PH> og forkortet)

pH er en måleenhet for surhetsgrad i vannløsninger. En nøytral løsning, rent vann, har en pH på 7. Løsninger med pH under 7 er sure, de som har pH over 7 er basiske. De fleste stoffer har pH mellom 0 og 14, men pH-verdier under null og over 14 forekommer.

Definisjon: Det som bestemmer hvorvidt en løsning er sur eller basisk er konsentrasjonen av H⁺-ioner (egentlig H₃O⁺-ion). Ved standard trykk og temperatur er ca. ett av ti millioner vannmolekyler spaltet på denne måten. Konsentrasjonen av H⁺-ioner måles i mol per liter, også kalt molaritet og er i rent vann 1×10⁻⁷ mol/l. Konsentrasjonen kan variere over mange størrelsesordner og det er derfor praktisk å innføre følgende definisjon av pH:

$$\text{pH} = -\log_{10} [\text{H}^+]$$

Det er minustegnet i formelen som gjør at en lavere pH-verdi tilsvarer en løsning med høyere konsentrasjon av H⁺-ioner. Når pH måles med et pH-meter er dette basert på at vannets elektriske ledningsevne er proporsjonal med konsentrasjonen av H⁺-ioner.

pH måling:

1. Elektroden på pH-meteret skal alltid oppbevares i en buffer løsning når den ikke er i bruk. I denne øvelsen er pH-meteret ferdig kalibrert, slik at det er klart til bruk.
2. Før bruk skylles elektroden forsiktig i destillert vann. Elektroden må behandles med forsiktighet, ikke dytt den mot harde underlag eller bruk den som «rørepinne».
3. Når pH skal måles, i en løsning dyppes elektroden forsiktig ned i løsningen og løsningens pH verdi leses av på displayet på pH-meteret.
4. Etter bruk skylles elektroden i destillert vann og plasseres i bufferløsningen.



Tema: Biokjemi del 2

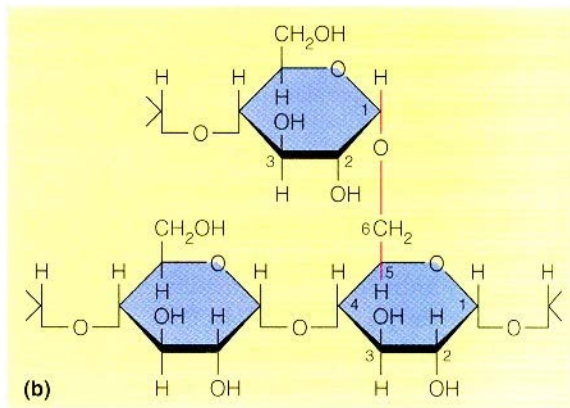
Enzymer

Utarbeidet av Ellen Hasle Kokkim og Gustav Vaaje-Kolstad

Stivelse og stivelsesnedbrytende enzymer

Stivelse utgjør en av hovedbestanddelene av maten vår. Også mange dyr har stivelse som viktig næringskilde. Stivelse lages (syntetiseres) i en rekke planter og fungerer som opplagsnæring. Eksempler på stivelsesrike planter er ris, mais, hvete, potet, sorghum og kassava. Overgangen fra jeger-samler samfunnet skjedde ved at man startet dyrking av slike planter. I likhet med cellulose og glykogen er stivelse en polymer av monomeren glukose som er bundet sammen med såkalte glukosidiske bindinger. Dette er altså en lagringsform av glukose, dvs. energi. Energien som stivelsen utgjør kommer fra plantens fotosyntese.

I stivelse, og i likhet med i glykogen, er bindingene mellom glukose-enhetene α -(1-4) og α -(1-6), se Figur 5.

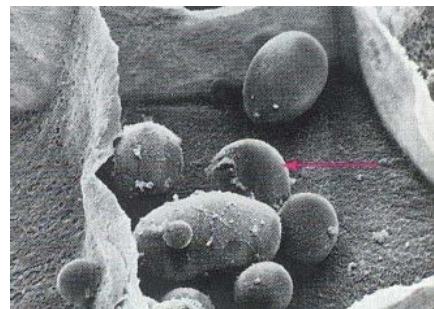


Figur 5. Den kjemiske strukturen til stivelse.

