

# Kompendium om

## Bioteknologiske metoder og teknikker



# Studieretningen Bioteknologi - Aalborghus

## Gymnasium

### Indholdsfortegnelse

1. *Proteinoprensning,*
2. *Gel Electrophoresis ( protein ) + SDS-page*
3. *Gel Electrophoresis ( DNA )*
4. *Gensplejsning ( genmodificerede organismer)*
5. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*
6. *EnzymeLinked Immunosorbent Assay (ELISA)*
7. *Transformation ( virus, plasmid, liposom, shot-gun og nøgen-DNA)*
8. *Kloning (Meristemformering)*
9. *In vitro fertilisation,*
10. *Fosterdiagnostik*
11. *EKG-måling*
12. *Mikrobiologiske arbejdsmetoder ( celledyrkning og sterilteknik )*
13. *Enzymkinetik ( Michaelis-Menten)*
14. *Reaktionskinetik*
15. *Separationsmetoder ( filtrering, centrifugering mm )*
16. *Spektrofotometri*
17. *Gaschromatografi (GC)*
18. *Titration*
19. *Fermentering ( bioreaktorer m*
20. *Tyndtlagschromatografi (TLC),*
21. *Væskekromatografi ( HPLC )*
22. *DNA-sekventering*

# Proteinoprensning

## Beskrivelse

proteinoprensning anvendes, når man ønsker at oprense større mængder af et givent protein, enten ved naturlig oprensning i kilder eller ved rekombinant protein ekspresion, hvor man udtrykker proteinet, således, at organismen kan udtrykke de store mængder protein. Dette sker ved, at man genmanipulerer organismen.

Ved selve oprensningen af proteinet kræves det, at det overudtrykte protein adskilles fra resten af bakterienes membraner, organeller, proteiner m.m. Kort sagt isolerer man proteinerne, altså oprenser proteinerne fra bakterierne. Det er individuelt fra protein til protein, hvilke oprensningsmetoder man bruger. ( Dette komme først og fremmest an på, hvilke proteiner man arbejder med).

Ved oprensning af proteinet benytter man sig af metoder som sonikering og centrifugering for at få ødelagt cellerne, således, at proteinet kan skilles fra det øvrige organismemateriale. Efter denne proces bliver proteinet opbevaret i opløsning, eller aggregeret til inclusion bodies.

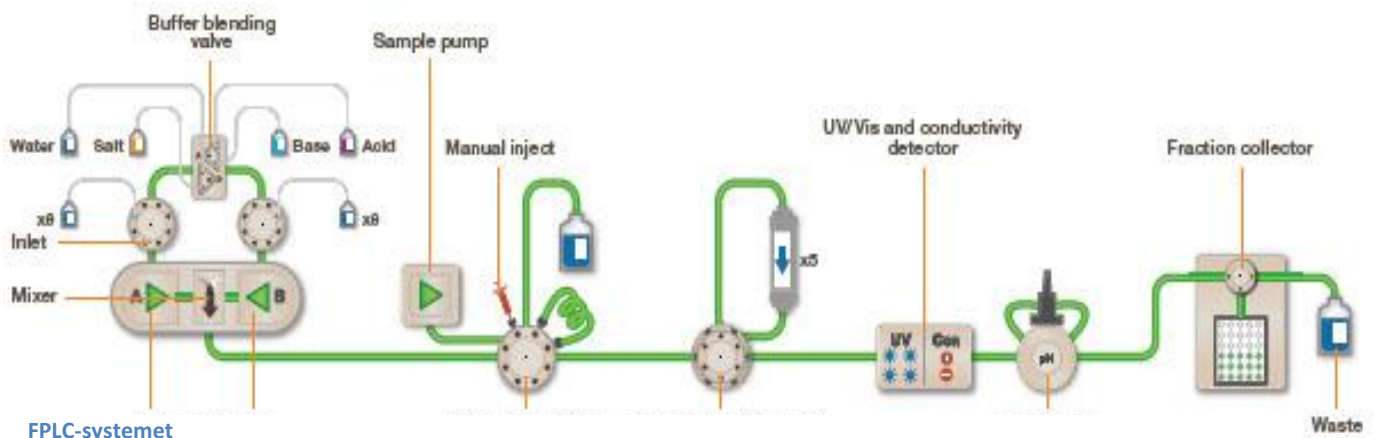
Ved selve oprensningen kan man benytte sig af gelelektroforese( ses ved gruppen ' Gel Electrophoresis (protein) + SDS-page'), hvor man gennem en gel adskiller de givne proteiner, og som eksempel kan gelelektroforesen gøre proteinernes længde målbare (FPLC – Fast Protein Liquid Chromatography ).

## Princip (FPLC)

Når man oprenser proteiner, gør man brug af en metode kaldet FPLC. Ved udførelsen af FPLC metode benyttes en ionbyttersøjle, en søjle der har en overflade, der er negativt ladet, og dermed er i stand til at binde positivt ladede proteiner. Proteinerne der bindes til søjlen vil sidde fast med forskellige styrker, alt efter proteinstrukturen og sammensætning af aminosyrer. Dvs. alle proteinerne sidder ikke lige godt fast på søjlen, og det er denne faktor der udnyttes til at oprense de eksakte proteiner man vil have. Proteinerne der sidder i søjlen adskilles ved at vaske søjlen igennem med en elueringsvæske, indeholdende natriumchlorid. Når søjlen skylles igennem med elueringsvæsken, vil Na ionerne fra natriumchloriden konkurrere med



FPLC maskinen



FPLC-systemet

proteinerne om at binde sig til søjlen, da Na ionerne ligesom de bunde proteiner er positive. Efter søjlen er blevet skyllet igennem, opsamles elueringsvæsken, der nu har taget nogle af proteinerne med sig, og vi har fået vores første proteiner ud af søjlen. Efterfølgende forøges saltkoncentrationen i elueringsvæsken, og søjlen skylles igennem igen. Den forøgede saltkoncentration medfører, at proteinerne der sidder en smule

bedre fast, nu skylles ud af søjlen, da den forøgede mængde Na ioner "overtager" proteinernes bindinger. Denne elueringsvæske opsamles i en anden prøve, og vi har nu en anden slags proteiner i denne prøve. Forøgelse af saltkoncentrationen og genskylning af søjlen gentages, og man ender med forskellige prøver der indeholder forskellige slags proteiner.

Prøvernes indhold visualiseres i et kromatogram, der illustrerer prøvernes proteinindhold i form af forøget absorbans, saltkoncentrationen hvorved de udfældedes, og forholdet mellem bufferne der er tilsat. Et kromatogram over FPLC kan se ud som følgende:



Den blå linje repræsenterer absorbansen, den røde linje repræsenterer saltkoncentrationen og den grønne linje viser forholdet mellem de to anvendte buffere. De røde tal nederst i kromatogrammet er nummeret på de forskellige prøver der kommer, altså de forskellige skylninger med elueringsvæske, og de sorte tal er tiden.

I dette eksempel har formålet været at oprense proteinet Myoglobin fra oksekød. Man har udført FPLC, hvorefter man har foretaget en kromatografisk undersøgelse på prøverne. I starten af kromatogrammet ses et stort udsving i absorbansen, omkring nr. 3 til 6. Dette udsving skyldes, at alle de ubundne proteiner der befinder sig i søjlen bliver skyllet ud. Herefter ser vi igen et udsving ved prøve nr.16 til 19 (det indkredsede udsving). Da der er blevet lavet en undersøgelse på oksekød, hvori man ved der er myoglobin, konkluderes det at det er dette udsving der er myoglobin, da der ikke er andre udsving der indikerer en større mængde proteiner. På samme måde kan man ved undersøgelse af andre stoffer, hvori man vil oprense et bestemt protein, undersøge kromatogrammet for udsving der indikerer en vis mængde protein der kunne tyde på at være det ønskede proteins udsving.

Selvom det store udsving sandsynligvis indeholder Myoglobin, vil der her også være andre proteiner tilstede. For at undersøge prøven yderligere udføres SDS-page, hvorved de enkelte typer af proteiner adskilles fra hinanden, og man kan få et overblik over de præcise proteiner der er til stede i prøven.

## Anvendelse af proteinoprensning

Anvendelse af proteinoprensning foregår indenfor flere forskellige områder. Vaskepulverproducenter benytter proteinoprensningen til at få de ønskede enzymer der skal bruges i vaskepulver, så det får den ønskede effekt.

Indenfor den farmaceutiske verden kan proteinoprensningen benyttes til at få det specifikke protein der har lige præcis den medicinske funktion man ønsker at opnå med et præparat, eller måske vil man have

oprenset et bestemt protein for at foretage undersøgelser af dette, for at finde ud af, om det er noget der har nogen medicinsk betydning, eller om det medvirker til direkte skadelige processer. Et eksempel på den medicinske brug af proteinoprensning kan findes i Novo Nordisk, hvor der produceres insulin, hvilket også er et protein, hvilket selvfølgelig betyder at man må oprense insulinen, så man ikke får en masse overskydende proteiner.

Proteinoprensning er også blevet brugt til at bestemme proteinindholdet i forskellige madvarer. Eksempelvis vil det være vigtigt at have kendskab til proteinrige madvarer, hvis man er vegetar, og derfor ikke spiser kød.

## Udstyr og materialer

Mange metoder og kemiske reaktioner er pH-afhængig. Derfor bruges materialer, såsom acetatbuffer. Dens funktion er at hjælpe med at holde pH stabil, sommetider er det nødvendigt for at kunne udføre nogle eksperimenter. Inden man tager sin buffer i brug, skal man vide hvad molariteten man har brug for i sin buffer er (molariteten af bufferen er antallet af mol opløst stof). Mængden af den buffer man skal bruge kan variere. For at finde ud af hvilken molaritet, man skal bruge i de forskellige kemikalier, skal man finde forholdet mellem koncentrationer og buffer molariteten.

Under proteinoprensning gør man brug af nogle forskellige rør, som opbevarer f.eks. kød eller det protein, som man har oprenset. Der er f.eks. et greinerrør, det er en slags opbevaringsrør, som bruges til f.eks. at opbevare kød. Eppendorfrøret er et andet rør, som bruges til f.eks. proteinoprensning kød. Røret opbevarer det protein, som man har oprenset. Eppendorf røret er det rør, man skyller sine prøver ud i. Man ender altså ud med en lang række eppendorfrør der alle indeholder forskellige koncentrationer af proteiner.

## Fordele og ulemper

### Fordele:

FPLC er en fordel, da dette er hurtigt og let at bruge i forhold til separation af forskellige proteiner. (Hvilket er effektivt, hvis større mængder oprenset protein skal bruges ofte)

Det kan separere proteiner fra en kompleks blanding på væskeform. (Dette er brugbart i forbindelse med proteinoprensning)

### Ulemper:

Fplc tåler ikke højt tryk, hvilket begrænser anvendelsesmulighederne.

Varmesensitive proteiner er svære at arbejde med, ved anvendelse af FPLC.

## Kildeliste

- Thestrup, Lisbeth m.fl.: Ekstraktion og oprensning af proteiner fra oksekød. 1. udg. Aalborg Universitet, 2015. (Bog)
- Protein Purification. Udgivet af Caroline Ritchie.  
Internetadresse: <http://www.labome.com/method/Protein-Purification.html> - Besøgt d. 13.01.2016 (Internet)
- 4 FPLC Column. Udgivet af Ron Sparks.  
Internetadresse: <https://www.youtube.com/watch?v=chA0QhnV8KQ> - Besøgt d. 13.01.2016 (Internet)

# 2. Gel Electrophoresis (protein) + SDS-page

---

## Beskrivelse

Gelelektroforese er en metode, der benyttes til at adskille molekyler eller molekylstykker - i dette tilfælde proteiner - i en gel ud fra deres størrelse eller ladning. Man kan enten lave to elektroforeser ad to omgange eller én 2D-elektroforese. Derved kan man f.eks. måle længden af forskellige proteiner eller oprense en prøve af et givent protein

I første omgang adskiller man på baggrund af ladning. Dette gøres ved at have en pH-gradient langs det elektriske felt: Høj pH ved - og lav pH ved +, hvilket får proteinet til at skifte ladning efterhånden, som det bevæger sig gennem gelen. Proteinet vil flytte sig indtil det punkt, hvor det er neutralt udadtil. Dette kaldes proteinets *isoelektriske punkt, pI*.

F.eks. er glucoseoxidasen pI 4,2, hvilket svarer til, at det ved pH = 4,2 i gelen.

I anden omgang tilsættes stoffet SDS. Dette stof denaturerer proteinet, så det foldes helt ud, da proteiner normalt har en tredimensionel struktur. Dette sørger for at proteinerne kun adskilles ud fra deres længde. SDS giver også alle proteinerne den samme ladning, som er permanent. Derefter sættes strømkildens poler på den anden led af gelen, så proteiner vandrer på tværs af den første vandringsretning. Når alle proteiner har samme ladning, vil kun størrelsen adskille dem i gelen. Derved har man fordelt proteinerne efter deres syre-base-agenskaber på den ene led og størrelse på den anden. Denne metode hedder *SDS-PAGE, SDS-polykrylamid-gelelektroforese*.

Nu skal de individuelle proteiner identificeres. Dette gøres via *blotting*, dvs. farvning. Man farver med forskellige farvestoffer, som binder sig til proteiner. Ønsker man kun at finde et specifikt protein, kan man lave en *Western Blotting*. Ved Western Blotting overføres proteinerne fra gelen til nitrocellulosepapir, fordi dets bittesmå porer kan fange mikroorganismer. På nitrocellulosepapiret farves proteinet, man ønsker med antistoffer, der bindes specifikt til det. Antistoffer er de proteiner, cellerne i ens immunforsvar skaber. Antistofferne, man bruger i denne sammenhæng, forsynes med et enzym, som kan fremkalde en farvereaktion.

## Princip

Gelelektroforese er en analysemetode, som bruges til at se, hvor ren en proteinfraktion er og hvor mange proteiner, som der er i en opløsning.

Proteiner har forskellig ladning, og det er denne ladning, som afgør hvor langt de "vandre" på gelen, kender man ladningen for et protein, kan man altså bestemme, hvor det specifikke protein befinder sig.

SDS-Page bruges til bestemmelse af renhed og størrelse af et protein. Her behandles proteinerne ved sodium dodecyl sulfat, SDS, som binder sig til proteinerne, og gør deres ladning negativ, således at de vandrer fra den negative pol til den positive, i apparatet.

## Anvendelsesområde

- Medicinalindustrien
- I laboratorier
- Udforskning af proteiner
- Analytisk og præparativt arbejde
- Biokemisk og medicinsk forskning
- Molekylærbiologien

## Udstyr

- Gel
- Kar og låg
- Buffervæske



- Strømforsyning
- Elektroforeseapparat
- Kamme
- Gel Doc (Apparat til dokumentation af geler)
- Computer
- Proteiner
- Markør
- Coomassie blå til SDS-page

## Praktisk anvendelse

Elektroforese kan bruges i medicinalindustrien, da man her kan udskille bestemte proteiner og enzymer. Metoden bruges bl.a. til at bestemme, om en patient er syg, dette gøres ved at tage en blod- eller urinprøve, hvor man gennem elektroforese kan finde ud af, hvor meget og hvilket protein, som befinder sig i prøven, dette kan sammenlignes med en standard prøve, og herved kan man aflæse om hvilken sygdom man har.

Elektroforese kan også bestemme hvilke typer af bakterier som er antibiotikaresistente, derudover kan man også syntetisere nyt antibiotika.

Elektroforese er også en vigtig analysemetode til vacciner.

Elektroforese afhænger af tyngdekraften og elektroforese-kræfterne, da tyngdekraften er stærkere end elektroforese-kræfterne, kan man med fordel udføre elektroforese i rummet, da der her ikke er samme påvirkning af tyngdekraft, og elektroforese-kraften er derfor stærkere. Et forsøg har vist at bl.a. urokinase udskilles seks til syv gange bedre i rummet, end på jorden.

## Fordele og ulemper

Fordele	Ulemper
De fleste molekyler - og proteiner - kan opdages via gelelektroforese uanset størrelse	Det er næsten umuligt at få alt materialet i den oprindelige prøve, selvom det er muligt at udtrække en prøve fra gelen til videre analyse.
Der er ikke behov for mange midler til en gelelektroforese.	Man benytter mange skadelige materialer, f.eks. ethidiumbromid, som er et mutagen.

### Kilder:

<http://www.einsten.net/8/2014/08/liste-over-anvendelser-af-elektroforese.html>

<https://da.wikipedia.org/wiki/Elektroforese>

<http://www.biotechacademy.dk/Undervisningsprojekter/Gymnasiale-projekter/genteknologi/teori/4genteknologisketools/gelelektroforese>

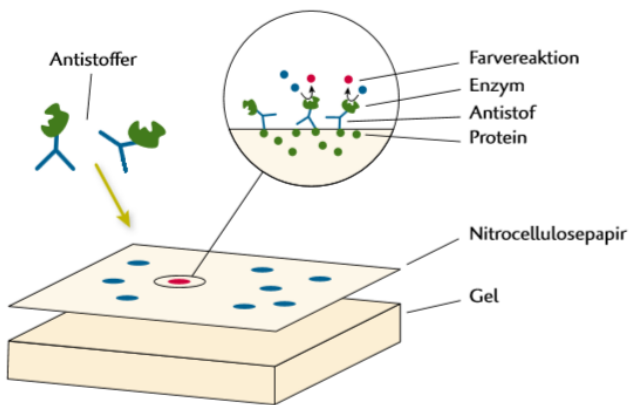
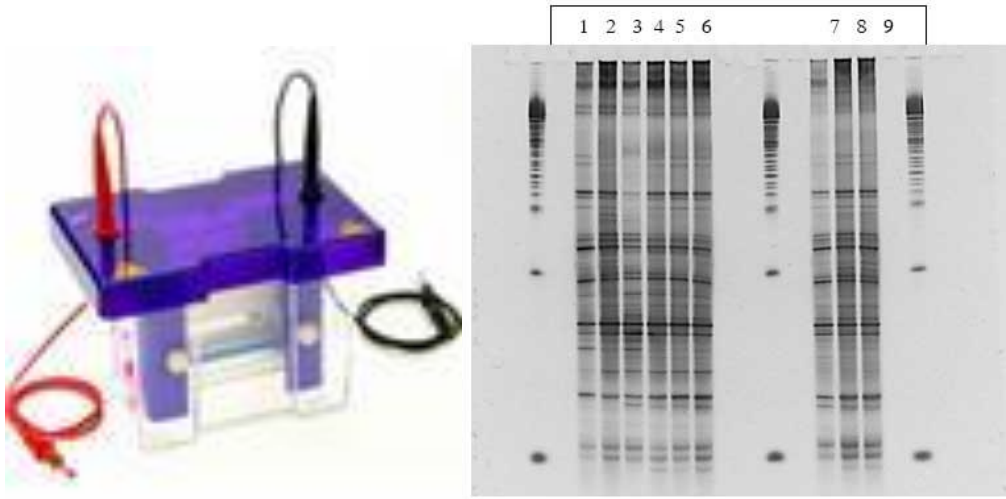
Torp, Kresten Cæsar - Bioteknologi 2, 2011, 1. udgave, Nucleus

Bruun, Kim m.fl.: Grundbog i Bioteknologi. Bind 2. 1. udg. Gyldendal, 2012. (Bog) s 178-180

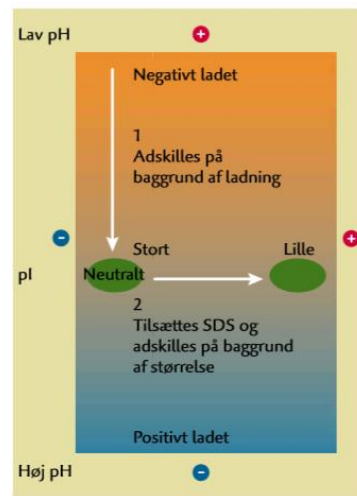
## Links, animationer og billeder

<http://www.sumanasinc.com/webcontent/animations/content/gelectrophoresis.html>

<https://www.youtube.com/watch?v=quG3JGKUk7M>



Figur 12. Western blotting med antistoffer.  
 Bioteknologi 2 © 2010 · by Nucleus Forlag ·  
 Grafik: Elin Steffensen, Gigraf · ISBN 978-87-90363-46-8.



