

NO-kemi 2017

Utvinning av ett bakteriedödande protein från ägg

- en enkel och billig laboration med jonbyteskromatografi

Rickard Hedman
2017 augusti 9

Introduktion

Visste du att äggvita, saliv och tårvätska kan ta död på bakterier? Gemensamt för alla dessa vätskor är att de innehåller det antibakteriella (bakteriedödande) proteinet lysozym. Hos människor är den en del av immunförsvaret och i äggvita finns det där för att skydda ägget mot bakterietillväxt. Lysozyms bakteriedödande egenskaper gör det användbart i många situationer och produkter. Det används bland annat vid tillverkning av ost och som konserveringsmedel. Det kan till och med hittas i tandkräm (kolla innehållsförteckningen för Zendium nästa gång du är i affären).

För att kunna studera lysozym eller för att kunna använda det i tandkräm eller vid osttillverkning måste det först renframställas. Med det menas att det måste separeras från övriga ämnen som finns i ursprungsmaterialet, till exempel ägg. Rening av ämnen från biologiska källor är en av grundbultarna inom biokemin. I den här laborationen ska vi rena lysozym från äggvita med en metod som kallas för jonbyteskromatografi och sedan undersöka om det fungerar.

Det är välkänt att äggvita är ett proteinrikt livsmedel. Det är däremot mindre känt att det mesta av vitans protein består av bara 7 olika typer av proteiner. Ett protein som kallas för ovalbumin är vanligast och utgör över hälften av proteininnehållet. Lysozym är det minst vanliga av dessa 7 proteiner och utgör bara ca 3 % av det totala proteininnehållet.

Lysozym har en egenskap som skiljer det från de övriga 6 rikligt förekommande proteinerna i äggvita - det är starkt positivt laddat under basiska förhållanden ($\text{pH} > 7$). Det här utnyttjar man för att rena det från äggvita med jonbyteskromatografi. Principen är att man låter äggvitans proteiner komma i kontakt med ett material (en jonbytarmassa) som har en negativ elektrisk laddning, då kommer lysozym fastna på materialet eftersom positiva laddningar dras till negativa laddningar. De övriga proteinerna repelleras från materialet och fastnar därför inte. De oönskade proteiner sköljs sedan helt enkelt bort så att man bara har kvar materialet med fastbundet lysozym. För att få lysozymet att lossna tillsätter man en lösningen med mycket salt. Salter består av positivt och negativt laddade joner som också kan binda till materialet respektive lysozymet. Tillsätts mycket salt kommer dessa lite förenklat "omringa" lysozymet och materialet och förhindra att de binder till varandra. Följaktligen släpper lysozymet från materialet som då kan avlägsnas och man har en ren lösningen med lysozym.

Materiel:

Äggvita

1 kaffefilter, blekt eller oblekt

250 mL glycinbuffert pH 9,2 (25 mM)

1/2 tsk (1,5 g) natriumklorid(s)

Ett provrörsställ för eppendorfrören

6 st eppendorfrör

7 st eppendorfrör (m. säkerhetslock) med *Micrococcus luteus*-lösning (*Micrococcus lysodeikticus*)

7 st eppendorfrör (m. säkerhetslock) med Bradfordreagens - OBS innehåller metanol, fosforsyra och coomassie blå. Se säkerhetsdatabladet. Använd skyddsglasögon, labrock och skyddshandskar undvik spill och jobba försiktigt.

1 glasflaska, gärna med lock, alternativt en erlenmeyerkolv

1 spatel eller sked

1 sax

1 st mätcylinder 50-100 mL

Pasteurpipetter samt en bägare med vatten för rengöring

alternativt

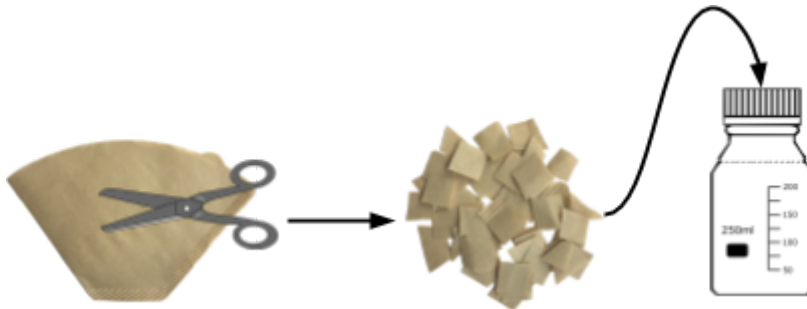
1 st mikropipett (100-1000 uL) med pipettspetsar

“Slaskbägare” med påse

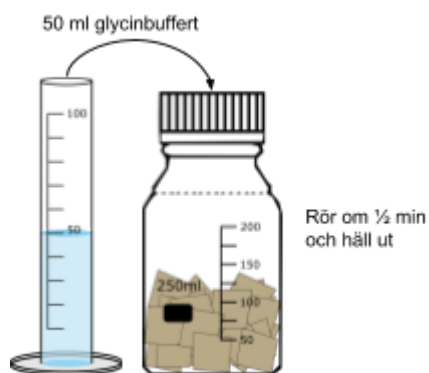
Separering av lysozym från äggvitan med hjälp av kaffefilter:

Förberedelser

1. Knäck ägget och separera äggvitan från gulan. Undvik att få med gulan, det är bara vitan vi vill åt.
2. Mät volymen äggvita och späd därefter med glycinbuffert: 1 del äggvita med 9 delar glycinbuffert pH 9,2
3. Blanda försiktigt men noggrant med en sked, undvik att det skummar. Det bildas normalt en vit "fällning" på grund av att ett av äggviteproteinerna, ovalbuminet, denatureras/koagulerar.
4. Klipp 1 kaffefilter i mindre bitar och lägg ner i en glasflaska/e-kolv



5. Tvätta och ekvibrera filtret med 50 mL glycinbuffert pH 9,2. Blanda väl och häll därefter ut vätskan.

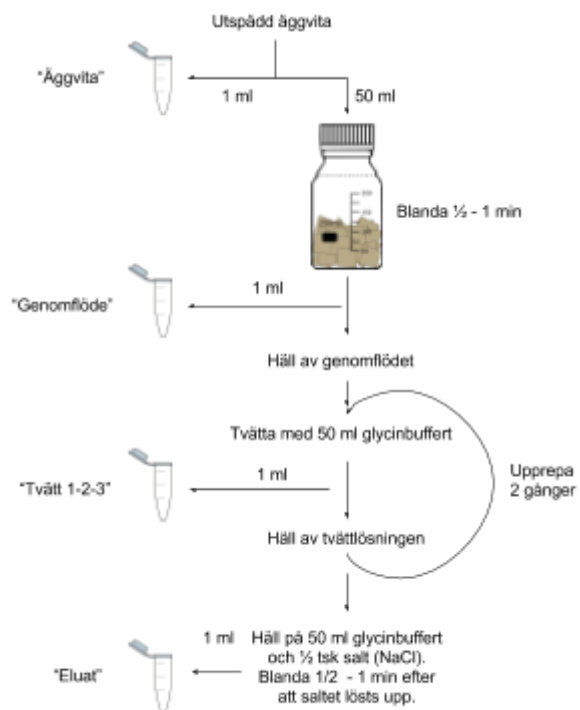


6. Ta fram 6 st eppendorfrör och ett ställ för dem.

Reningsförfarandet

För att kunna undersöka hur reningen går sparas 1 ml prov efter varje steg för analysering i efterhand.

1. Spara 1 ml av den utspädda äggvitan i ett eppendorfrör. Märk röret med "äggvita".
2. Tillsätt 50 ml utspädd äggvita till flaskan/e-kolven med kaffefiltret
3. Blanda försiktigt men noggrant 1/2-1 min. Undvik att det skummar. Nu binder det positivt laddade lysozymet till det negativt laddade kaffefiltret
4. Spara ca 1 ml av äggvitan som kommit i kontakt med kaffefiltret i ett eppendorfrör. Märk med "GF" för genomflöde.
5. Häll av så mycket av äggviteresterna/genomflödet som möjligt utan att få med kaffefiltret
6. Tvätta bort äggviteresterna som är kvar på filtret och i flaskan genom att tillsätta 50 mL glycinbuffert och röra om försiktigt ½-1 min, ta hjälp av en spatel eller sked om det behövs. Har flaskan lock så kan du försiktig vända flaskan upp och ned några gånger.
7. Spara 1 ml av tvättvätskan i ett eppendorfrör. Märk röret "T1" för tvätt 1.
8. Häll ut så mycket som möjligt av tvättvätskan
9. Upprepa tvättproceduren (steg 6-8) två gånger till. Glöm ej att spara 1 ml av varje tvättvätska efter varje tvätt, märk rören "T2" och "T3"
10. Nu är det dags att få lysozymet att släppa från filtret: tillsätt 50 mL glycinbuffert precis som förut men skopa även i ½ tsk (ca 1,5 gram) natriumklorid. Rör om så att saltet löser sig. Fortsätt därefter att rör om ytterligare ½-1 min. Saltjonerna som är plus- och minusladdade binder till kaffefiltret respektive lysozymet och gör därmed att lysozymet släpper från filtret.
11. Spara 1 mL av vätskan (eluatet) i ett eppendorfrör. Märk röret med "E" för eluat



Figur 1. Schema över reningsförfarandet

Analys 1: Vilka fraktioner från reningen innehåller mest och minst protein?

Med hjälp av Bradfords reagens ska vi analysera hur mycket protein de olika fraktionerna innehåller och rangordna dem därefter. Har reningen gått bra så borde proteinmängden vara mycket mindre i sista provet "E" än i första provet "äggvita" eftersom vi bör ha rensat bort de proteiner i äggvitan vi inte vill ha.

Hur fungerar metoden?

Vi ska blanda proverna från reningen med ett reagens som innehåller ett rosarött färgämne (ibland är det rödbrunt) som blir blått då det binder till proteiner. Ju mer protein som finns i provet desto blåare blir lösningen. Finns inga protein förblir färgämnet rosarött/rödbrunt.