Siden det er to typer bindinger gir det muligheter for flere typer stivelse. Den typen som har kun α -(1,4)-bindinger (dvs. uten sidekjeder) og 500 til 2000 glukose enheter kalles amylose. De strukturene som også har α -(1,6) får en forgrenet glukose-polymer som kalles amylopektin. Forgreningsfrekvensen her er ca. 1 pr. 25 glukose-enheter. Lagringsformen for glukose i dyreriket heter glykogen og har omtrent 1 forgrening pr. 12. glukose-enhet noe som gir bedre vannløslighet.

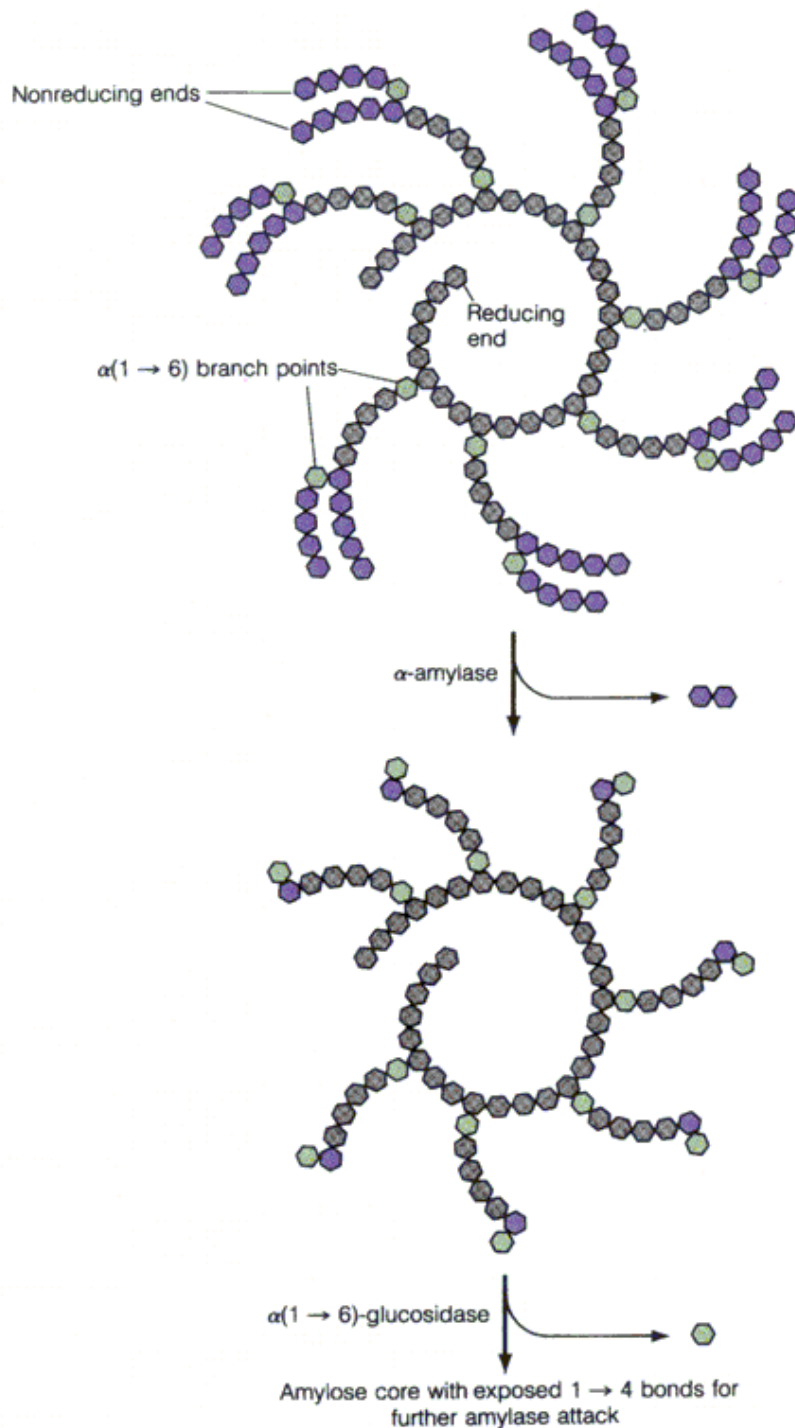
Stivelse er derimot uløselig i vann ved romtemperatur og lagres i plante-cellene som små granuler (Figur 6). Her er stivelsen beskyttet fra vann og enzymer.