Figur 11. 2D-gelelektroforese.  
 Bioteknologi 2 © 2010 · by Nucleus Forlag ·  
 Grafik: Elin Steffensen, Gigraf · ISBN 978-87-90363-46-8.



# Gelelektroforese DNA Mangler

---

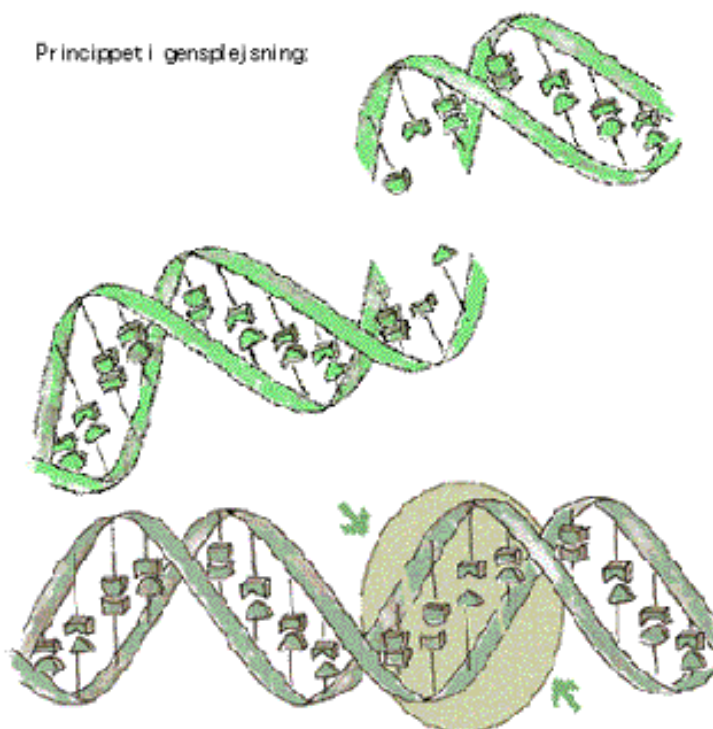
# Gensplejsning

## Bekskrivelse

Gensplejsning er en metode, som kan bruges i forbindelse med overførsel af gener fra en organisme til en anden. Det er også den proces, der bliver brugt når man skal lave en udvikling af nye slags dyr og planter, hvor forskellige typer krydses ved parring eller befrugtning. Når man udfører gensplejsning, er det muligt at processen forløber hurtigere end ved forædling. Ud fra gensplejsningsmetoden er det muligt at udveksle gener mellem de arter, som det ellers ikke er muligt at udveksle gener hos ved krydsning. Det kan være gener fra dyr til planter eller fra planter til dyr. Ved gensplejsning bliver der ændret på organismes arvemasse, ved at der bliver indsat nye gener, dvs. nye DNA-stykker i kromosomer. Celler, hvor der er blevet sat et gen i, har mulighed for at producere nyt protein, som får den til at fungere på en anden, ny måde. Ved metoden gensplejsning bliver det anvendt en donor, en vektor og en vært. Værten er organismen, hvori det nye genmateriale bliver indført, donoren er organismen, hvor det bliver hentet fra og vektoren er den som bringer arvematerialet fra donoren til værten på en god måde.

## Princip

Gensplejsning startede ved, at forskere ved Novo Nordisk i 1980'erne udviklede en produktion af et enzym, som bruges til vaskemiddel. De ville finde en donor, der havde et passende gen for lipase og få genet til at fungere i en passende vært. Værten blev en skimmelsvamp, som findes især i Østasien, hvor den bliver brugt til forgæring af sojabønner, fremstilling af risvin, og hvede til sojasauce. Donoren blev så en skimmelsvamp, som findes naturligt i kompost. Når man skal overføre genet, så skal man oprense det fra nogle celler, der hedder "Thermomyces." Dernæst skal man overføre genet til en vektor/værtscellen og så er processen i gang.



## Anvendelsesområde

Ved gensplejsning kan man fjerne eller indsætte gener fra en organisme i en anden organisme. På denne måde er det muligt at blande gener fra forskellige arter. Ændringerne på generne vil også nedarves til kommende generationer.

Gensplejsning af planter:

Har man en plante som man ønsker skal have en særlig egenskab, finder man et gen for den bestemte egenskab. Når genet er fundet, finder man en vektor, hvori genet indsættes. Derefter indsætter man vektoren med genet ind i den plante hvis arvemateriale man ønsker at ændre, ved hjælp af transformation.

Gensplejsning af dyr:

Ved gensplejsning af dyr laver man et tilsvarende indgreb i det genetiske materiale i celler fra dyr. Til dette bruges en virus som vektor, hvor virusets DNA byttes med det pågældende DNA man vil bruge. Det gensplejsede virus sættes nu ind i en dyrecelle, og ved at angribe cellen, overfører viruset det nye gen. Når cellen formerer sig, vil cellerne arve genet, og dyret er nu splejset.

## Udstyr, materialer mm:

- Generelt til gensplejsning bruger man forskellige udstyr og materialer. Gensplejsning af en bakterie foregår således, og der bliver brugt disse materialer: DNA, pipetter, værtscelle, aggerplade, plasmid af det ønskede, mikro centrifurør, sterilt tandstik, CaCl<sub>2</sub> opløsning, vortex, isbad, varmeskab 37grader. Først tager man lidt DNA fra en bakterie, dvs. et plasmid. Plasmid er lidt DNA som tages ud af bakterier. Det man skal bruge, klippes ud med et særligt klippe enzym. Man åbner plasmiddet og tager det nye gen og sætter det ind med et splejse enzym. Derefter sætter man plasmiddet ind i bakterien, og det vil så formerer sig.

## Praktisk anvendelse

- Gensplejsning anvendes til mange forskellige formål. De største anvendelsesområder er inden for landbrug og medicinalindustrien, hvor udviklingen er nået længst. Anvendelsen af gensplejsning bunder i ønsket om ny indsigt og forståelse, ønsket om at billiggøre og kvalitetsforbedre eksisterende produkter samt at udvikle nye organismer med nyttige egenskaber. Inden for medicinalindustrien er Novo Nordisk's produktion af insulin til sukkersugepatienter samt deres produktion af væksthormoner til mennesker med dværgvækst et af de mest velkendte eksempler. Et andet eksempel inden for medicinalindustrien er produktionen af blodstørkningsfaktoren VIII. Ved blødersygdom er patienten ikke i stand til at producere blodstørkningsproteinet faktor VIII. Denne faktor har hidtil været kompliceret og omkostningsfuld at fremstille, men er nu lykkedes med gensplejsning. Inden for landbruget anvendes gensplejnings til at udvikle planter, der er modstandsdygtig over for bestemte ukrudtsmidler, samt til fremstilling af planter, der er modstandsdygtige over for insektangreb og svampeangreb.

## Fordele og ulemper

- Fordelene er, at man kan modificere planter så de kan dyrkes mere miljørigtigt. Man øger fødevarerproduktionen, ved hjælp af GMO.
- Ulemper kan være, at det ikke altid er en god ide at modificere planter til resistens, når man risikere af flere ukrudtsarter får samme resistens, og man derfor bliver nødt til at øge

mængden af sprøjtemidler på markerne. Der er i Europa mange restriktioner, men uden for EU kan man ikke være sikre på, at GMO'erne er lige så sikre.

Links:

- <http://www.faktalink.dk/titelliste/gens/gensgent>
- <https://da.wikipedia.org/wiki/Genteknologi>
- "Biologi til tiden" – 2009.

# 5. Polymerase Chain Reaction (PCR)

---

## Beskrivelse

Polymerase Chain Reaction (PCR), er en bioteknologisk metode til opformering af DNA, som blev udviklet i 1980'erne.<sup>1</sup>

Det er, hvor man ud fra ét DNA molekyle får dannet noget mere DNA, som er fuldstændig identisk med det oprindelige DNA molekyle, hvilket er meget brugbart, hvis man for eksempel vil sekvensbestemme DNA for at identificere en bestemt organisme.<sup>2</sup>

I løbet af få timer er 1 DNA- stykke lavet til flere millioner identiske DNA- stykker.

## Udstyr, materialer mm: (DNA-Fingerprinting øvelsesvejledning)

- PCR-Maskine
- PCR-Rør
- Primere
- Mikropipetter
- Prøve (indeholdende genomisk DNA)
- Reaktionsmix
  - DNA-H<sub>2</sub>O
  - DreamTaq buffer
  - dNTP mix
  - MgCL<sub>2</sub>
  - Dream Taq Polymerase

## Princip

### *Taq polymerases historie*

Det enzym, der anvendes ved PCR hedder Taq- polymerase. I de første år efter man udviklede PCR, havde man problemer med, at enzymet denaturerede ved opvarmningen, så man skulle tilsætte nyt enzym efter hver cyklus, men i 1976 ændrede dette sig. Her lykkedes det at isolere en DNA- polymerase fra en termofil bakterie, *Thermus aquaticus*, som blev fundet i en varm kilde. Enzymet som kaldes Taq-

---

<sup>1</sup> Kim Bruun, Pia Birgitte Geertsen og Karen Helmig "Grundbog i Bioteknologi 2" 2011 side 31

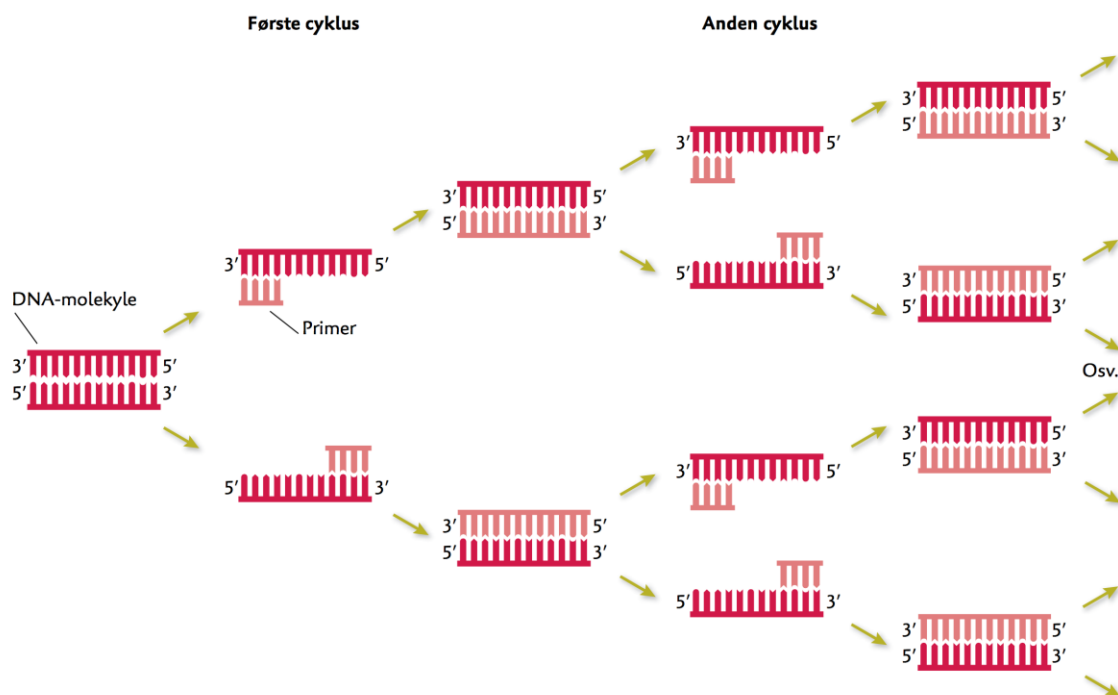
<sup>2</sup> Bodil Blem Bidstrup og Johanne Jensen "Bioteknologi 1" 2011 side 64

polymerase, er relativt stabilt selv ved temperaturer på 90 grader celcius, og er siden 1987 blevet anvendt som DNA-polymerase ved PCR. (Grundbog i Bioteknologi)

### Taq polymerases virkning

DNA - polymerasen er et enzym der sætter frie nukleotider på DNA-strengen ud fra baseparringsprincippet, altså Adenin til Thymin og Cytosin til Guanin. Den sætter nukleotiderne på i forlængelse af de nukleotider, som allerede sidder på strengen. Derfor tilsætter man primere, som er enkeltstrengede DNA-sekvenser, som man ved passer med en sekvens før det man ønsker at kopiere. På den måde får man taq-polymerasen til at kopiere det ønskede DNA-stykke. Man tilsætter også en anden primer, som passer med DNA- sekvensen på den anden side af det sted, man ønsker at kopiere, men som går i den modsatte retning. (Biotek Nord)

### Praktisk anvendelse:



Man starter med at opvarme prøven med DNA'et til ca. 90 grader i PCR-maskinen. Dette gøres for at få spaltet DNA-strengen i to forskellige enkeltstrengene. Herefter sænkes temperaturen i maskinen til ca. 60 grader, hvilket får primerne til at hæfte sig på de spaltede enkeltstrengene. Efter dette så kommer der nye nukleotider til strengene vha DNA-polymerase, hvorefter nye DNA-strenges dannes. Denne proces gentages indtil man har opnået en stor mængde af det samme DNA.



## Anvendelsesområde

PCR er den mest udbredte molekylærbiologiske teknik, og er helt uundværlig i mange situationer.

PCR metoden anvendes i mange tilfælde, når man ønsker at opformere noget DNA, så det kan analyseres. Det kan f.eks. være praktisk i forbindelse med mord, vold eller slægtskabssager.

PCR kan også anvendes, hvis man ønsker at identificere en bestemt bakterie og finde nye stammer ved at sekvens bestemme deres DNA. (Bioteknologi 1)

## Fordele og ulemper

Den mest essentielle fordel ved at benytte denne bioteknologiske metode er, at det er muligt at opformere en mindre mængde af DNA, således en større mængde opnås. En ulempe er, at kontamination af PCR-prøven kan forekomme. En af de ting, som kan gå galt, kan være, at enzymet denaturere under opvarmningen til 94 °C, når DNA'et skal spaltes.

## Evt animationer, videoer mm

Link til en video om PCR

<https://www.youtube.com/watch?v=iQsu3Kz9NYo>

## Links

Teori om PCR

<http://www.biotechacademy.dk/Undervisningsprojekter/Gymnasiale-projekter/genteknologi/teori/4genteknologisketools/pcr>

## Kildehenvisninger

- Bodil Blem Bidstrup og Johanne Jensen "Bioteknologi 1" 2011 side 64
- Biotek Nord "DNA- fingerprinting forsøg" (elevvejledning) side 14-15
- Kim Bruun, Pia Birgitte Geertsen og Karen Helmig "Grundbog i Bioteknologi 2" 2011 side 31

# Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

## Beskrivelse

---

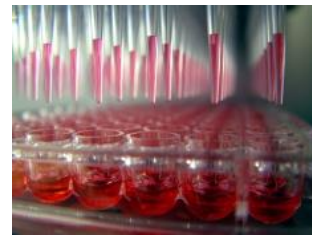
Enzyme-Linked Immunosorbent kaldes også ELISA, er en teknik, som er en af de mest anvendte metoder, hvoraf man måler koncentrationen af bestemte proteiner (dvs. antigener eller antistoffer) ved at udnytte særlige antistoffers evne til at binde til proteinerne.

Det første skridt i retning af den metode vi har i dag, blev taget af Edward Jenner i år 1798. Det var en demonstration af en tidlig vaccineform. I år 1890 startede udviklingen af en metode, hvor man brugte antistoffer til at bestemme f.eks. sygdomme. Siden da har metoden udviklet sig, og i år 1971 bestemte Peter Perlmann og Eva Engvall på et universitet i Stockholm "EnzymeLinked Immunsorbent Assay (Elisa)", som vi kender i dag.

### Udstyr, materialer:

Mikrotiterplade.

Antistoffer



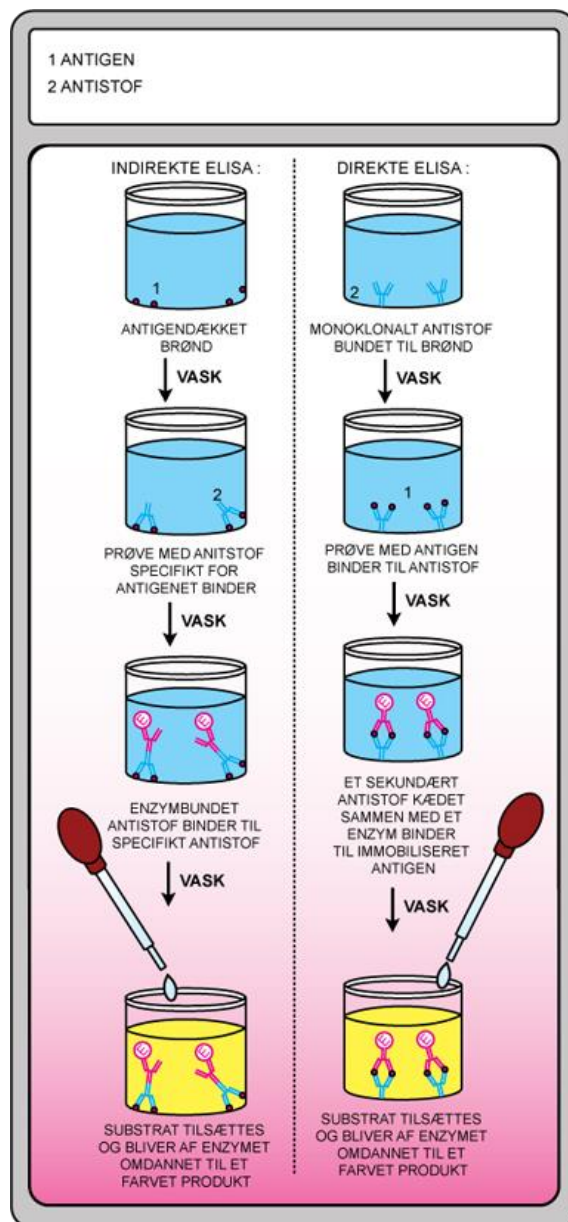
Antigener

### Praktisk anvendelse og princip

Derfor findes der flere forskellige former af ELISA. Der er det indirekte og direkte ELISA, som beskrives længere nede. Der er også Sandwich ELISA, som er ikke almindeligt brugt, Competitive ELISA, det handler om at se hvilket antigen, som binder sig først til antistoffet, og ELISPOT, det er for at finde ud af hvordan genet reagerer for eksempel med vaccine, medicin osv.