OBS! Bradfordreagensen är giftigt och frätande och särskilt farlig att få i ögonen. Glöm inte att använda dina skyddsglasögon, labhandskar och labrock. Arbeta lugnt och försiktigt.

Utförande:

1. Nu ska du använda dig av eppendorfrören som innehåller den rosaröda bradfordreagensen - 7 st rör märkta "äggvita", "GF", "T1", "T2", "T3", "E" och "0". Nollan "0" är ett referensprov dit inget protein ska tillsättas. Det har vi för att ha något att jämföra med.
2. Fyll nollan "0" med 0,25 ml pglycinbuffert (dvs fyll upp till 0,5 ml-strecket)
3. Fyll de övriga rören som innehåller bradfordreagens med 0,25 ml prov (dvs upp till 0,5 ml-strecket) från de olika fraktionerna. Stäng locken ordentligt och blanda genom att vända rören upp och ned några gånger..

Analys:

Vilket prov var mest blått och innehöll mest protein? Vilket prov var mest rosa och innehöll minst protein? Kan du rangordna dem?

Analys 2: Hur ser lysozyminnehållet ut i de olika fraktionerna från reningen?

Nu ska vi ta reda på i vilka fraktioner det finns lysozym och ta reda på vilka som innehåller mest respektive minst lysozym med hjälp av ett aktivitetsprov.

Hur fungerar metoden?

Lysozym dödar bakterier genom att bryta ner bakteriernas cellväggar. I fallet med bakterien *Micrococcus luteus* går det hyfsat enkelt att följa denna aktivitet med blotta ögat. En lösning med mycket *Micrococcus luteus* är grumlig eftersom bakterierna bryter ljuset som träffar dem, men när lysozym tillsätts och börjar bryta ner deras cellväggarna så spricker bakterierna och går i bitar vilket gör att de inte längre bryter ljuset och lösningen klarnar upp.

Hastigheten med vilken bakterielösningen klarnar upp är ett bra mått på hur mycket lysozym som tillsätts. Ju snabbare uppkläring desto mer lysozym.

OBS! *Micrococcus luteus* är en ofarlig bakterie (lägsta riskklassen) men eftersom vi har en lösning som innehåller ofantligt många bakterier bör man iaktta försiktighet. Du vill inte ha bakterier i ögonen till exempel. Fortsätt använda skyddsglasögon, labhandskar och labrock. Arbeta lugnt och försiktigt.

Material som kommit i kontakt med *Micrococcus luteus*, t.ex. pasteurpipetter eller pipettspetsar, slängs i särskilt avfallspåse som försluts innan den slängs i brännbart. Pasteurpipetter i glas bör läggas i desinfektionslösning (70% etanol, jodopax eller liknande) innan de slängs.

Förberedelse:

Ta fram en bägare med avfallspåse avsedd för bakteriekontaminerad utrustning. Häri ska pipetter slängas efter kontakt med *Micrococcus luteus*.

Ta eventuellt fram en bägare med vatten för rengöring av pasteurpipetterna.

Utförande:

Nu ska du använda dig av eppendorfrören som innehåller den grumliga bakterierlösningen - 7 st rör märkta "äggvita", "GF", "T1", "T2", "T3", "E" och "0". Nollan "0" är ett referensprov dit ingen lysozym ska tillsättas. Det har vi för att ha något att jämföra med.

1. Om du använder en pasteurpipett:

Utän att pasteurpipetten kommer i kontakt med bakterielösningen: droppa 4 droppar (ca 100 µL) av varje prov till ett rör med bakterielösning. Stäng locket ordentligt och blanda om. Tvätta rent pasteurpipetten och upprepa steget för resterande prover.

Om du använder en mikropipett:

Applicera 100 µL prov från en fraktion till motsvarande rör med bakterielösning. Stäng locket och blanda ordentligt.

2. Tillsätt 100 µL glycinbuffert till "0"-röret
3. Håll ett öga på provrören. Vilket prov klarnar upp först? Det innehåller mest lysozym. Uppkläringen kan ta några minuter.

Slutanalys av resultaten: Har vi lyckats separera lysozymet från äggvitan?

En *perfekt* rening skulle innebära att *allt* lysozym som fanns i äggvitan från början separerats från *alla* andra proteiner som också fanns däri. I verkligheten går en perfekt rening knappast att uppnå men med noggrant arbete, bra metoder och tid går det att lyckas väldigt bra. I vårt fall har vi använt kaffefilter och ett enkelt arbets sätt så vi kan inte förväntas oss ett perfekt resultat.

Så hur har reningen gått?

Utifrån de två analytiska experimenten vi utfört kan vi dra slutsatser om hur lyckad reningen varit. Det totala proteininnehållet ska vara betydligt lägre i sista fraktionen (dvs i eluatet) än i äggvita samtidigt som det ska finnas kvar betydande mängder lysozym. Analys 1 ger svar på det första och analys 2 ger svar på det andra. Resultatet från aktivitetsanalysen (analys 2) säger också något om var vi "tappade" lysozym, var det i inbindningssteget (alltså då kaffefiltret och äggvitan blandades) eller var det i tvättarna, eller tappades lysozym i alla steg?