Den lagrede energien som stivelsen utgjør kan nyttiggjøres av forskjellige organismer ved bruk av stivelsesnedbrytende enzymer. Den vanligste er α -amylaser som bl.a. finnes i spytt og bukspyttkjertel hos mennesket. Alfa-amylase finnes også i bakterier og kan framstilles industrielt fra disse. Alfa-amylase spalter av



Figur 6. Elektronmikroskopbilde av stivelsesgranuler.

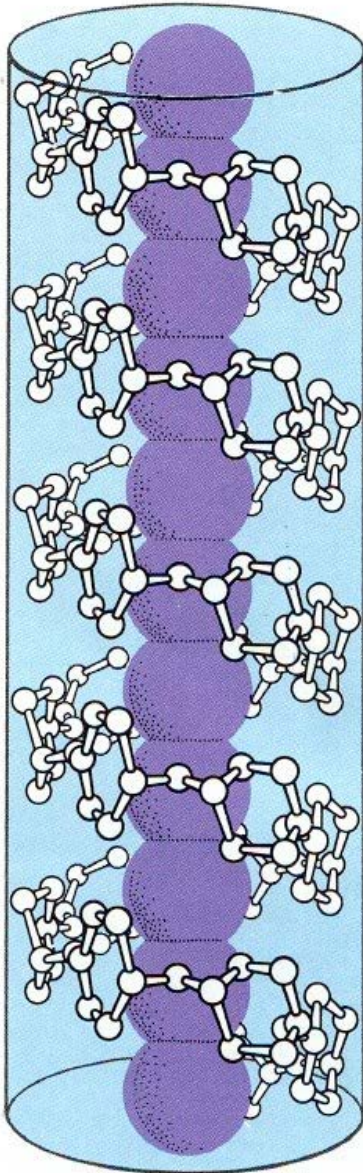
disakkaridet maltose fra stivelsens α -(1-4)-bindinger (Figur 7, øvre del). For å spalte α -(1-6) bindinger trengs enzymet isomaltase som også heter α -(1-6)- glukosidase eller “avgrenings-enzymet” (Figur 7, nedre del).



Figur 7. Nedbrytning av stivelse med α -amylase (øvre del av figuren) og isomaltase (nedre del av figuren).

Slike spaltninger av stivelse kan lettest studeres ved å blande en jod-forbindelse med stivelsen. Stivelsesmolekylet har en heliks struktur (vindetrapp-liknende) som har plass til trijodid inne i trappestrukturen (Figur 8) med en blåfarge som det synlige resultat.

Ved nedbrytning av stivelsesmolekylet vil heliks-strukturen ødelegges og blåfargen forsvinner.



Figur 8. Stivesheliks med trijodidmolekyler bundet på innsiden av «vindeltrappstrukturen».

Forsøksprotokoll: Nedbrytning av stivelse med enzymet α -amylase.

Forbered dere ved å se en video av hvordan forsøket gjennomføres i canvas for BIO101 (Biokjemi modulen).

Utstyr og reagenser

- 0,1M HCl (brun glassflaske)
- 0,1M kaliumfosfatbuffer pH 6,0 (bruk glassflaske)
- 1% stivelse (brun glassflaske)
- Kaliumtrijodid (KI_3), 0,01 M (står i avtrekk, NB! bruk hansker og vernebriller)
- α -amylase 0,3 U/ml (ependorfrør som står på is)
- Potetekstrakt (i ependorfrør som står på is)
- Destillert vann (dH_2O – i spruteflaske)
- Stoppeklokke (mobiltelefon), 18 glassrør, pipetter og kyvetter.
- Spektrofotometer

Utførelse

Merk 6 rør til reaksjonsblandingen fra 1 til 6.

Rist flasken med stivelses-løsning godt før bruk

Tilsett 500 μ l stivelse og 500 μ l kaliumfosfatbuffer til hvert rør.

Gjør klar 6 rør som merkes fra 1HCl til 6HCl.

Tilsett 1ml HCl til hvert rør.

Gjør klar 6 rør som merkes fra 1 KI_3 til 6 KI_3 .

Tilsett 1ml KI_3 til hvert rør.