Ved praktisk anvendelse af ELISA (det vil sige det direkte metode) bruges en mikrotiterplade.

En mikrotiterplade har 96 små brønde. I hver brønd bindes der antistoffer, der skal tiltrække et bestemt protein. Den væske man skal undersøge, påføres i brøndene, og antistofferne tiltrækker proteinerne. Mikrotiterpladen skylles, så der kun bliver proteinerne og antistofferne tilbage. Der tilsættes et stof kaldet konjugat, som består af et protein og et enzym. Det binder sig til antistoffet. Der tilsættes en katalysator, der farver produktet. Herefter kan farveintensiteten måles i brønden ved hjælp af spektrofotometri, så man får den rigtige koncentration eller ved at se med det blotte øje. Jo stærkere farven er, jo større er koncentrationen af det protein, man måler.



Man bruger den indirekte måde, når mængden af virus eller bakterier er så lav, at man ikke kan teste dem direkte. Man skal bruge en lille blodprøve for at kunne determinere eventuelle antistoffer mod en inficerende bakterier eller virus i patienten. Rent praktisk foregår det ved, at antigener, som er specifikt for den antistof man ønsker at teste for, der sættes i bunden af brønden. Derefter tilsætter man den prøve, man ønsker at teste for indhold af antistof. Således at prøven indeholder de antistoffer, vil disse binde sig til antigenerne i bunden af brønden. Herefter vaskes det overskydende antistof væk, og så tilsættes endnu et andet antistof, som også kaldes for sekundært antistof. Det er bundet til et enzym, og når man tilsætter et substrat, som kan omdannes af dette enzym, og derfor vil opløsningen skifte farve. Jo mere farveskift, desto mere enzym og antistof.

## Anvendelsesområde

Elisa bliver anvendt i praksis ved diverse undersøgelser inden for sygdom, sundhed og forebyggelse. De

bliver bl.a. anvendt ved undersøgelser af sygdomssymptomer som f.eks. Hiv, syfilis og borreliose. Sygdommene, der bliver testet via Elisa, er i mange tilfælde infektionssygdomme.

Elisa bliver også brugt til udvikling og testning af medicin, bl.a. i form af vacciner og udvikling af medicin til kræftpatienter.

Eksempel på brug af teknikken:

ELISA kan være en del af diagnosticering af HIV-patienter. Det gøres ved, at man sandsynliggør smitte med HIV (som fører til AIDS). I blodet på en HIV-patient vil der noget tid efter smitten være dannet antistoffer overfor virusset. For disse antistoffer findes der specifikke antistoffer, som er koblet til et farvedannende enzym, og disse kan man så bruge i et ELISA, til at afsløre om patienten har HIV. Dog, kræves der også positivt testresultat fra et Western Blot\*, før en patient kan diagnosticeres med HIV.

[\\*http://www.biotechacademy.dk/Undervisningsprojekter/Gymnasiale-projekter/genteknologi/teori/4genteknologisketools/western-blot](http://www.biotechacademy.dk/Undervisningsprojekter/Gymnasiale-projekter/genteknologi/teori/4genteknologisketools/western-blot)

## Fordele og ulemper

Elisa bliver tit brugt som en screeningsundersøgelse, da det er billigt, og der ingen bivirkninger er.

Sammenlignet med andre immunoassay metoder, så er ELISA tests mere præcise. De er velovervejede meget sensitive, specifikke og de er meget bedre til at opdage substans i kroppen, som radioimmune assay test (det vil sige, det er en teknik, der bestemmer koncentrationen af antigenet). Anden fordel er, at man ikke har brug for radioaktive substanser eller en dyr geigertæller til at finde ud af hvor meget substans, der er. Det er dog en ulempe, at Elisa ikke kan finde vira, kun de antistoffer der dannes for at bekæmpe dem. Elisa kan derfor ikke benyttes lige efter man er blevet smittet, da der skal gå noget tid før kroppen danner nok antistoffer til, at det kan måles ved Elisa metoden.

### Links:

<http://www.healthline.com/health/elisa#Overview1>

<http://www.hounisen.com/elisa-plader>

<http://www.biotechacademy.dk/Undervisningsprojekter/Gymnasiale-projekter/genteknologi/teori/4genteknologisketools/elisa>

<https://sites.google.com/site/ag2zbiologi/immunologi/elisa>

<http://www.elisa-antibody.com/ELISA-Introduction>

### Youtube:

<https://www.youtube.com/watch?v=RRbuz3VQ100>

# Transformation

---

## Indholdsfortegnelse

TRANSFORMATION .....	19
VIRUS .....	20
PLASMIDER .....	20
LIPOSOM.....	21
SHOTGUN .....	21
DNA .....	21
ANVENDELSESOMRÅDE .....	21
UDSTYR/MATERIALER. ....	22
FORDELE OG ULEMPER .....	22
LITTERATUR OG LINKS.....	23

## Transformation

Indenfor Genteknologien arbejdes der med forskellige metoder og teknikker, hvormed man kan foretage ændringer og rokere gener hos levende organismer. En af disse teknikker er transformation. Transformation benyttes, når man ønsker at overføre gener fra en celle over i en anden. Dette foregår ved at generne optages gennem cellens membran, og efterfølgende vil man opleve, at det indsatte gens egenskab vil udtrykkes i værtscellen. Årsagen til, at en celle kan være modtagelig overfor fremmede organismer er, at alle organismer håndterer DNA på stort set samme måde. Men for at transformationen kan foregå, er det nødvendigt at gøre cellemembranen permeabel altså gennemtrængelig for de gener, man ønsker at indsætte i cellen. Der findes flere metoder til, at gøre cellemembranen permeabel, og der er ofte forskel på, hvordan de enkelte metoder virker på de forskellige organismer. En af metoderne er elektroporation. Ved denne metode udsættes en blanding af celler og DNA for et kort elektrisk stød, dermed vil cellemembranen blive gennemtrængelig, og cellerne vil forsøge at optage DNA'et og dermed blive transformerende. En anden måde at gøre membranen gennemtrængelig på, er ved kemisk kompetence. Ved denne metode vil cellerne blive kemisk bearbejdet, det kunne for eksempel være med calcium-ioner ( $Ca^{2+}$ ), som vil neutralisere de negative ladninger, der er i cellens membran.

Dette gør cellen i stand til at optage DNA'et.

Når cellemembranen er gjort permeabel vil næste mål være at få transformeret DNA'et ind i den nye organisme. Den enkleste måde at gøre dette på, er ved at indsætte DNA'et i et plasmid, som efterfølgende

indsættes i organismen. Plasmidet vil man typisk isolere fra en bakterie, dette gøres ved at ødelægge membranen, fjerne yderligere celle-fragmenter.

De isolerede plasmider kan nu diffundere ind i en ny organisme.

## Virus

En virus er en lille partikel, som enten består af et stykke DNA eller RNA. De er ofte pakket ind i en protein kapsel og kan opholde sig i bakterier, svampe, dyr og planter.

- Virus i forhold til transformation

Virus benyttes som vektorer, der bringer arvemateriale fra donoren til værtscellen.

- Virus som vektorer i bakterier og eukaryote celler

En virus binder sig til de bestemte receptorer, som findes i cellemembranen, hvilket er derfor en virus er effektiv til at transportere arvemateriale til værtscellen.

## Plasmider

Plasmider er typisk små cirkulære DNA-molekyler, som ikke knytter sig til kromosomer, fordi de bærer på ikke-essentielle gener. De findes især i bakterier og svampe, som gærceller og skimmelsvampe.

- Plasmider i forhold til transformation.

Plasmider bruges som vektorer. De er med til at bringe arvemateriale fra donoren til værtscellen på en effektiv måde.

- Indførelse af plasmider i bakterier

For at plasmider kan trænge igennem en bakteries cellemembran, skal cellemembranen gøres gennemtrængelig. Dette gøres ved, at bakteriecellerne og plasmiderne blandes og udsættes for en opløsning af calcium-ioner og et temperaturchok, hvor temperaturen hæves fra 0°C til 42°C, og derefter sænkes til 0°C igen. Efter denne proces vil cellemembranen være gennemtrængelig, og det vil nu være muligt for plasmiderne at optages af bakteriecellen igennem cellemembranen.

- Indførelse af plasmider i eukaryote celler

Indførelsen af plasmider i eukaryote celler er en langt mere kompliceret proces.

For at kunne indføre plasmider i en eukaryote celle, nedbrydes cellevæggen ved hjælp af enzymet glucanase, som går ind og svækker plante- eller svampecellevæggenes stivelse. Derefter tilsættes en opløsning af polyethylenoxid (PEG), som destabiliserer cellemembranen, så plasmiderne kan trænge igennem cellemembranen.

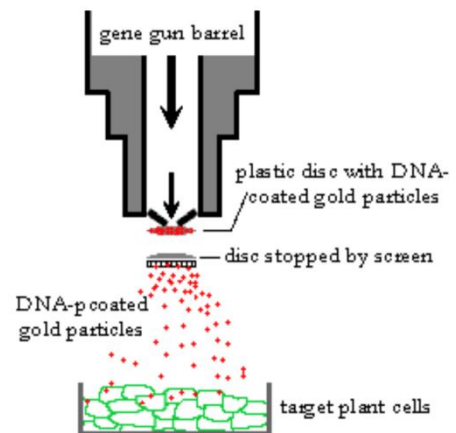


## Liposom

Et liposom er en boble, der er lavet af det samme materiale som en cellemembran, som er opbygget af lipider. Dvs. at et liposom er en stor fedtkugle. Denne fedt kugle kan fyldes med de ønskede gener og kan dermed transportere eksempelvis DNA ind i en celle.

## Shotgun

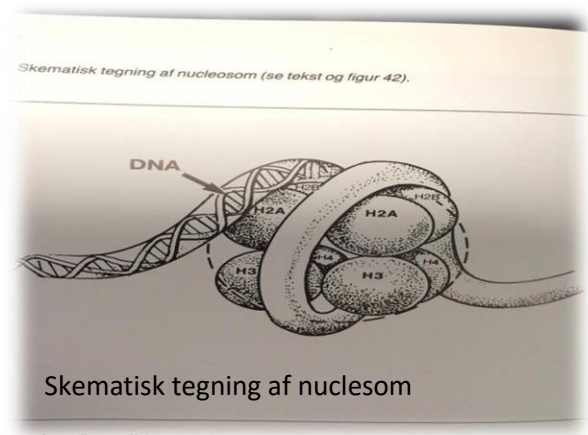
Det er en metode, der er mest anvendt på planter. Det sker ved at fylde en guldkugle med oprenset DNA (se afsnit om DNA), ses på figuren. Herefter bliver kuglerne sendt af sted og rammer planten, fx. dets blad. Når kuglerne rammer planten, vil én eller flere af disse kugler påvirke planten og få indsat det ønskede DNA, dog er det en skrøbelig og upræcis metode, da det ikke vides hvor DNA'et blive indsat, og om det faktisk vil virke. Denne proces ses på figuren til venstre.



ved at  
som  
Når  
vil

## DNA

DNA udgør arvemateriale i levende organismer, og beskrives ved et simpelt bogstavealfabet bestående af fire bogstaver. (A,G,T,C). Oprenset DNA er hvor cellens DNA er det eneste der er bevaret, dvs. man har ødelagt og frasorteret alt andet. Det er derfor nærmest det samme som nøgen-DNA, dog er det vigtigt at vide, at nøgen-DNA er uden histoner (det er en gruppe af basiske proteiner, hvor der findes fem hovedtyper, H1, H2A, H2B, H3 og H4. De danner nucleosom, som sidder på en lang streng viklet om nucleosomet).



## Anvendelsesområde

Man anvender transformation til forskellige formål i hverdagen. Et af disse formål er gensplejsning. Man gensplejser for at danne de såkaldte genetisk modificerede organismer som man med transformation kan forbedre med det indsatte gens egenskaber. Gensplejsning er bl.a. meget udbredt blandt fødevarer og hvor

man indsætter genet for en ønsket egenskab og dermed giver den videre til produktet. Det er kunne eksempelvis være i en risplante hvor det tidligere er set at man transformerede et gen ind i planten der gjorde planten mere udholdelig og gav den større chance for at overleve og dermed mere ris for landarbejderne at sælge.

## Udstyr/materialer.

**I et forsøg med transformation af E.coli med pFG plasmid anvendte vi følgende materialer:**

Transformationsceller  
Supercoiled pFG (pFluoroGreen™)  
Ampicillin  
IPTG  
CaCl<sub>2</sub>  
Steril LB-agar (ReadyPour) 2 flasker  
Steril LB-medium (Recovery medium)  
Små petriskåle  
Store petriskåle  
Sterile mikropipetter  
10mL pipetter  
Sterile tandstikker  
Sterile podenåle  
Mikrocentrifugerør med skruelåg  
Mikropipetter 5-50 µL samt spidser  
Varmeblok på hhv. 37°C og 42°C  
Termometer  
Varmeskab 37°C og 34°C  
Pipettesugere  
Is  
Penne  
Mikrobølgeovn  
Handsker/handgrip e.l.  
UV-lampe

## Fordele og ulemper

### Fordele ved elektroporation:

- Det er en elektrisk process, hvilket gør at det er en hurtig process og man kan lave transformationen uden at cellerne er behandlede.

### Fordele ved Shot-gun

- Shot-gun metoden er den bedste og hurtigste metode, når man skal indsætte DNA i planter.

### Fordele ved kemisk kompetence:

- Det er en mere præcis metode at indføre DNA'et.

#### **Ulemper ved elektroporation:**

- Elektriciteten der bruges kan være for høj, og dermed skade cellerne.
- Hvis der er salt tilstede, vil det ødelægge indsættelsen af det nye DNA.

#### **Ulemper ved Shot-gun:**

- Ved at bruge shot-gun metoden bliver det en meget upræcis og ukontrolleret process, da man ikke selv kan kontrollere hvor DNA'et bliver indsat.
- Shot-gun metoden kan ikke garantere, at det lykkedes.

#### **Ulemper ved kemisk kompetence:**

- Det er en lang process med en masse forarbejde, som skal være korrekt ellers vil transformationen mislykkes.
- Selve processen kan meget nemt blive kontamineret, da det kræver en meget steril arbejdsprocess.

### **Litteratur og links**

[https://en.wikipedia.org/wiki/Gene\\_gun](https://en.wikipedia.org/wiki/Gene_gun)

<http://www.innovateus.net/science/what-dna-particle-bombardment>

[http://www.news-medical.net/health/What-is-a-Liposome-\(Danish\).aspx](http://www.news-medical.net/health/What-is-a-Liposome-(Danish).aspx)

<https://www.youtube.com/watch?v=pAQM4P0owSY>

<http://www.biotek.gyldendal.dk/Bioteknologi%20/Kapitel%201/~media/Files/Bog%202/Kapitel%201%20%20Genteknologi.ashx>

<http://www.faktalink.dk/titelliste/gens/gensgent>

<http://www.biotechacademy.dk/Undervisningsprojekter/Gymnasiale-projekter/genteknologi/teori/4genteknologisketools/transformation>

# Kloning (meristemformering)

## BESKRIVELSE

Begrebet kloning er den metode der bruges når et organisme eller en celle skabes med nøjagtige samme gener. Det er en samling af identiske kopier, hvilket betyder at de har samme arvemateriale. Kloner dannes ved direkte kopiering af organismens arvemateriale modsætning af en naturlig formering, hvor det nye individ får sit arvemateriale fra både moderen og faderen. Derudover findes der 3 forskellige former for kloning<sup>3</sup>:

- Dna-kloning
- Terapeutisk kloning
- Reproduktiv kloning.

## DNA-kloning

Kloning af DNA, også kaldt molekylær kloning, udnytter det faktum, at den kemiske struktur af DNA grundlæggende er den samme i alle levende organismer. Ved denne type kloning producerer man ofte mange kloner af samme gen og denne metode er derfor oplagt til produktionen af eksempelvis insulin. Det skyldes at kloningen giver et hurtigere, billigere og renere produkt end ved andre metoder. I kriminalsager bliver denne metode også benyttet. Finder man dna på et gerningssted, gør man ligeledes brug af teknikken bag molekylær kloning, hvor man her kopiere forbryderens dna hjælp af PCR teknikken.

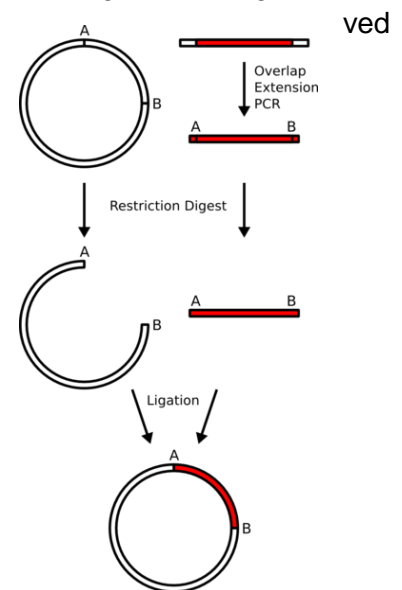
## PRINCIP OG ANVENDELSE

Ved dna-kloning er der tale om tre væsentlige faktorer:

- værtscelle
- doner
- vektor

Værtscellen er den celle, hvor det nye gen skal overføres til. Donoren er naturligvis det gen man ønsker at få overført til en ny celle. Til slut er vektorerne den, der skal overføre selve genet til fra den donerede celle til værtscellen, på den bedst mulige måde. Som vektor benyttes der oftest plasmider (ringformet DNA). Dette plasmid bliver ved hjælp at et restriktionsenzym klippet op, og bliver her blandet med donor DNA'et. Gennem plasmidet eller viraene kan doner DNA'et nu overføres til værtscellen, hvorved det nu omdannede gen kan producere sit protein.

## FORDELE OG ULEMPER



<sup>3</sup> SRP af Sally Dababech

Fordelene ved dna-kloning/molekylær kloning er mange. Som tidligere beskrevet er det bl.a. muligt hurtigere og billigere at produceres insulin. Igennem mange år har man ligeledes brugt kloning af planter, for at gøre den bedre og større. Inden for medicin og landbrug er der altså stor gavn af kloning.

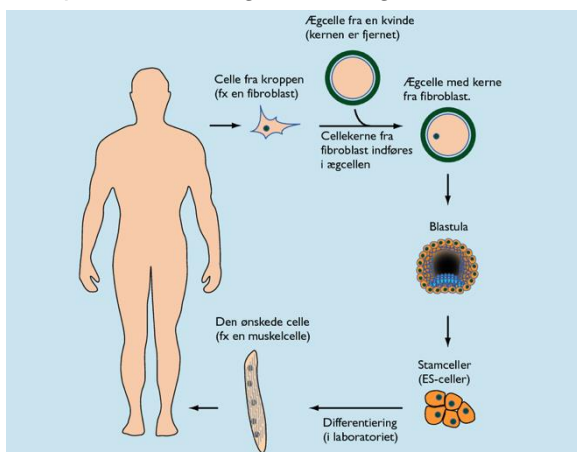
Ulemper er der dog også. Da mange planter efterhånden er kopier af hinanden og dermed er ens, gør det dem yderst modtagelige for sygdomme, og der kan derfor opstå udryddelse af en helt art. Naturligvis opstår der også mange etisk spørgsmål, når der tales om kloning, da man ændre på naturens naturlige gang.

## Terapeutisk kloning

Terapeutisk kloning er en reproduktivt kloning, hvorpå man kan lave en kopi af et bestemt individ. Metoden kaldes også kernetransplantation. Det forgår på følgende måde: En cellekerne fra en kropscelle fra en patient overføres til en ægcelle. Ægget indeholder arvemateriale fra patienten, så hvis cellen "spoles" tilbage i dens udvikling, har den samme potentiale som en embryonal (uudviklet) stamcelle.

### PRINCIP OG ANVENDELSE

Terapeutisk kloning er kloning af menneskelig DNA til medicinske formål. I praktisk anvendelse ville



denne sundheds mæssige tilstand eller sygdom. Den udviklede somatiske celle i patienten er derefter indsat i ægceller. Det bliver stimuleret til at danne en klynge af celler, blastocyst. Denne blastocyst har både et ydre og indre lag af celler, og det er det inderste lag, også kaldet den indre celle, der er rig på stamceller. Stamcellerne kan udvikle sig til alle typer væv i det individ cellerne er taget fra, og man kan nu høste de stamceller der er brug for, for at kurere sygdommen eller reparere det væv der er ødelagt.

### FORDELE OG ULEMPER

En stor fordel ved terapeutisk kloning er, at cellerne der bliver fjernet er pluripotente. Pluripotente celler kan potentielt behandle sygdomme i ethvert organ eller væv ved at erstatte beskadigede og dysfunktionelle celler. En anden fordel ved denne form for behandling er, at risikoen for immunologiske afvisninger er lettet fordi patientens egen genetiske materiale anvendes. Hvis en celle linje bliver oprettet med celler fra en anden person, ville patientens krop være mere tilbøjelig til at angribe de transplanterede celler, og stamcelletransplantationen ville kunne blive afvist. Terapeutisk kloning kan reducere ventetid på organtransplantationer, og kan mindske de immunologiske problemer forbundet med orgel transplantation terapi. <sup>4</sup>

<sup>4</sup> SRP af Sally Dababech

En ulempe ved terapeutisk kloning er, at kun en lille del af de udvundne stamceller er brugbare, da nogle celler kan mutere forårsage tumorer hos patienten. For at helbrede en sygdom vil det kræve millioner af ægceller, men forskere kan ikke finde alle nødvendige ægceller på nuværende tidspunkt.

## Reproduktiv kloning

Reproduktiv kloning er defineret som den bevidste fremstilling af genetisk identiske enkeltpersoner. Hvert enkelt nyproducerede gen er en klon af den oprindelige. Enæggede (identiske) tvillinger er naturlige kloner. Kloner indeholder identiske sæt af genetisk materiale i kernen, det rum der indeholder kromosomerne af alle celler i deres krop. Celler fra to kloner har således det samme DNA, og de samme gener i deres kerner. Alle celler, herunder æg, indeholder også nogle DNA i energi-genererende "fabrikker" kaldet mitochondrier. Disse strukturer er i cytoplasmaet, regionen i cellen uden for kernen. Mitochondrier indeholder deres egen DNA og reproducere uafhængigt.

### **PRINCIP OG ANVENDELSE**

Reproduktiv kloning er en metode brugt til at lave en klon (en identisk) kopi af en flercellede organisme. De fleste flercellede organismer former sig ved seksuelle midler, som indebærer genetiske arvemateriale af to personer (forældre), hvilket gør det umuligt at generne er en identisk kopi eller klon af begge forældre.

I 1996 blev fåret Dolly klonet. Succesraten for kloning på dette tidspunktet var meget lav. Dolly levede i syv år og døde af vejrtrækkens problemer. Der er spekulation, om det er fordi DNA cellen tilhører et ældre dyr, eller om alderen på DNA'et kan påvirke den forventede levetid af et klonet individ. Siden Dolly, har flere dyr været succesfuldt klonet, selv om disse dyr ofte udviser en ansigtsbehandling, lemmer og hjerte misdannes. Der har været forsøg på at klon menneskefoster af embryonale stamceller. Nogle gange referer det til terapeutisk kloning, som netop også udvikler teknikken med stamceller, der forsøger at kurere skadelige sygdomme eller defekter. Hvor reproduktiv klonings formål er at producere et helt organisme. Stadigvæk har terapeutisk kloning haft modstand på baggrund af bioetiske overvejelser.

### **FORDELE OG ULEMPER**

En af det største fordel ved reproduktiv kloning er, at man kan dyrke livsvigtige organer, som kan bruges til udskifte et sygt organer. Det kunne for eksempel være ved hjertesygdomme, hvor patients hjerte er beskadiget, kan man have en nøjagtig kopi voksne blot for at erstatte det. Der er også den fordele ved det, at kloning giver mulighed for at manipulation af gener, hvor embryoer kan skabes fri for arvelige genetiske prædisposition eller sygdomme. Kloning af det menneskelige væv kan også være med til at behandle kræft.<sup>5</sup>

En ulempe ved reproduktiv kloning er etikken med det, for der er mange som mener at det etiske forkert at klon individer.

## Meristemformering

Meristemformering er en metode til at formere planter hurtigt.

---

<sup>5</sup> SRP af Sally Dababech



Ved sterile forhold kan man i et laboratorium ved denne teknik kloner planter. Med hjælp fra vækstmedier og væksthormoner er det muligt at skabe nøjagtige kopier af moderplantens arvmasse. Metode kan man dermed lave kopier af specielt gode planter og skabe dem i store mængder.

Princippet bag meristemformeringen handler om at tage væv fra plantens yderste vækst punkt. Et stykke plante placeres på et vækstmedie og gror her efter på dette vækstmedie.

## **FORDELE OG ULEMPER**

Nogle af de mange fordele ved denne metode er at det både er nemt og billigt at kloner mange planter.

## **UDSTYR OG MATERIALE**

Udstyr og materiale afhænger meget af hvilke type kloning der er tale om, og det kan derfor være svært at nævne de forskellige materialer. Fælles for alle typer er dog, at der arbejdes i et laboratorium med meget små ting, og det hele foregår derfor under et mikroskop.

## **LINKS**

<http://www.faktalink.dk/titelliste/kloning/baggrund-om-kloning>

<http://www.biotechacademy.dk/Undervisningsprojekter/Gymnasiale-projekter/Stamceller/Teori/Immunforsvaret-kloning-og-kunstige-stamceller>

[http://denstoredanske.dk/Natur\\_og\\_miljø/Biokemi\\_og\\_molekylærbiologi/Molekylærbiologi/kloning](http://denstoredanske.dk/Natur_og_miljø/Biokemi_og_molekylærbiologi/Molekylærbiologi/kloning)

<http://www.einsten.net/12/2014/12/hvordan-molekyler-kloning-arbejde-.html>

<http://www.einsten.net/12/2015/05/fordele-og-ulemper-ved-kloning.html>

<http://www.etiskraad.dk/etiske-temaer/kloning/undervisning-til-gymnasieskolen/kloning/reproduktiv-og-terapeutisk-kloning>

Animation om kloning:

<https://www.youtube.com/watch?v=FYvcLh4Y43s>

# In vitro fertilisation.

---

In vitro fertilisation, også kaldet IVF, er en form for kunstig befrugtning som sker udenfor kroppen. IVF er også kaldet reagensglasbefrugtning, da "in vitro" betyder i et reagensglas.

Når sædcellen hjælpes ind i ægget kaldes det IVF med mikroinsemination eller ICSI, som står for Intra Cytoplasmatisk Sædcelle Injektion.

IVF behandlingen er en mulighed, som det offentlige og private klinikker tilbyder barnløse voksne. Kvinder kan behandles så længe de er under 40 år lige meget om de har en samlever eller er enlige, alt det kræver en de har en sæddonor.

Et andet krav er, at der ikke allerede er børn i hjemmet, da behandlingen kun bliver tilbudt til folk, som ikke har mulighed for at blive gravide på naturlig vis.

Før man kan få en henvisning til IVF behandling, så skal man tjekke, hvilken årsag der er til barnløsheden. Begge parter skal også have undersøgt om de er HIV positive og om de har leverbetændelse B og C.

## Materialer

Reagensglas

Steril Arbejdsplads

Lafbænk

Mikroskop

Pipetter

Kanyler

Andet

## Behandling

IVF behandlingen består af følgende faser: Hormonbehandling, ultralydsscanning, ægudtagning, befrugtning, æg oplægning og tiden efterfølgende. Hormonbehandlingen har til formål at forbedre æggestokkene, således at der bliver dannet flere æg. Der findes flere typer af hormonbehandlinger, hvoraf de hyppigste brugte er lang protokol og kort protokol. Antallet af æg der bliver dannet under denne fase, kan være forskelligt fra kvinde til kvinde, alt afhængigt af kvindens alder og deres reaktion på selve hormonbehandlingen.[1] Den lange protokol bliver oftest delt op i 2 faser: Nedreguleringsfasen og stimulationsfasen. Under nedreguleringsfasen skal man bruge et hormonpræparat, i form af en næsespray, som medfører at produktionen af ens hormoner bliver nedreguleret. Hvis kvinden har 28 dages cyklus, skal hun starte med næsesprayen på 21. cyklusdag.

Efter nedreguleringsfasen kommer stimulationsfasen. Samtidig med at kvinden bruger næsesprayen, skal hun også bruge et hormonpræparat, hvilket kan være Gonal F, Puregon eller Menopur, i form af en indsprøjtning, som man får i omkring 10 dage efter nedreguleringsfasen. Her bliver ægudviklingen stimuleret. Efter ca. 8 dage, skal man have taget en ultralydsscanning, for at undersøge ægblæren. Har ægblæren ikke en passende størrelse, gentages det forrige indtil at den får en passende størrelse. Når ægblæren får den passende størrelse, vil man få en indsprøjtning, kaldt hCG. Dette gives for at gøre æggene færdigmodne, så de er klar til at tages ud.

Under den korte protokol, vil springe over nedreguleringsfasen. Her begynder man direkte med stimulationsfasen på 2.-3. cyklusdag. I nogle tilfælde bliver der anvendt en supplerende medicin, kaldt GnRH-antagonist. Denne medicin gives i form af en indsprøjtning, fra 6. stimulationsdag indtil æg blærerne er store nok. Denne medicin har til formål at hæmme spontan ægløsning.

Efter denne fase kommer man til ægudtagningen. Her bliver æggene suget ud med en tynd nål, som man får stikket ind gennem skeden til æggestokken. Efter man har taget æg ud af kvinden, skal der laves en befrugtning. Manden vil her aflevere en sædprøve til sin læge, som vil sende det videre til et laboratorium, som vil behandle sædprøven. I laboratoriet vil sædvæsken blive fjernet, hvor de sædceller som kan bruges, bliver isoleret, således det kan bruges til befrugtning. Efter ægudtagningen vil man blive anbefalet til at tage progesteron, hvilket kan virke forbedrende for æggenes udvikling.

Efterfølgende vil æggene fra kvinden blive undersøgt vha. et mikroskop. Æggene og sædcellerne bliver overført til nogle mindre skåle med dyrkningsvæske i og bliver derefter sat i et varmeskab. Efter et par dage bliver befrugtningen sat op i kvindens livmoder. Her indsættes 1-2 befrugtede æg. Det er meget vigtigt at blæren ikke er helt tom, når de befrugtede æg bliver sat op i kvindens livmoder. Efter et par uger, kan kvinden tage en graviditetstest. Er kvinden ikke blevet gravid, er det vigtigt at der er gået 2 menstruationscyklusser, før hun få lavet en befrugtning igen.

### **Fordele og ulemper:**

Fordelen ved at få en IVF-behandling er, at infertile par har mulighed for at få børn. Ulemperne kan læses i afsnittet om problemer, bivirkninger og risici.

## Problemer, bivirkninger og risici

Alt i alt er der en meget lille risici forbundet med en IVF-behandling, dog kan følgende risici og bivirkninger forekomme:

### 1) Bivirkninger forårsaget af medicin

- Hos nogle kvinder kan bivirkningerne være forårsaget af *hormonbehandling*, hvilket kan resultere i humørsvinger, svedeture og hovedpine.
- *Overstimulationssyndrom (OHSS)* i æggestokkene kan forekomme hos kvinder, der tager medicin til behandling af barnløshed. Medicinen gør, at æggestokkene producerer en normal eller øget mængde æg pr. måned. Denne proces kan resultere i en overstimulering, hvor æggestokkene bliver hævede og forårsager væskeophobninger i henholdsvis bryst og underliv. Dette giver smerter i underlivet og vægtøgning.

### 2) Komplikationer til ægudtagning

- *Infektion i underlivet* kan forekomme. Dette sker dog kun meget sjældent og kan behandles over en kortere periode med antibiotika. Igennem forløbets start gives der også antibiotika for at forebygge denne komplikation.
- Risikoen for *kromosomfejl* øges en lille smule. Dette skyldes ikke selve behandlingen, men en biologisk fejl hos det infertile par.
- Øget risiko for *flerfoldsgraviditet* (Mere end et foster i livmoderen). Dette gør, at muligheden for at føde for tidligt og spontan abort øges.

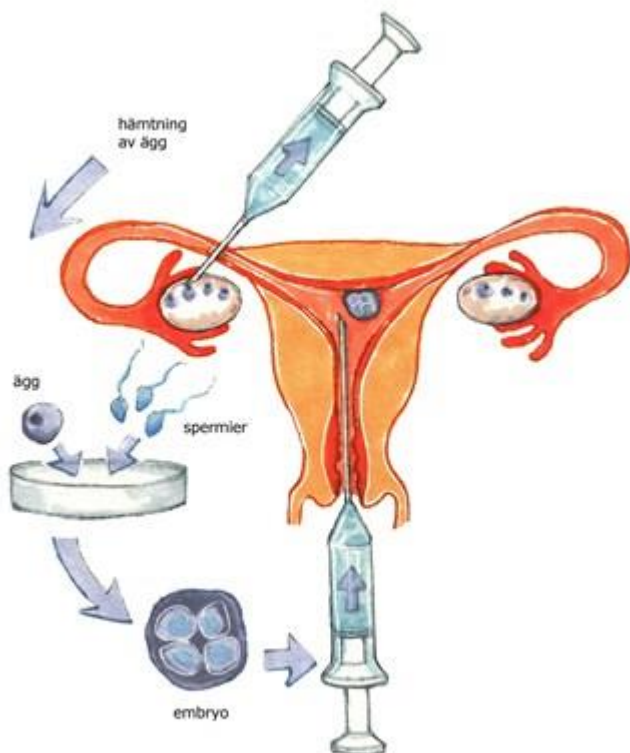
### 3) Sundhedsrisici for børnene

- Børnene har en øget risiko for at udvikle cerebral parese (Spastisk-lammelse). Det skyldes, at de enkeltfødte IVF-børn i mange tilfælde starter deres tilværelse som tvillinger. Generelt er forekommer misdannelser af børn hyppigere end hos børn født efter naturlig befrugtning.
- Chancen hos børnene fordobles i forhold til visse typer af hjertefejl
- Børnene er fire gange så tilbøjelige til at have visse mave-defekter.

### 4) Psykiske belastninger

- IVF-behandlingen kan psykisk være belastende for både kvinden og manden grundet uvisheden og ventetiden. Det kan resultere i humørsvinger og følelser som eksempelvis vrede, fortvivlelse eller misundelse.

### Illustrationer af IVF metoden.



**Links:**

[https://www.rigshospitalet.dk/afdelinger-og-klinikker/julianemarie/fertilitetsklinikken/undersogelse-og-behandling/Documents/IVFvejledning2014\\_ny.pdf](https://www.rigshospitalet.dk/afdelinger-og-klinikker/julianemarie/fertilitetsklinikken/undersogelse-og-behandling/Documents/IVFvejledning2014_ny.pdf)

<http://www.danfert.dk/index.php?CID=345>

<http://www.odense-ivf.dk/behandlinger/ivf-behandling-patientinformation>

<https://www.libero.dk/dig-netop-nu/artikler/?articleId=299372>

# Prænatal diagnostik - Fosterdiagnostik

Langt største delen af dem, som planlægger en graviditet eller allerede er blevet konstateret gravide, har en vis frygt for, at deres barn skal fejle noget. Det vil sige, at barnet er misdannet, lider af en arvelig sygdom, handicaps mm. Denne frygt for ikke at få et raskt barn har medført udviklingen af forskellige metoder til undersøgelse af fostret og fostreanlægget, hvormed man ud fra disse metoder kan stille en diagnose af barnet.

Fosterdiagnostik består af flere undersøgelser, hvor i første omgang får kvinden tilbudt en risikofri undersøgelse, der ikke kræver nogle indgreb (Ultralydsscanning). Alt afhængig af om undersøgelsesresultatet er positivt eller negativt, kan kvinden få tilbudt yderligere undersøgelser. Disse undersøgelser har siden 2004 stået til rådighed for alle kvinder i Danmark, og muliggør for de kommende forældre at træffe et informeret valg om, hvorvidt de ønsker at gennemfører graviditeten i tilfælde af et sygt barn. Derudover vil de også være bedre forberedte på at modtage det syge eller handicappede barn i tilfælde af, at de vælger at gennemfører graviditeten.

## Præimplantations Genetisk Diagnostik (PGD)

Ønsker man at undersøge fostreanlægget er dette kun en mulighed i forbindelse med kunstig befrugtning uden for kvindes livsmoder. Her er det muligt på forhånd at undersøge fostreanlægget for eventuelle fejl i arvematerialet inden det lægges op i kvindens livsmoder. Princippet består i, at man mens fostreanlægget kun består af stamceller udtager et par af disse celler, hvormed man kan lave en nærmere undersøgelse af kromosomerne. Denne metode kaldes for Præimplantations Genetisk Diagnostik (PGD). Ud fra disse kromosomer er det muligt at afgøre om fostreanlægget har gener der kan medfører en arvelig sygdom, eller om fostreanlægget har et afvigende antal kromosomer, der stammer fra en fejl i forældrenes kønscelledannelse.