Du er nå klar til å starte reaksjonene. Start og stopp reaksjonene som angitt i tabellene nedenfor. Bruk stoppeklokke til å telle ned tiden slik at hver reaksjon varer nøyaktig 15 min. Sett stoppeklokka på 20 min og 30 sekunder. Da har du 30 sekunder på deg til å gjøre alt klart for igangsetting av første prøve som du da gjør når nedtellingen viser 20:00.

Kontroller at du har alt innen rekkevidde før du starter nedtellingen i minutter.

Bland godt i alle rør når løsningen under er tilsatt og reaksjonen startes.

Tid (min:sek)	Start enzymreaksjon	Type prøve
20:00	Tilsett 100 μ l dH_2O til rør 1	Negativ kontroll parallell 1
19:00	Tilsett 100 μ l dH_2O til rør 2	Negativ kontroll parallell 2
18:00	Tilsett 100 μ l α -amylase til rør 3	Positiv kontroll parallell 1
17:00	Tilsett 100 μ l α -amylase til rør 4	Positiv kontroll parallell 2
16:00	Tilsett 100 μ l potetekstrakt til rør 5	Potetekstrakt parallell 1
15:00	Tilsett 100 μ l potetekstrakt til rør 6	Potetekstrakt parallell 2

Etter 15 minutter (følg tabellen under) stoppes reaksjonen ved å overføre 100 μ l av enzymreaksjonen til HCl-røret. Bland godt.

For å påvise stivelse overfører vi 100 μ l fra HCl-røret til KI_3 -røret. Bland godt.

Jod danner et blåfarget kompleks med stivelse.

Tid (min:sek)	Stopp enzymreaksjon	Påvisning av stivelse
5:00	Overfør 100 μ l fra rør 1 til 1 HCl	Overfør 100 μ l fra rør 1HCl til 1 KI ₃
4:00	Overfør 100 μ l fra rør 2 til 2 HCl	Overfør 100 μ l fra rør 2HCl til 2 KI ₃
3:00	Overfør 100 μ l fra rør 3 til 3 HCl	Overfør 100 μ l fra rør 3HCl til 3 KI ₃
2:00	Overfør 100 μ l fra rør 4 til 4 HCl	Overfør 100 μ l fra rør 4HCl til 4 KI ₃
1:00	Overfør 100 μ l fra rør 5 til 5 HCl	Overfør 100 μ l fra rør 5HCl til 5 KI ₃
0:00	Overfør 100 μ l fra rør 6 til 6 HCl	Overfør 100 μ l fra rør 6HCl til 6 KI ₃

Overfør så innholdet i KI₃ rørene til plastkyvetter som du merker med navnet på prøven. Overføringen av løsningen kan gjøres enten ved å helle direkte fra glassrøret til kyvettene eller ved å bruke pipette. Nå er du klar til å lese av prøven med spektrofotometeret. Jodstivelses-komplekset absorberer lys ved bølgelengde $\lambda=620$ nm. Absorpsjonen til prøvene ved denne bølgelengden avleses i spektrofotometeret. For å nullstille instrumentet kan du benytte dH₂O.

Journal skriving

Lab journalen skrives som beskrevet innledningsvis (side 2). Den skal inneholde svar på spørsmålene nedenfor.

Oppgaver:

- 1 Regn ut gjennomsnittsverdiene av de parallelle reaksjonene. Sammenlign gjennomsnittsverdiene. Hva forteller de oss?
- 2 Hvilke A₆₂₀-verdier forventer vi dersom vi tilsetter 1000x konsentrert α -amylase?

Tema: Bioinformatikk

Ansvarlig: Torgeir R. Hvidsten

Dokumentet som beskriver oppgaven og alt dere skal gjøre i bioinformatikk lab'en finner dere utelukkende digitalt i Canvas. Grunnen til dette er i hovedsak at det inneholder en god del lenker, og disse oppdaterer vi fra tid til annen, så derfor vil en «hardcopy» som dette heftet raskt kunne bli utdatert.

Logg dere inn på Canvas, gå til BIO101, og under Moduler (venstre marg) finner dere Labkurs, og sist av disse Bioinformatikk. Klikk dere inn på Labøvelse i bioinformatikk.

På en våt-lab er et papir-hefte fint, det kan vel fort bli litt klin? I bioinformatikk (tørr-lab) jobber vi utelukkende på en PC, og derfor er det mer hensiktsmessig med en ren digital løsning der.