Nogle af de mest kendte kromosomsygdomme er listet op i tabellen nedenfor, hvor der samtidig er tilføjet en lille beskrivelse til hver af sygdommene:

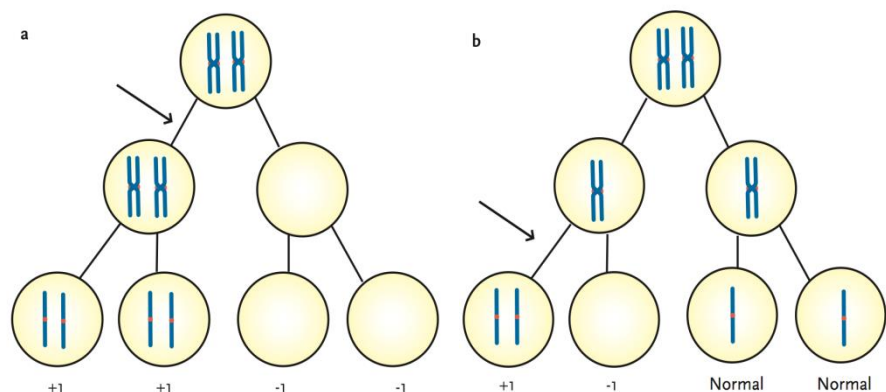
Kromosomsygdom	Beskrivelse
Downs syndrom – Trisomi 21	Et ekstra kromosom af nr. 21, mental retardering Misdannelser af hjertet, problemer med syn og hørelse
Edwards syndrom – Trisomi 18	Et ekstra kromosom af nr. 18, svær mental retardering Mange misdannelser
Pataus syndrom – Trisomi 13	Et ekstra kromosom af nr. 13, svær mental retardering Mange misdannelser
Klinefelters syndrom	Et ekstra X-kromosom, mand med feminine træk i kropsobygningen, oftest sterile

Tri-X-syndrom	Et ekstra X-kromosom, kvinde der er lidt højere end gennemsnittet, ofte normal fertilitet
Dobbelt-Y-syndrom	Et ekstra Y-kromosom, mand der er højere end gennemsnittet, ofte normal fertilitet
Turners syndrom	Kun et kønskromosom (X), kvinde der er lavere end gennemsnittet, steril, forskellige misdannelser

Tabellen er fundet i Biologi til tiden – Se kilder

## Fejl i meiosen

I en meiose bliver der normalt dannet fire kønsceller ud fra en celle med et normalt antal kromosomer. Hvert af disse kønsceller indeholder 23 kromosomer, og når der sker en befrugtning vil zygoten komme til at indeholde 46 kromosomer. Dog sker der af og til fejl i meiosen, så der kommer en afvigelse i antallet af kromosomer i kønscellerne. Som man kan se på figur a, er de homologe kromosomer ikke blevet adskilt i den første celledeling. Der kan også ske en fejl i anden celledeling, hvor kromatiderne i et kromosom ikke bliver adskilt. Dette ses på figur b. Begge fejl betyder, at der vil være en afvigelse i antallet af kromosomer i kønscellerne. De kønsceller, som indeholder to kromosomer, vil ved en sammensmeltning med en normal kønscelle resultere i, at vi får en zygot med 47 kromosomer, hvilket er for mange. De kønsceller, som ikke indeholder et kromosom, vil ved sammensmeltning med en normal kønscelle få en zygot med 45 kromosomer, hvilket er for lidt.



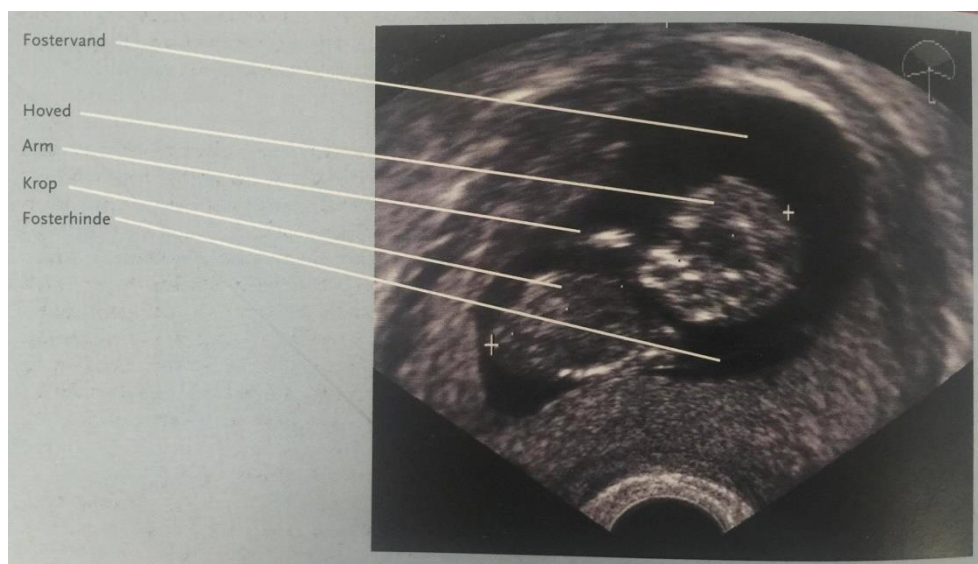
## Ultralydsscanninger

En ultralydsscanning er en scanning, som en gravid kvinde får lavet første gang omkring uge 12 i graviditeten. Metoden er, at man ved hjælp af ultralyd fra

måleapparat, sender lydbølger ind gennem kvindens maveskind og videre ind til livmoderen. Herefter sendes der lydbølgerne tilbage til et apparat, og inde i ultralydsapparatet oversættes der et billede af fosteret på en fjernsynsskærm. Dette kan ses på billedet nedenfor:

en





Det er obligatorisk, at gravide, der er i 9.-13. graviditetsuge, bliver tilbudt to undersøgelser, og med er ultralydsscanning, og nogle gange bliver den gravide tilbudt en scanning mere i uge 18-20. De fleste kommende forældre vælger at sige ja til tilbuddet, da de kan se fosteret, og se om de skal have mere end et barn. Formålet med scanningen er ikke at vise kønnet, men at påvise væksthæmning eller misdannelser. I de fleste sammenhænge viser det sig, at de kommende forældre venter et normalt barn, da de fleste fosteranlæg med alvorlige handicaps dør af sig selv inden implantationen eller få uger efter. Hos nogle hospitaler laver man også en nakkefoldsscanning i 9. – 13. uge, hvor man måler tykkelsen af fosterets nakke. Hvis fosteret har væskeansamlinger netop hér, er der sandsynlighed for, at fosteret har Downs, Edwards eller Pataus syndrom. Hvis dette er tilfældet, vil forældrene blive tilbudt en undersøgelse af fosterets kromosomer. I 18. – 20- graviditetsuge er fosteret så udviklet, at man kan se misdannelser som hjertefejl, rygmarvs- og bugvægsbrok, misdannelser af nyrer, arme eller ben. Dette foregår også ved en ultralydsscanning.

## Doubletest

Ved en første ultralydsscanning vil den gravide få taget en blodprøve, som man kalder en doubletest. Her undersøger man to stoffer af kvindens blod, der sammen med hendes alder, kan sige noget om Downs, Edward eller Pataus syndrom. Hvis kvinden er over 35 år, er sandsynligheden større for, at barnet kommer til at lide af overstående handicaps. Når testen er fuldført, får kvinden et meget præcist svar på, om der er sandsynlighed for, at barnet kommer til at få nogle af de tre syndromer. Hvis tilfældet skulle være, og kvinden har høje risikotal, skal hun have taget en fostervands- og moderkageprøve, men disse tilfælde er meget sjældne, og kun 3% af undersøgte har høje risikotal.

## Fostervands- og moderkageprøver

Hvis man vil undersøge fosterets kromosomer mere efter de to forrige undersøgelser, foretager man en moderkage- eller fostervandprøve. De prøver laver man, da de vil vise fosterceller, som man undersøger efterfølgende. Hvis fosteret har kromosomfejl eller lignende, vil de kommende forældre bliver spurgt, om de ønsker en abort eller vælger at få et barn med et muligvis svært handicap.

Fostervandsbiopsi - Prøven opdeles i små stykker, som dyppes i formalin, eller et andet fikseringsmiddel. Herefter bliver det indlejret i parafin, som snittes i meget tynde skiver. Til sidst placeres skiverne på et objektglas, hvor parafinen fjernes og vævet farves med nogle farver, der fremhæver de mikroskopiske detaljer.

## Tripletest

Når en gravid kvinde, der har kombineret doubletest, aldersvurdering (hvis kvinden er 35+ år) og nakkefoldsscanning med højt risikotal ikke vil have taget en fostervands- eller moderkageprøve, kan hun få lavet en tripletest, som er det samme som ved doubletest, hvor man undersøger tilstedeværelsen for to stoffer i kvindens blod, men i den her test undersøger man for tre forskellige stoffer i blodet. Testen laver man i 15. – 20. graviditetsuge sammen med en ultralydsscanning.

## Fordele og ulemper

Fordele:

- Mulighed for hurtigere at kunne behandle barnet efter fødsel ved eventuelle komplikationer
- Muliggør for de kommende forældre at træffe et informeret valg om, hvorvidt de ønsker at gennemfører graviditeten i tilfælde af et sygt barn
- Forældre har mulighed for at blive oplyst om barnets køn og om de venter tvillinger
- Forældre finder oftest en vis tryghed i, at de får kendskab til deres barns sundhedsmæssige tilstand

Ulemper:

- Unødvendige bekymringer hos forældrene om deres barns sundhed og fremtid
- Idet man vælger at modtage en fostervand eller moderkageprøve opstår der en risiko på 1% for at kvinden vil få en utilsigtet abort, hvilket der skyldes at man udtager fostervand eller moderkagevæv.

## Animationer

### Ultralydsudstyr:



### Fostervandsprøve:



## Ultralyd og fostervandsundersøgelse video

<https://www.sundhed.dk/borger/sygdomme-a-aa/graviditet/illustrationer/animationer/fostervandsproeve-amniocentese/>

## Beskrivelse af fosterdiagnostik

Jacob Birkler, formand for Det Ethiske Råd forklarer fosterdiagnostik

[https://www.youtube.com/watch?v=gOgemGSH\\_3I](https://www.youtube.com/watch?v=gOgemGSH_3I)

## Links og bøger

- <http://www.faktalink.dk/titelliste/fosterdiagnostik/hele-faktalinket-om-fosterdiagnostik>
- <http://altomboern.dk/artikel/fosterdiagnostik>
- <http://www.netdokter.dk/sunderaad/undersogelser/biopsi.htm>
- Als Egebo, Lone m.fl.: Biologi til tiden. 2. udg. Nucleus, 2006. (Bog)

# Elektrokardiografi (EKG)

---

EKG er en metode til at måle hjertets elektriske aktivitet. Det viser hjerterytme og, om der er hjerteforstyrrelser eller iltmangel i hjertet. Metoden viser et øjebliksbillede af undersøgelsen. Det er de elektriske impulser, som måles ved en EKG. Med en EKG-måling vurderes der:

- Ændringer i hjerterytmen
- Om der er tegn på nedsat iltforsyning til hjertet
- Tegn på nyt eller ældre myokardieinfarkt (blodprop i hjertet)
- Om hjertet er overbelastet
- Om impulserne breder sig normalt i hjertemusklen

Ved en EKG-måling registreres de elektriske impulser, der sendes gennem hjertet. Disse impulser sørger for, at hjertet slår regelmæssigt. De elektriske impulser udsendes af hjertet, når det trækker sig sammen for at pumpe blodet rundt i kroppen.

For at optage ekg'et sættes der elektroder på både bryst, arme og ben. Der er i alt ti elektroder, som kobler til et måleudstyr, som kan måle hjertets elektriske impulser og danne en graf ud fra det.

For at få det mest præcise resultat under undersøgelsen, skal man ligge helt stille, mens ekg'et optages.

Man kan udover et hvile-EKG, tage et arbejds-EKG. Dette måles, hvis det er nødvendigt at se på hjertets funktion i belastningssituationer. Ved denne EKG-måling benyttes en motionscykel eller et løbebånd til hjælp.

Hvile EKG er helt smertefrit, men ved undersøgelse af arbejds-EKG kan der (meget sjældent) forekomme hjertestop. Denne risiko skyldes den høje belastning af hjertet.

Elektrokardiografi tager cirka ti minutter.

Ved en elektrokardiografi laves en grafisk kurve af signaler sendt fra elektroderne til ekg-apparatet. Denne kurve udprintes eller gemmes elektronisk. Den giver lægen en hel del information om hjertefunktionen. Hvis EKG ikke ser ud som for et normalt hjerte, er der stor risiko for, at der er noget galt med hjertet. Ekg'et kan give oplysninger om iltmangel i hjertet, blodprop i hjertet, effekten af medicinsk behandling, rytmeforstyrrelser, arvelige hjertesygdomme m.m.

Risikoen for hjertestop er selvfølgelig en ulempe ved denne form for undersøgelse. Trods den ene ulempe, ses en hel del fordele. Ved brug af EKG-måling er det blevet nemmere at forudsige det enkelte sygdomsforløb, og på denne måde tilpasse behandlingen bedre til den enkelte patient. Det at have nemmere ved at forudsige sygdomsforløbet, gør det nemmer at se, hvornår der reelt er behov for at operere patienten. Ved hjælp af elektrokardiogrammer kan der udføres op mod 10-15% færre operationer i forhold til forsnævring af hjerteklapperne.

Udover en mere præciseret behandling, er EKG-måling for det meste både smertefrit, hurtigt og enkelt.

## Princippet

Hjertet består af et højre og venstre forkammer (atrium) og hjertekammer (ventrikel). Det består derfor i alt af 4 kamre, hjertets egenskab er at pumpe blod ud i kroppen vha. elektriske impulser. Disse impulser sættes i gang af en lille specialiseret gruppe celler, som kaldes sinus-knuden, som er et bundt af nerveceller. Nervecellerne "kommunikerer" med hinanden ved at sende elektriske impulser til hinanden.

Hjernen sender signal til sinus-knuden for at starte hjertets funktion, dette sker ved det autonome nervesystem, som betyder at vi ikke selv kan bestemme om hjertet kan slå eller ej. Nerveceller skal igangsætte et aktionspotential for at sende elektriske impulser til hinanden. For at aktionspotentialet skal igangsættes, skal et transmitterstof, der kommer fra nogle vesikler fra en anden nervecelles synapse. Disse transmitterstoffer sætter sig på receptoren på dendritterne og åbner receptorens kanal, så der strømmer  $Ca^{2+}$  ind i det nye neurons dendritter hvor receptoren sidder på. Neuronerne har et hvilepotential på -70 mV, som er den spænding, hvor neuronerne er i hvile og ikke sender aktionspotential. Når der strømmer ind med  $Ca^{2+}$ -ioner, stiger spændingen i cellen til -50 mV, som er tærskelværdien. Receptorerne er spændingsfølsomme, så ved denne spænding vil alle receptorerne åbne, og flere positive ioner vil strømme ind, og spændingen vil komme højt op på omkring +30 mV, og herved vil signalet blive sendt igennem neuronet vha. dette aktionspotential, og signalet vil blive sendt videre til andre neuroner i sinus-knude, som starter impulsen i hjertet. Disse celler kaldes også pacemakerceller, da de virker som hjertets naturlige pacemaker. Denne sinus-knude sidder øverst i højre atrium. Sinus-knuden starter det elektriske signal, da det kan udløse elektriske impulser. Hjertet indeholder også andre celler, som har samme egenskab, men de er inaktive, når sinus-knuden virker. Derfor kaldes den normale hjerterytme af lægerne for sinusrytmen.

Ved normal hjerterytme breder det elektriske impuls sig fra sinus-knuden og ud i højre atrium, som gør, at muskelfibrene trækker sig sammen. Det blod, som er kommet ind i højre atrium ved afslapning af hjertet, bliver presset ind i højre ventrikel igennem trikuspidalklappen, som derefter lukker sammen, så blodet ikke kan strømme tilbage til højre atrium. Det elektriske impuls bevæger sig videre over til venstre atrium, hvor det samme sker, blodet strømmer bare igennem mitralklappen og ind i venstre ventrikel. Efter impulsen har bevæget sig fra top til bund i atrierne, fortsætter impulsen igennem den atrioventrikulære knude (AV-knuden), som er et knudepunkt mellem atrierne og ventriklerne. Impulset forsinkes en tiendedels sekund, så blodet i atrierne når at blive pumpet ind i ventriklerne. Impulsen ledes videre ned til ventriklerne i de his'ske bundter, som er en samling af ledningsfibre. Impulsen ledes fra det his'ske bundt og ned igennem purkinjefibrene i hjertemusklens, som kaldes myocardiet. Purkinjefibrene er muskelfibre, som er elektrisk ledende, de kan derved lede den elektriske impuls. Dette har til formål at gøre så hjertemusklens trækker sig sammen synkront. Når ventriklerne trækker sig sammen, pumpes blodet ud i kroppen. Højre atrie får afiltet blod fra kroppen, og højre ventrikel pumper blodet ud i det lille kredsløb, som går ud til lungerne. Det blod, som kommer ind i venstre atrie kommer fra lungerne og er blevet iltet, og det er det samme blod, som pumpes ud af venstre ventrikel, og blodet pumpes ud af aorta, kommer ud i kroppen og fordeler ilt til hele kroppen. I bilagene kan et EKG for et normalt hjerte observeres, og en illustration af de forskellige elementer i hjerterytmen. Nedenstående link er en animation af EKG og hjerterytmen.

<https://www.sundhed.dk/borger/sygdomme-a-aa/hjerte-og-blodkar/illustrationer/animationer/belastnings-ekg/>.

Hver celle i hjertet, som er med til at udbrede hjertets elektriske impulser, har 2 elektriske tilstande:

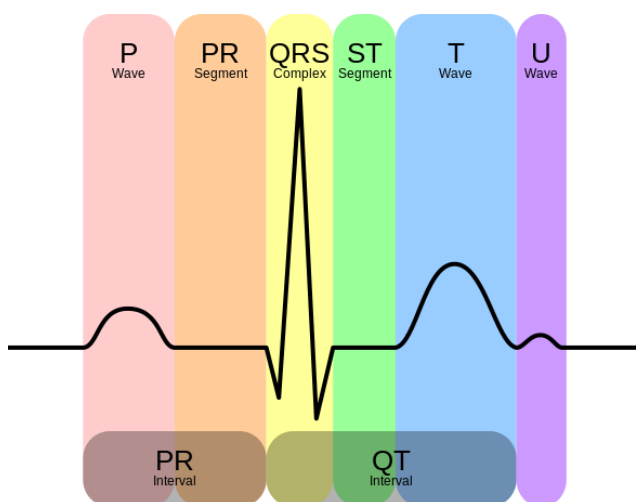
- ladet tilstand
- uladet tilstand

I den ladet tilstand (polariseret) er hjertecellerne klare og kan lede den elektriske impuls, som så fører til et hjerteslag. Efter hjerteslaget vil cellerne være uladet, inden de igen lades op til polariseret tilstand og der igen vil komme et hjerteslag.

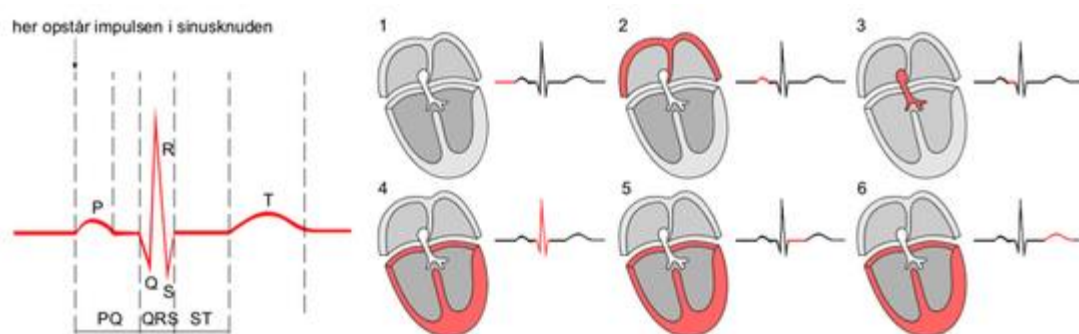
Uladet tilstand (refraktær, afslappet) er hjertecellerne ikke i stand til at lede en impuls.

Hos en rask person er det usædvanligt, at der vil opstå vedvarende rytmeforstyrrelse, uden en ydre faktor er indvirket. Ved raske personer skyldes hjerterytmeforstyrrelser, at personerne har fået et elektrisk chok eller indtaget stærkere lægemidler. Den stabile hjerterytmeforstyrrelse skyldes, at hjertet er fri for unormale elementer, som arvæv. Arvæv opstår for det meste efter myokardieinfarkt (blodpropper i hjertet). Arvæv i hjertet kan forstyrre impulsen i sinus-knuden eller ledningssystemet. Arvæv i hjertet kan også give hjerterytmeforstyrrelser ved, at andre områder end sinus-knuden udsender impulser, som breder sig til hjertet uden forbindelse til den normale sinusrytme.

## Bilag

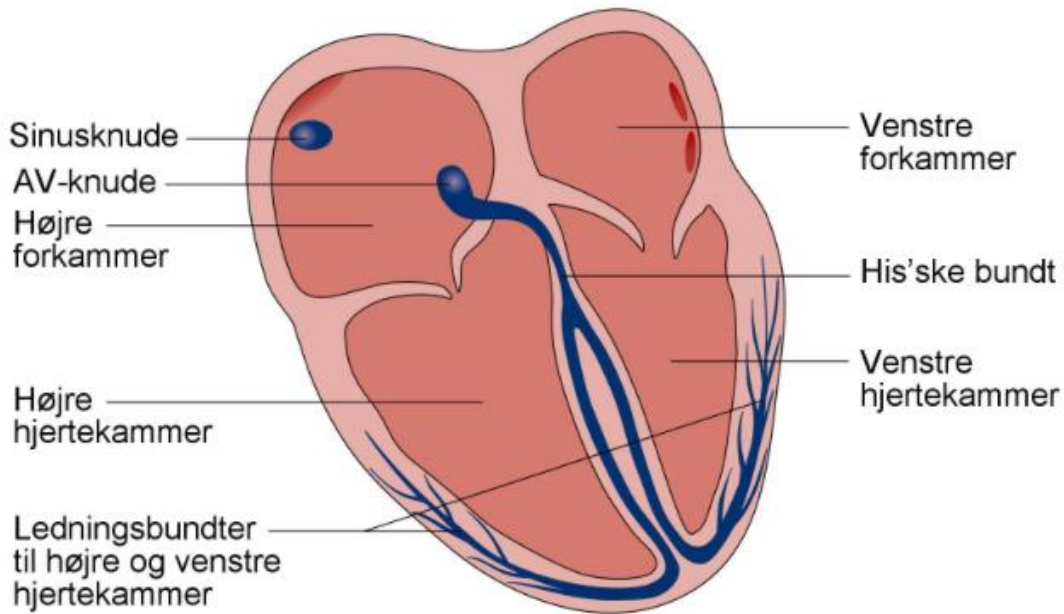


<https://www.sundhed.dk/borger/sygdomme-a-aa/hjerte-og-blodkar/illustrationer/animationer/belastnings-ekg/>



<http://www.denstoredanske.dk/@api/deki/files/7559/=244762.801.png?size=webview>





<https://www.sundhed.dk/borger/sygdomme-a-aa/hjerte-og-blodkar/om-hjerte-og-blodaarer/hjertets-elektriske-system/>

<http://www.netdoktor.dk/sunderaad/undersogelser/ekg.htm>

<https://www.hjerteforeningen.dk/alt-om-dit-hjerte/undersogelser/ekg/>

<http://min.medicin.dk/Undersoegelser/SygdomsUndersoegelse/30>

[http://www.sundhedsguiden.dk/da/temaer/alle-temaer/undersogelser/unders-oslav%3Bgelser-ved-hjertesygdom-\(inkl-ekg\)/](http://www.sundhedsguiden.dk/da/temaer/alle-temaer/undersogelser/unders-oslav%3Bgelser-ved-hjertesygdom-(inkl-ekg)/)

# Mikrobiologiske arbejdsmetoder

---

## Celledyrkning

### Beskrivelse:

Celledyrkning bruges til at få levende celler til at overleve og udøve deres funktioner uden for deres optimale. I 1900-tallet udviklede man denne metode, som hurtigt blev populært. Celledyrkning er en af de mest brugte metoder i alle biologiske, biotekniske, genetiske og medicinske laboratorier. Under brug af celledyrkning kan man studere hele cellen og dens funktioner, hvilket man kan bruge i forhold til især medicin.

### Princip:

Celledyrkning bliver brugt til blandt andet cancerforskning, produktion af virus og antistoffer, og ikke mindst biokemiske og biologiske undersøgelser.

### Anvendelsesområde:

Menneskecellen dyrkes således, at der tages en blodprøve, et organ eller et væv. Ofte opsamles der også uønskede celler så derfor skal prøven renses fra disse celler. Prøven udsættes for forskellige enzymer, som sørger for en adskillelse og oprensning. Herefter overføres cellerne til en væske, som er specielt tilpasset cellernes leveforhold (sukker, salte, proteiner, osv.) cellerne bliver sat under sterile forhold med tilpasset temperatur. Nu har cellerne hvad de skal bruge for at leve og udvikle sig. Oftest vil enkelte celler efterhånden dominere.

### Udstyr, materiale mm:

Ved celledyrkning bruges dyrkningskamre. Cellerne føres under sterile forhold til dyrkningskamre, som kan rumme fra få mikroliter til flere liter. Disse kamre placeres normalt i skabe, hvor luftsammensætningen af gasser svarer til den, som findes i legemets væv, og hvor temperaturen er på 37 C, som svarer til den normale legemstemperatur for mennesket.



## Praktisk anvendelse:

Ved brug af celledyrkning kan man blandt andet studere cellerkernens DNA's funktion samt cellens proteinsyntese, cellens stofskifte, cellens reaktion på medicin, kemiske stoffer og infektioner samt funktionen af organellerne. Dog forandres mange celler under dyrkningen, de mister blandt andet deres oprindelige karakteristika.

En anden ting der er afhængig af celledyrkninger er fabrikation af vacciner og udvikling af medicin mod cancer.

## Fordele og ulemper:

Fordele ved celledyrkning, er udviklingen af medicin til cancer og fabrikation af vacciner.

# Sterilteknik

## Beskrivelse

Sterilteknik anvendes til at sikre sig at fx celledyrkning kan virke optimalt ved at begrænse bakterier som kan have negativ indflydelse på cellernes grokultur. Dette opnås ved at være omhyggelig med renlighed af midlerne, der tages i brug. Dette opnås ved forskellige redskaber og grundig rengøring før og igennem forsøget.

## Princip

Sterilteknik er et område inde for laboratoriet hvor man arbejder med forskellige metoder til at holde værktøj rene fra bakterier og andre ting som kan have en negativ indflydelse på forsøgene og kontaminere prøver. Der er forskellige sterilteknikker hvor nogle af de mere populære er autoklavering, afspritning og flampering. Sterilteknik er der også en del *regler* som skal følges til at beholde arbejdspladsen, hvor forsøget laves, steril, som begrænser kontaminering.

## Anvendelses område

Sterileknik bliver brugt i laboratoriet i fx dyrkning af mikroorganismer hvor de dyrkes i renkultur. Hvis sterilteknikkerne ikke overholdes kan det kontaminere bakterierne og gærcellerne, som vil ødelægge prøverne.

## Udstyr og materialer

Et typisk udstyr der bliver brugt i sterilisering er en autoklave. En autoklave er en trykkoger der koger værktøj eller materialer med damp ved 121°C i ca. 20 minutter ved 2 bar tryk. Denne steriliserings metode bliver brugt meget til forskellige glas genstande, som kolber, måleglas og reagensglas, det bliver også brugt til fx sterilisering når man laver agar til agarplader.

Der bruges også ofte Ethanol (sprit) til at sterilisere. Ethanol har den fordel at det har 2 steriliserende egenskaber. Den første er at ethanol er celledræbende. Ethanol er fedtopløsende, som derfor gør at det kan ødelægge cellemembranen da phospholiderne er fedtstoffer, som sammen med nogle proteiner holder cellemembranen sammen. Det er så ethanol som går ind og opløser phospholiderne som gør at cellemembranen bliver ødelagt, og der ikke længere er noget til at holde cellens indhold inde, som derved dræber cellen. Den anden del af ethanol er at den kan bruges til flambering som også steriliserer. Det bruges fx ved brug af pudenåle og drigalskispatter, som ved afbrændingen af ethanol, steriliserer værktøjet.

Et andet steriliserende redskab er en sterilbænk, som virker ved hjælp af UV-lys til at dræbe bakterier, ved ens arbejdsplads. Disse bakterier kan være i luften, og derved selvom man har været helt grundig med at sterilisere sine forskellige redskaber, kan bakterierne, samt svampesporer lande på redskaberne og de kan igen hurtigt være kontamineret. En sterilbænk er ikke nødvendig, der kan også bruges en bunsenbrænder som også kan hjælpe til at holde luften steril.

## Praktisk anvendelse

Den praktiske anvendelse for sterilteknik, er at man tager forbehold for at beholde ens arbejdsplads steril, det er fx at desinficere det underlag man arbejder under, have en sterilbænk eller bunsenbrænder siddende ved der hvor man arbejder for at holde luften steril, ordentligt håndtering af affald samt ikke at genbruge pipetter til 2 forskellige stadier, og at være sikker på at ens værktøj er sterilt inden man bruger det.

Sterilteknik bruges ofte inde for lægevidenskaben, da her er det vigtigt at patienter ikke får bakterier overført når de fx skal stikkes med en nål, eller skal under kniven. Det bruges ofte inde for fremstilling af medicin, da det kan have katastrofale konsekvenser hvis medicin bliver kontamineret. Det bruges generelt inde for alt når man skal undgå bakterier, det kan også ses ved noget så simpelt som ved en sandwich bar,

hvor servicerne bruger enten sprit eller handsker, til at undgå at bakterier kan sætte sig i maden og gøre kunderne syge.

## Fordele og ulemper

Fordelene ved sterilisering, siger egentlig meget sig selv, ved at man har en sterilt arbejdsplads sikrer man sig at ens forsøg, eller andet, ikke bliver kontamineret.

Der er dog forskellige fordele og ulemper ved de forskellige redskaber der bruges til at sterilisere værktøjet.

Ved autoklave sterilisering bruger man autoklave-tape som skifter farve, når den har nået været ude for den ønskede temperatur i lang nok tid. Dette er en fordel over for den mere simple metode som ethanol sterilisering. Her har man ingen tape til at fortælle om det er blevet steriliseret ordentligt. Ethanol er en mere simpel måde at sterilisere, hvor autoklave er mere teknisk, men samtidig mere præcist.

Links:

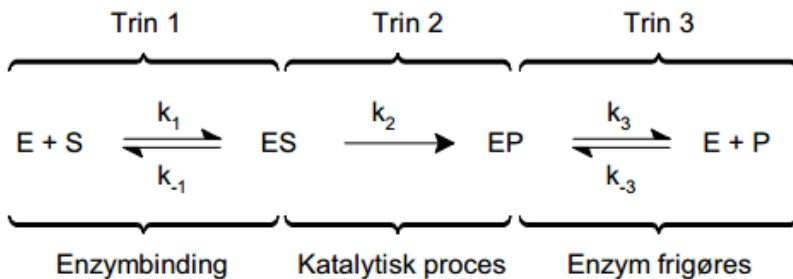
[http://www.easy-lab.dk/steril\\_teknik.htm](http://www.easy-lab.dk/steril_teknik.htm)

<https://www.youtube.com/watch?v=CgP1fXxOAJ8>

# 13. Enzymkinetik

I princippet er enzymkinetik en undersøgelse af hastigheden af enzymkatalyserende reaktioner.

Enzymkatalyserede reaktioner kan beskrives med en matematisk model (Michaelis-Menten modellen) der er delt op i 3 trin:



**E**= er enzymet som er en biologisk katalysator der er i stand til at øge hastigheden på de metaboliske reaktioner. Indgår (som alle andre katalysatorer) i reaktionen og tilbyder en alternativ reaktionsmekanisme dog med en lavere aktiveringsenergi, hvilket gør at flere af de reagerende molekyler (substratet) vil besidde den rette kinetiske energi, og reaktionen dermed vil forløbe hurtigere.

**S**= er de reagerende molekyler som skal bindes til enzymet for at blive omdannet til et produkt. Kaldes for et substrat.

**P**= er produktet, som er det omdannede substrat.

**ES** = er enzym-substratkomplekset som bliver dannet ved første trin af processen.

**EP** = er enzym-produktkomplekset, altså enzymet og produktet sammen.

I modellen beskriver  $K$  hvor hurtigt hvert trin i processen forløber:

$K_1$ = Fortæller hvor hurtigt  $[E]$  og  $[S]$  bindes og danner et enzym-substratkompleks.

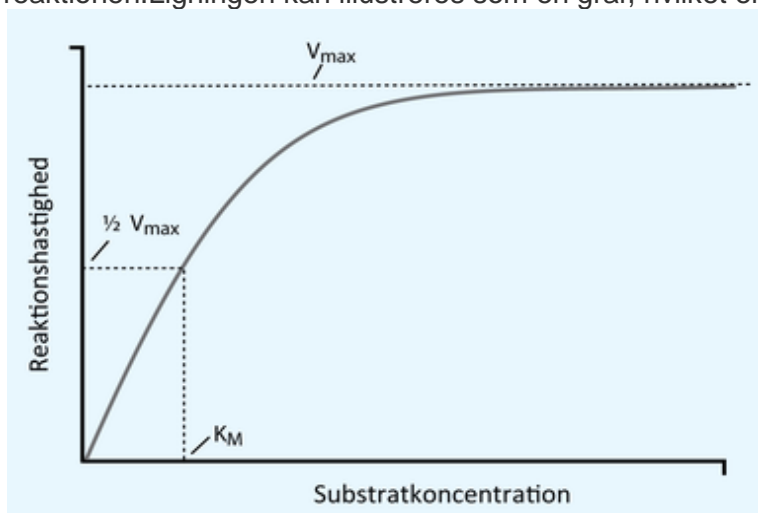
$K_{-1}$ = fortæller om den omvendte proces af  $K_1$ . Her dissocierer E og S sig fra hinanden i stedet.

$K_2$ = Fortæller hvor hurtigt ES-komplekset bliver omdannet til et EP-kompleks

$K_3$ = Fortæller hvor hurtigt  $[E]$  og  $[P]$  er om at frigøre sig fra hinanden.

$K_{-3}$ = fortæller om den omvendte proces af  $K_3$ . Her går E og P fra at være dissocierede til at være et EP-kompleks.

Man kan ud fra Michaelis-Menten modellen og en formodning om at koncentrationen af ES-komplekset er konstant, opstille en matematisk ligning der beskriver hastigheden af reaktionen og hvorledes den afhænger af koncentrationerne af substrat og enzym samt af hastighedskonstanterne i de forskellige trin i reaktionen: Ligningen kan illustreres som en graf, hvilket er set nedenfor:



$$v_0 = V_{\max} \cdot \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

Grafen der er reaktionshastigheden som funktion af substratkoncentrationen, viser at hastigheden vokser proportionalt med substratkoncentrationen.

$V_{max}$  kaldes den maksimale hastighed som reaktionen kan forløbe på, hvilket opnås når alle enzymerne er mættede da de har bundet sig til substraterne. Dette ses i grafen foroven da linien flader ud når den når stregen  $V_{max}$ .

### Betydningen af $K_M$ og $V_{max}$

$K_M$  har enheden mol/L = M. Den ligger typisk mellem  $10^{-1}$  og  $10^{-7}$  M. Den afhænger af flere forskellige faktorer som f.eks. temperatur og pH.

$K_M$  benyttes som et mål for, hvor høj substratkoncentrationen skal være, da  $K_M$  er den koncentration af substratet, hvor halvdelen af enzymernes aktive centre er fyldte, og reaktionshastigheden er halvdelen af  $V_{max}$ .

Michaelis-Menten konstanten  $K_M$  er givet ved:

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

Ved lav substratkoncentration, dvs., når  $[S] \ll K_M$ , vil hastigheden af reaktionen være proportional med substratkoncentrationen:

$$v_0 = \frac{V_{\max}}{K_M} \cdot [S]$$

Når substratkoncentrationen bliver meget højere en  $K_M$  ( $[S] \gg K_M$ ) fås:

$$v_0 = V_{\max}$$

I denne situation er reaktionshastigheden således uafhængig af koncentrationen af substrat. I det specielle tilfælde, hvor substratkoncentrationen er lig Michaelis-Menten konstanten ( $[S] = K_M$ ) fås:

$$v_0 = \frac{1}{2} \cdot V_{\max}$$

### Anvendelsesområde/praktisk anvendelse

Man kan bruge enzymkinetik, hvis man vil lave udregninger, hvor der er enzymer involveret.

Enzymkinetik har ingen egentlig praktisk anvendelse.

Fik du ikke nok af enzymer og enzymkinetik, kan du her se mere:

<https://www.youtube.com/watch?v=pLtTXIXcYgk>

<http://www.biotechacademy.dk/Undervisningsprojekter/Gymnasiale-projekter/enzymer/teori/enzymer/enzymkinetik>

# Reaktionskinetik

---

Gruppemedlemmer: Aialina Hezwani 1.t, Astrid Lund 2.t, Alexander Nøhr 3.t

## Reaktionshastighed

---

Reaktionskinetik er et udtryk for kemiske reaktioner og de faktorer, der har indflydelse på reaktionshastigheden for en reaktion.

Reaktionshastigheden er udtryk for, hvor hurtigt en reaktion forløber, altså, hvor hurtigt reaktanterne omdannes til produkter. Man kan følge forløbet af en reaktion ved at måle koncentrationen af en (flere) af reaktions deltagerne som funktion af tiden. Hertil kommer der en graf med enheden M/s, hvor der ses, at den er stejlest i starten. Dette skyldes, at reaktanterne omdannes til produkter og koncentrationen heraf falder. Herved vil hastigheden falde, da der ikke er ligeså stor koncentration af reaktanterne som der er til at starte med. Hvis man vil finde reaktionshastigheden til en bestemt tid kan man indtegne en tangent til et bestemt punkt på grafen for at beregne hastigheden til det pågældende tidspunkt.

Reaktionshastigheden regnes altid for at være positiv. Kun ved hjælp af et eksperiment kan man finde reaktionshastigheden for reaktionen.

## Hastighedsudtrykket

Det er et udtryk for, hvor hurtigt en reaktion foregår. Udtrykket kan kun bestemmes eksperimentelt, hvor man vil se på, hvad der sker når man ændre på koncentrationerne af de forskellige stoffer. Hvis man har en fordobling af reaktant [A] og der sker fordobling af reaktionshastigheden er der tale om en førsteordensreaktion, hvis der sker en firedobling af reaktionshastigheden kan man herudfra konkludere, at der er tale om en andenordensreaktion. Hvis der således ikke sker nogen forandring i reaktionshastigheden er der tale om en nulteordensreaktion. Derfor kan man opskrive hastighedsudtrykket på følgende  $v = k \cdot [A]^n \cdot [B]^m$ , k er hastighedskonstanten og er temperaturafhængig.

## Reaktionsorden

Reaktionsordenen angives ved, hvilken eksponent det pågældende stof er opløftet til i hastighedsudtrykket.

Hvis reaktionen er af første orden er potensen 1,  $v = k \cdot [A]^1$   
Når man afbilder grafen, tiden som funktion af  $\ln[A]$ , fremkommer der en ret linje med hældningskoefficienten  $-k$ . Formlerne kan ses på billede 1.

**Hastighedsudtryk:** 
$$-\frac{d[A]}{dt} = k \cdot [A]$$

**Lineær form:** 
$$\ln[A] = -k \cdot t + \ln[A]_0$$

**Halveringstid:** 
$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$$

Formler 1 her kan man se hvordan man regner hastighedsudtrykket, den lineær form og halveringstiden, af anden orden.

Hvis reaktionen er af andenorden er potensen 2,  $v = k \cdot [A]^2$

Når man afbilder grafen, tiden som funktion af  $1/[A]$  fremkommer der en ret linje med hældningskoefficienten  $k$ .

### REAKTIONER AF ANDEN ORDEN

Hastighedsudtryk:  $-\frac{d[A]}{dt} = k \cdot [A]^2$

Lineær form:  $\frac{1}{[A]} = k \cdot t + \frac{1}{[A]_0}$

Halveringstid:  $t_{1/2} = \frac{1}{k \cdot [A]_0}$

Formler 2 her kan man se hvordan man regner hastighedsudtrykket, den lineære form og halveringstiden, af anden orden.

Hvis reaktionen er af nulteordens er potensen 0,  $v = k \cdot [A]^0$

Når man afbilder grafen, tiden som funktion af  $[A]$  fremkommer der en ret linje med hældningskoefficienten  $-k$ .

### REAKTIONER AF NULTE ORDEN

Hastighedsudtryk:  $-\frac{d[A]}{dt} = k$

Lineær form:  $[A] = [A]_0 - k \cdot t$

Halveringstid:  $t_{1/2} = \frac{[A]_0}{2 \cdot k}$

Formler 3, her kan man se hvordan man regner hastighedsudtrykket, den lineære form og halveringstiden, af nulte orden.

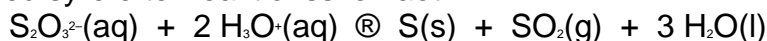
Ved en nulteordens reaktion har det pågældende stof ikke nogen påvirkning på reaktionshastigheden. Dette ses også, når noget er opløftet i nul giver det en. Hermed er der kun  $k$  tilbage.

Den samlede reaktionsorden er af  $n+m$ 'te orden. Man lægger potenserne sammen. Halveringstiden er et udtryk for, den tid det tager for et stof til det er blevet halveret.

### Anvendelse i praksis

Man kan anvende metoden under forsøg som fx Reaktionen mellem thiosulfat og syre.

Thiosulfat reagerer med syre efter reaktionsskemaet



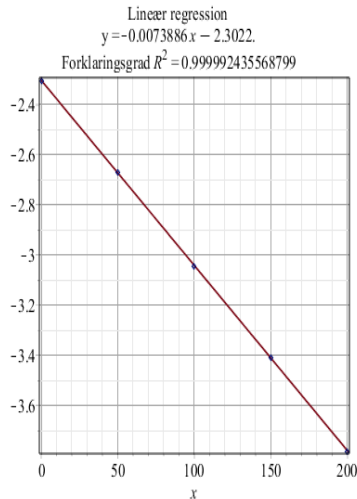
Reaktionshastigheden skrives så som  $v = k \cdot [\text{S}_2\text{O}_3^{2-}]^x \cdot [\text{H}_3\text{O}^+]^y$

Hvor  $v$  er reaktionshastigheden,  $k$  er hastighedskonstanten,  $x$  angiver reaktionsordenen med hensyn til thiosulfat og  $y$  angiver reaktionsordenen med hensyn til oxonium. Den totale reaktionsorden er  $x + y$ .

Metoden bruges til at bestemme hvilken orden reaktionen er af, og bestemme hvor hurtigt den forløber.

Laver en lineærregression,  $\ln[B_{r_2}]$ , som funktion af tiden

$$A := \begin{bmatrix} 0 & 50 & 100 & 150 & 200 \\ \ln(0.100) & \ln(0.0692) & \ln(0.0477) & \ln(0.0331) & \ln(0.0228) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0 & 50 & 100 & 150 & 200 \\ -2.302585093 & -2.670754416 & -3.042823881 & -3.408221997 & -3.780994743 \end{bmatrix}$$



Graf 1 på billedet ses en lineærregression til  $\ln[B_{r_2}]$  som funktion af tiden

Hvorfra vi får en ret linje med hældningen  $-k$ , så ed vi at  $k$  er af første orden i forhold til dibrom. Udover ses det at forklaringsgraden er næsten 1.

Vi ser, at der fremkommer en ret linje med hældningen  $-k$ , så ved vi at reaktionen er af første orden i forhold til dibrom. Udover kan vi se at forklaringsgraden er på næsten 1.

## Reaktionsorden - en oversigt

Variation i orden:	Nulte orden	Første orden	Anden orden
Hastighedsudtryk	$v = k$	$v = k \cdot [A]$	$v = k \cdot [A]^2$
Enhed for $k$	$M \cdot s^{-1}$	$s^{-1}$	$M^{-1} \cdot s^{-1}$
Funktionsudtryk	$[A]_t = [A]_0 - k \cdot t$	$[A]_t = [A]_0 \cdot e^{-k \cdot t}$	$[A]_t^{-1} = [A]_0^{-1} + k \cdot t$
Lineær funktion	$[A]_t = -k \cdot t + [A]_0$ $y = (-a) \cdot x + b$	$\ln[A]_t = -k \cdot t + \ln[A]_0$ $y = (-a) \cdot x + b$	$[A]_t^{-1} = k \cdot t + [A]_0^{-1}$ $y = (a) \cdot x + b$
Grafisk lineært plot (skæring vist ved $[A]_0$ )			
Hastighedskonstant $k$	(minus) hældning	(minus) hældning	(plus) hældning
Halveringstid $T_{1/2}$			

Kilder:

- <https://www.youtube.com/watch?v=6tgBEdDwtuo>
- [http://denstoredanske.dk/lt\\_teknik\\_og\\_naturvidenskab/Kemi/Fysisk kemi og fysisk elektrokemi/reaktionskinetik](http://denstoredanske.dk/lt_teknik_og_naturvidenskab/Kemi/Fysisk_kemi_og_fysisk_elektrokemi/reaktionskinetik)
- Basiskemi B bogen.
- <http://homepage.svendborg-gym.dk/rk/kemi/formelsamling/formelsamling%20reaktionshastighed.htm>



# Separationsmetoder

## Beskrivelse

I naturen findes der forskellige naturlige blandinger af forskellige stoffer. Blandinger betyder, at stoffer

Når vi udvikler ting såsom drikkevand, medicin eller papir er det nødvendigt at separere nogle af disse blandinger, da det ikke er alle stoffer, som skal bruges - nogle stoffer kan sågar være giftige for mennesker. Til at adskille disse stoffer fra hinanden benytter man separationsmetoder.

Der findes flere forskellige metoder at separere stoffer. Separationer kan foretages i alle former som flydende, fast gasform.

**Fordampning** kan være en blanding af gasser, hvor der vil adskillelse af komponenterne. De komponenter med kogepunkt vil kondensere ud, hvor imod den komponenter laveste kogepunkt vil være ringere og dermed vil der ske en adskillelse.

**Destillation** kan benyttes, når man har en opløsning - i en fordampning. Problemet er her, at man vil undersøge bruge det stof, der ellers fordamper. Her opvarmer man blandingen i en beholder indtil et af stofferne fordamper. Det fordampede stof føres igennem en kolonne hen til en anden hvor det afkøles og fortættes.

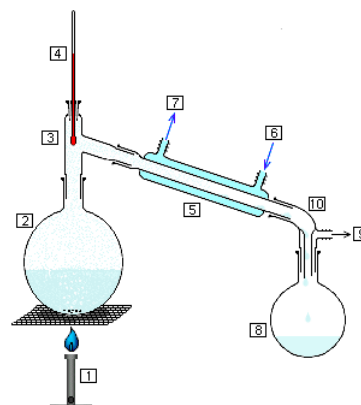
**Magnetisme** kan bruges til at adskille stoffer fra hinanden, hvis et stofferne er magnetisk. Man bruger her en magnet til at aflede de magnetiske stoffer og på den måde adskille dem fra de andre. Man benytter ofte en elektromagnet til dette.

**Dekantering** bruges når man har en væske med bundfald. Her hælder væsken ud og beholder bundfaldet. På den måde har man adskilt fast form fra en væske.

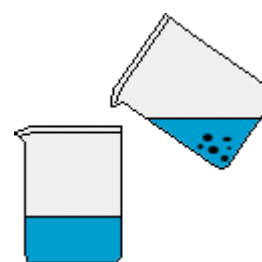
**Filtrering** kan bruges, hvis bundfaldet i en blanding er for småt til, dekantering kan benyttes. Her hælder man blandingen igennem et f.eks. en tragt med et filterpapir i.

**Centrifugering** udføres ved, at en blanding sættes i en centrifuge slynges rundt med en stor kraft. På den måde kan man f.eks. plasma fra røde blodlegemer i en blodprøve.

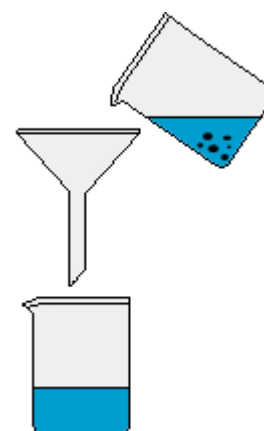
En **skilletragt** kan bruges til at adskille to ublandbare væsker (olie og vand) fra hinanden. Skilletragten er formet som en tragt halvkugle i bunden. Man lukke den i begge ender - i bunden er der



Figur 2 Destillation



Figur 3 Dekantering



Figur 4 Filtrering

og  
ske en  
højeste  
med  
ligesom  
eller

beholder,  
af  
stoffer.

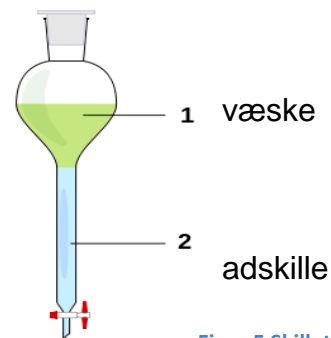
man  
et stof på  
at  
filter,  
og  
adskille

(f.eks.  
med en  
en hane

og toppen lukker man typisk med en prop. Man lader de to væsker stå i skilletragten i et stykke tid, og den tungeste væske vil lægge sig i bunden. Herefter kan man blot åbne for hanen i bunden og hælde den tunge ud.

### Princip

Når man benytter separationsmetoder, er det fordi, man ønsker at to eller flere stoffer af enten samme eller forskellig tilstandsform.



Figur 5 Skilletragt

### Anvendelsesområde

Separationsmetoder benyttes alle steder, hvor det er nødvendigt, at adskille f.eks. et fast stof fra en væske eller to væsker fra hinanden.

### Udstyr og materiale

- Centrifuge
- Skilletragt
- Filter
- (Elektro)magnet
- Kolonne + beholdere

### Praktisk anvendelse

**Fremstilling af vin** ved en opvarmning af en væske/vin, indtil at den flydende del koger. Dampen ledes væk, og derved fjernes væsken den oprindelige blanding. Denne metode anvendes til at koncentrere alkohol til vin.

**Separation i råolie** først vil man rense olien, derefter opvarmes olien og sætter molekylerne i bevægelse. ved opvarmning vil det fast stof smelte og derefter fordampe. Dampen vil ledes over i et 40 højt destillations tårn. Den tungeste råolie vil samles i bunden af tårnet. Oliedampene stiger op til verjs i tårnet og vil blive afkølet. Når dampen afkøles til under kogepunktet, vil den begynde at kondensere. det betyder den igen vil blive til en væske og vil blive opsamlet.

De letteste kulbrinter vil fortsætte op til toppen af tårnet, mens de lidt tungere kulbrinter vil fortættes. De letteste kulbrinter vil blive anvendt til gasart, som raffinaderigas.

### Fordele og ulemper

#### Destillation

Fordele: Du kan undersøge det stof, der fordampes i modsætning til hvis blot du laver en fordampning.

Ulemper: Hvis de to væsker man undersøger, har et kogepunkt, som ligger tæt på hinanden bliver destillationen ikke ren, og man bliver nødt til at gentage destillationen flere gange.

#### Fordampning

Fordele: Man er sikker på at få alle faste stoffer med, i kontrast til filtrering.

Ulemper: Man kan kun undersøge det stof, der ikke fordampes.

## Filtrering

Fordele: Man kan filtrere mindre faste stoffer, end hvis man benytter dekantering.

Ulemper: Nogle meget små faste stoffer, som f.eks. salte kan godt slippe igennem filtreringen.

## Centrifugering

Fordele: Man kan hurtigt adskille stoffer fra hinanden, og nemt kunne undersøge dem bagefter.

Ulemper: Hvis ikke man er sikker på, hvor meget kraft centrifugeringen skal have, kan det enten ende med, at man ikke opnår den ønskede virkning eller, at man kommer til at ødelægge sin prøve.

## Dekantering

Fordele: Det er en meget nem, hurtig og overskuelig måde at adskille bundfald fra en væske.

Ulemper: Det kan være svært at være sikker på, at man ikke også adskiller noget af bundfaldet eller, at man får adskilt al vandet.

### Evt. animationer, videoer

Video af magnetisk separation: [https://www.youtube.com/watch?v=NGp671m1\\_A](https://www.youtube.com/watch?v=NGp671m1_A)

Video af destillation: <https://www.youtube.com/watch?v=s35ng4Azqrl>

### Kilder / links

Separationsmetoder. Udgivet af Naturvetenskap.

Internetadresse: <http://www.naturvetenskap.org/kemi/hogstadietekemi/blandningar/separationsmetoder/> - Besøgt d. 13.01.2016 (Internet)

Fra råolie til færdige produkter. Udgivet af eof.

Internetadresse: <http://www.eof.dk/Viden/Temaer/Raffinaderier/Artikler/Fra%20olie%20til%20produkter> - Besøgt d. 13.01.2016 (Internet)

Destillation. Udgivet af Wikipedia. Internetadresse: <https://da.wikipedia.org/wiki/Destillation> - Besøgt d. 13.01.2016 (Internet)

Separatory funnel. Udgivet af Wikipedia.

Internetadresse: [https://en.wikipedia.org/wiki/Separatory\\_funnel](https://en.wikipedia.org/wiki/Separatory_funnel) - Besøgt d. 13.01.2016 (Internet)

filtrering. Udgivet af Gyldendal - den store danske.

Internetadresse: [http://www.denstoredanske.dk/It,\\_teknik\\_og\\_naturvidenskab/Kemi/Kemisk\\_laboratorie-og\\_fabriksterminologi/filtrering](http://www.denstoredanske.dk/It,_teknik_og_naturvidenskab/Kemi/Kemisk_laboratorie-og_fabriksterminologi/filtrering) - Besøgt d. 13.01.2016 (Internet)

# Spektrofotometri

---

## Princip:

Spektrofotometri er en ikke-destruktiv analysemetode, hvor koncentrationen af et bestemt stof kan undersøges. Ved en spektrofotometrisk undersøgelse sendes monokromatisk lys gennem en kuvette med en prøve af det stof, man ønsker at bestemme koncentrationen af, opløst i et opløsningsmiddel med kendt koncentration. Stoffet vil absorbere en del af lyset. Absorbansen svarer til det lys, der er absorberet, nærmere bestemt ved Lambert-Beers lov, som vil blive beskrevet senere.

## Beskrivelse af metode:

Et spektrofotometer er opbygget af forskellige komponenter, som vist i *bilag 1*. Et typisk spektrofotometer består af to lamper, hvoraf den ene udsender elektromagnetisk stråling med bølglængder i hele det synlige spektrum, se evt. *bilag 2*. Blandingen af alle bølglængderne ses normalt som hvidt lys. Den anden lampe udsender ultraviolet lys, eller UV-lys. Dette er også elektromagnetisk stråling, disse bølglængder ligger blot uden for det synlige spektrum og vil typisk have bølglængder mellem 320nm og 200nm. Disse to lamper er monteret i et "spejlrum" således, at det er muligt at vælge hvilke af de to lystyper man ønsker at gennemlyse sit stof med.

For at kunne undersøge arbitrære stoffers absorbans ved forskellige bølglængder skal der kunne varieres på flere faktorer end blot UV- og normalt lys. Når en af disse er valgt, sendes lyset via et spejl videre til en prisme, der splitter lyset op i de forskellige bølglængder, hvilket kan forklares ved brydningsloven for lys i et givent materiale. Prismen bevæges nu sådan, at det kun er en enkelt bølglængde, der rammer revnen, som fører hen til prøven. På denne måde belyses prøven kun med én bestemt bølglængde af gangen, dette kaldes monokromatisk lys.

Forskellige stoffer absorberer forskellige bølglængder alt efter, hvilken energitilstand stoffets elektroner er i. Det er elektronernes energitilstand, der giver anledning til absorptioner af forskellige bølglængder. Elektronerne absorberer nemlig kun bølglængder med den samme energi, som den givne energitilstand, elektronerne er i. Et eksempel er klorofyl.

Græsset er grønt, fordi det indeholder klorofyl-a og klorofyl-b, hvis elektroner har energitilstande, der tillader absorption af henholdsvis rødt og blå lys, mens den grønne komponent af det hvide lys bliver kastet tilbage uden at blive absorberet. Klorofyl absorberer altså rødt og blå lys, da disse er komplementærfarver til stoffets egentlige farve, grøn. Dette er også forklaringen på, hvorfor klorofyl giver planten den grønne farve. Når solens lys rammer planten absorberes det røde og blå element af lyset, og kun det grønne element i lyset reflekteres.

Som nævnt tidligere er det muligt at bestemme koncentrationen af et givent stof ud fra absorbansen, der måles i den spektrofotometriske undersøgelse. Denne sammenhæng er beskrevet ved Lambert-Beers lov:

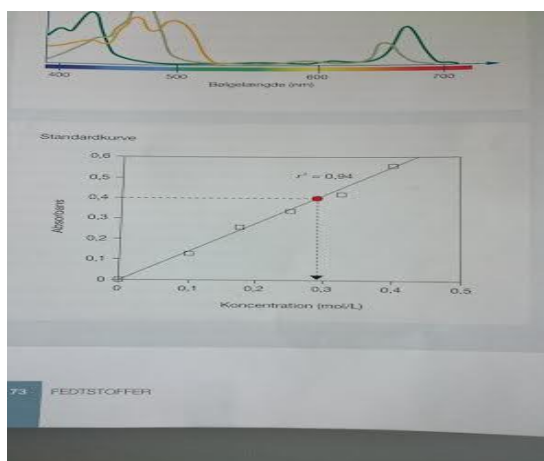
$$A_{stof} = \epsilon_{\lambda} \cdot l \cdot C_{stof}$$

Her er 'A' absorbansen af det givne stof, der undersøges, ekstinktionskoefficienten for den givne bølglængde,  $l$  er den distance, som lyset bevæger sig fra lyskilden til detektoren, og  $C$  er koncentrationen af det givne stof.

Dette gør det muligt at bestemme koncentrationen af det givne stof i opløsningen ved at isolere koncentrationen. Dette giver følgende formel udledt af Lambert-Beers lov:

$$C = \frac{A}{\epsilon_{\lambda} \cdot l}$$

Koncentrationen kan dog også bestemmes ud fra en standardkurve, der er lavet i forvejen. Her kan koncentrationen for et bestemt stof aflæses ud fra absorbansen. Standardkurven laves ved at undersøge absorbansen for det stof, der ønskes undersøgt, i dette tilfælde måler man dog kun prøver med kendt koncentration ved en specifik bølgelængde, der absorberes af det stof, der undersøges. Dette gør det muligt, at lave en kurve, der udtrykker koncentrationen som funktion af absorbansen eller omvendt. Følgende eksempel er med et ukendt stof:



Standardkurven viser her sammenhængen mellem absorbans og koncentration for et givent stof. Standardkurven er lavet ved at måle absorbansen ved 450nm på følgende kendte koncentrationer: 0.1 mol/L, 0.18 mol/L, 0.25 mol/L, 0.33 mol/L og 0.4 mol/L.

Før spektrofotometret kan benyttes, er det nødvendigt at nulstille det. Dette kan gøres ved at fylde sprit i cuvetten, da det er en helt neutral væske med en absorbans utroligt tæt på 0. Dog er der stadig en lille absorbans i glasset. Denne indstiller man spektrofotometret efter, så den ved hver måling undlader at medregne den.

### **Materialer:**

- Prøveekstrakt
- Spektrofotometer
- Cuvetter

### **Fremgangsmåde:**

1. Udvalg to rene cuvetter.
2. Fyld sprit i den ene, den bruges til at nulstille spektrofotometret. Det er nok at én gruppe nulstiller spektrofotometret.
3. Fyld prøveekstrakt i den anden.
4. Følg instruktionerne og mål prøvens absorbtionsspektrum. Hvis absorbansen er over 1,000 fortyndes prøven før måling.
5. Notér absorbansen for de forskellige stoffer til senere brug.

### **Praktisk anvendelse:**

#### ***Jernindhold i fødevarer:***

Spektrofotometri bliver i praksis også brugt til at måle jernindhold i fødevarer. For at få jern-ionerne ud af fødevarer skal fødevarer brændes, hvorefter opløser man asken i saltsyre. For at sikre at alt

jern findes som jern(III)-ioner, tilsættes en opløsning af  $\text{MnO}_4^-$  der kan oxidere jern(II)-ionerne til jern(III)-ioner. Herefter smides stoffet i en cuvette, hvorefter et spektrofotometer måler absorbansen i jernindholdet. Udefra absorbansen kan jernindholdet i fødevaren beregnes.

#### ***Identifikation af et farvestof i en jordprøve:***

Identifikation af et farvestof eller et andet stof med en karakteristisk lysabsorption kunne foregå ved at en jordprøve ekstraheres med et flygtigt organisk opløsningsmiddel. Herefter gennemføres en spektrofotometrisk analyse evt. efter en inddampning og yderligere oprensning af ekstraktet.

#### ***Identifikation af et farvestof i sodavand:***

Med et spektrofotometer er det muligt at optage et absorptionsspektrum af sodavand indeholdende et syntetisk farvestof. Hvis farvestoffet er til rådighed, er det ligeledes muligt at fremstille en standardkurve og ved hjælp af den kan man bestemme indholdet af farvestof i sodavand. Farvestoffernes farve afhænger dog af pH.

#### **Fordele og ulemper:**

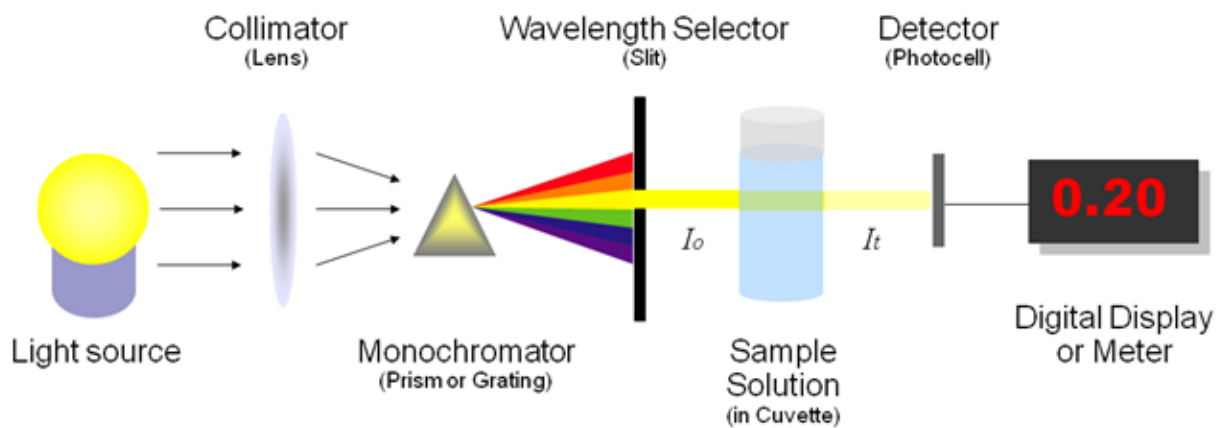
Fordele ved brug af spektrofotometri er at man blandt andet kan måle absorbansen i jernindhold, i en jordprøve og i sodavand. Dette giver en masse muligheder som for eksempel, i dette tilfælde, at kontrollere fødevarer og drikkevarer

samt jordbundens indhold af farvestoffer.

Enkeltstråle instrumenter har den ulempe, at der ikke er nogen konstant referencetråle, som det kan justere den visning i forhold til hvis lysstrømmen fra lampe er ikke helt stabil vil det medføre fejlagtige målinger.

# Bilag til spektrofotometrisk metode

## Bilag 1



## Bilag 2

farve	vakuumbølgelængde i nm	frekvens i THz
rød	625-740	480-405
orange	590-625	510-480
gul	565-590	530-510
grøn	520-565	580-530
cyan	500-520	600-580
blå	450-500	670-600
indigo	430-450	700-670
violet	380-430	790-700

### Links:

Video om introduktion til spektrofotometri:

[https://www.youtube.com/watch?v=qbCZbP6\\_j48](https://www.youtube.com/watch?v=qbCZbP6_j48)

Video om spektrofotometrets komponenter og deres funktion:

<https://www.youtube.com/watch?v=pxC6F7bK8CU>

# Gaschromatografi (GC)

## Introduktion til chromatografi - Gas

Kromatografi er en meget anvendt metode til at adskille og identificere forskellige stoffer i kemiske komplekser. Oprindeligt blev det brugt i botanikkens verden 1901 af botanikeren Mikhael S. Tvset, til at adskille farvestoffer fra planteekstrakter

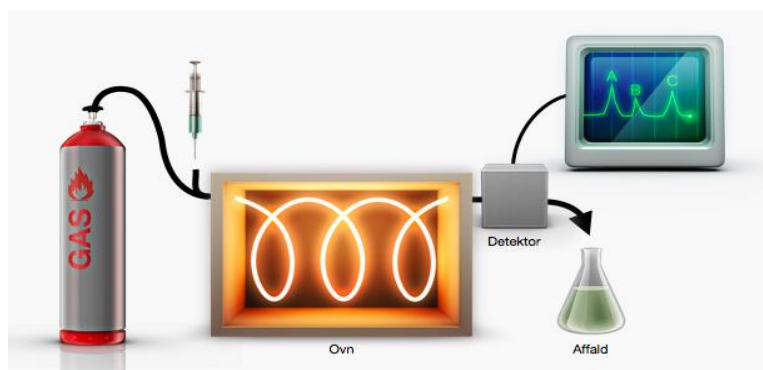
Ved gaskromatografi sker der en adskillelse af komponenter i en blanding af stoffer. Den mobile fase er en gas, bæregassen, og ikke en væske. Den stationære fase er derimod en væske med et meget højt kogepunkt. Væsken er opsugt i et fast stof.

Det overordnede princip for, hvordan GC fungerer er:

En lille mængde prøve opvarmes i GC-apparatet, så det går over på gasform. Herefter kommer det i kontakt med den mobile fase, som er en gas, som eksempelvis helium. Herefter bliver prøven presset hen i kolonnen, som indeholder den stationære fase. Her kommer gassen i kontakt med væsken, som har et meget højt kogepunkt. Kolonnen er placeret i en ovn for sig selv, således at temperaturen kan kontrolleres. Inde i kolonnen bevæger den mobile fase sig igennem den stationære fase, således at de enkelte komponenter i prøven separeres.

For enden af kolonnen er der placeret en detektor. Detektorens opgave er at observere molekylerne, der kommer ud af kolonnen. Når et stof observeres, kommer der et signal, som viser sig som en række signal-toppe, der opstår på bestemte tidspunkter. Ved hjælp af disse signaler, kan der ses, hvor lang tid der er gået, fra prøven blev injiceret til den blev detekteret. Tiden her bliver også kaldt retentionstiden.

## Hvordan er en gas chromatograf opbygget?



En gaschromatograf består af en gas beholder hvori der er en bæregas, fx helium. Dette er den mobile fase. Dernæst er der en ovn, hvori der er et rør, hvori den stationære fase eksisterer. Beholderen med gas, er forbundet til røret placeret inde i ovnen. Mellem gassen og ovnen, er tilsluttet en indgang hvori man kan indsætte en nål hvori man det materiale / stof man ønsker, identificere og adskille. Røret hvori gassen og det kemiske kompleks "vandrer" igennem er typisk et par meter langt, og de typisk brugte kaldes såkaldte kapillær-kolonner.



Hvoraf der findes to slags:

Wall-Coated open tubular (WCOT), og Support-Coated open tubular (SCOT). Forskellen på de to bygger på at i WCOT er indersiden af røret dækket til med den flydende stationære fase, hvorimod i SCOT der er indersiden belagt med et tyndt lag fast materiale som fx silica-gel, som også er anvendt i andre kromatografi metoder. Uden for ovnen, sidder en detektor som måler når stoffet er "vandret" igennem røret, som sender et signal til en computer og udskiller stoffet som "Affaldsprodukt/ restprodukt)

### Adskillelse af stoffer og Retentionstid samt eventuelle påvirkninger på denne

Når stoffet kommer ind i røret i ovnen, så vil materialet i kolonnen påvirke hvor længe det tager for stoffet at gennemgå gaschromatografen. Molekyler på fast form kan binde til hinanden og klistre sammen, men på flydende og gas form kan de kun binde sig kortvarigt. Når molekylerne "vandrer" igennem røret, så vil de binde sig forskelligt til materialet i kolonnen an på deres kemiske stoffer og struktur. Dette betyder også at de vil blive sænket i hastigheden i gennemløbet. De stoffer som har sværest ved at binde sig til det faste materiale vil altså komme ud først hvorimod det materiale, som let binder til det faste materiale kommer sidst ud. Et eksempel på brugen af en gaskromatograf kunne være til analyse af et stof vi ved indeholder flere alkoholer og vand. Vi ved at fx ethanol binder særligt godt til stoffer med en hydroxygruppe(OH gruppe). Derfor vælges et materiale med mange hydroxygrupper.

Da røret befinder sig i en ovn, hvor temperaturen er særligt høj, vil de ofte gå på gas tilstand, der sker altså en tilstandsændring fra liquid til gas. Grundet de kemiske kompleksers forskellighed mht struktur så vil de også have forskelligt kogepunkt. Hvis tilstandsformen ændres tidligt til gas, så kommer dette stof ud først.

Fx i snaps vil ethanolen, til trods for den lette binding med hydroxygrupper, komme ud først til grund for dets lavere kogepunkt end vand.

Retentionstiden fortæller os noget om, den tid der går fra stoffet bliver injiceret, til den bliver detekteret. Den korteste mulige tid noget stof kan komme gennem kolonnen på er 0,69 min. Efter de 0,69 min kommer der en lille top, hvilket skyldes det luft der bevidst er blevet injiceret sammen med prøven. Luften bliver ikke holdt tilbage af den stationære fase, hvilket er grunden til, at de 0,69 min er den korteste tid noget stof kan komme gennem kolonnen på. De 0,69 min er betegnet som  $t_D$ , hvilket betyder dødstiden.

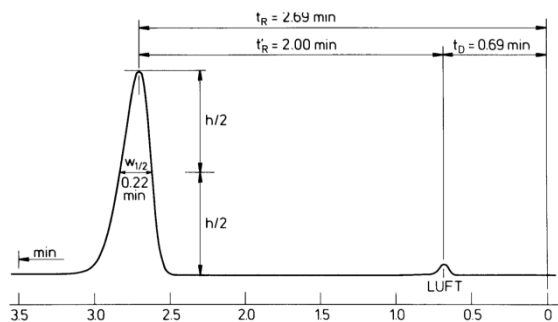
Efter 2,69 min kommer der en top, som svarer til det injicerede rene stof, altså  $t_R$ . Dette betegnes som retentionstiden.

Hvis den stationære fase ikke havde holdt tilbage det pågældende stof, så var det ligesom luften, kommet gennem kolonnen på 0,69 min. De ekstra 2,00 minutter har stoffet tilbragt opløst i den stationære fase og betegnes den justerede retentionstid, altså  $t'R$ :

$$t'R = t_R - t_D = (2,69 \text{ min} - 0,69 \text{ min}) = 2,00 \text{ minutter}$$

Retentionstiden er karakteristisk for et givet stof, og det benyttes til identifikation af et stof i en prøve. Derudover afhænger retentionstiden voldsomt af de betingelser, hvorunder kromatogrammet er optaget, således at to retentionstider kun kan sammenlignes når to kromatogrammer er målt under identiske betingelser.

Der er flere grunde til at stofferne kommer ud nogen tid efter man har isat prøven. Først og fremmest kan man kigge på længden af røret. Det er forskelligt fra røret er, og dermed kompleksers



forskellige grunde til at stofferne kommer ud nogen tid efter man har isat prøven. Først og fremmest kan man kigge på længden af røret. Det er forskelligt fra røret er, og dermed kompleksers

Man kan derudover også se på med hvilket tryk gassen presses ind og igennem røret. Desto højere tryk desto hurtigere vil det "vandre" igennem Gaschromatografen.

### koncentrationsberegninger ud fra datasæt

Efter man succesfuldt har udført en kromatografi af et stof, så kan man ud fra graferne beregne koncentrationerne af det ukendte stof, ved hjælp af en standardrække, som egentlig er en række prøver, hvori man i forvejen kender koncentrationerne. Et eksempel på dette kunne være at beregne koncentrationen af ethanol i en prøve. Her laves der en række prøver med en kendt ethanolkoncentration, fx 1,3,6 & 10 ethanol, hvorefter der køres kromatografi på disse. Der vil selvfølgelig dannes grafer ud fra disse, hvorefter man beregner arealet under de enkelte "signal-toppe". Derefter kan der laves en korrelation, beregning af sammenhæng mellem to sæt data. Dette kunne være en regression hvori forklaringsgraden selvfølgelig bør være så tæt på 1 som muligt. Efterfølgende regnes arealet for toppen af den ønskede analyserede prøve ved retentionstiden ud. Ved hjælp af korrelationsberegningen mellem koncentration og areal kan vi finde forholdet mellem ethanol i opløsningen, og dermed finde koncentrationen af ethanol.

### Fordele & ulemper

Fordele ved gaschromatografi er at modsat med liquid chromatography der kan der benyttes kemiske stoffer på gasform. Derudover så er det en utrolig præcis metode, i og med man får nogle utrolig gode datasæt.

Af ulemper findes dog også nogle, for at undersøge en blanding skal man kende egenskaberne for denne for at kunne indstille Gaschromatografen, denne indstilling omhandler, trykket(strømningshastigheden), ovnsens temperatur, styrken af signalet og kolonnens egenskaber, og med det menes der kolonnens materiale, som skal specificeres til at adskille de ønskede stoffer. Derudover så skal prøverne indsættes i præcist lige store mængder, hvor der anvendes en mikroliter-sprøjte. Denne er meget dyr og skrøbelig. Udover dette så skal man benytte stoffernes kogepunkt hvori de går på gasform dette medfører, at vi kun kan analysere stoffer med et relativt lavt kogepunkt, og må derfor udelade andre.

### Litteraturliste

<https://www.youtube.com/watch?v=v--1v2Retl0>

<http://kl5.ki.ku.dk/~smk/mbm/oeverlser/GC-TLC-2007.pdf>

<http://www.biotechacademy.dk/Undervisningsprojekter/Gymnasiale-projekter/Svampe/Teori/Kend-din-metabolit>

Gaschromatografi - en vigtig kemisk analysemetode

# Titration

---

Hvad er titration? Det er en analytisk metode til at bestemme en ukendt mængde/koncentration af et stof i en opløsning.

Titrationen baserer sig på en kemisk reaktion – som man kender, som forløber under titrationen. Det stof, man skal bestemme, kaldes titranden og findes i analyseopløsningen. Titratoren, er stoffet som bestemmelsen foretages med, findes i en anden opløsning – titrervæsken – med en kendt koncentration(titer). Analyseopløsningen sættes i omrøring og titrervæsken tilsættes langsomt fra en burette. Når reaktionen er forløbet til ende, siger man, at titrationens ækvivalenspunkt er nået. Hvis man kender den kemiske reaktion, titrervæskens titer og volumen af titrervæske, som er brugt til at opnå ækvivalenspunkt, kan koncentrationen af analyseopløsningen bestemmes.

Den kemiske reaktion kan opdeles i flere forskellige titrationer – syre-base-titration, fældningstitration, komplekstitioneringer og redox-titrationer. <sup>6</sup>

Syre-base-titration er den mest brugte titration metode. Hvis man har en ukendt syre, er det muligt at bestemme koncentrationen af den ved titration med en kendt base. Man tager et nøjagtigt volumen af syren, som hældes i en kolbe(Titranten). Over kolben tilsættes en burette med en kendt base koncentration(titratoren). Så dryppes titratoren ned i titranden. Dette gøres indtil ækvivalenspunktet indtræffer. Dvs. hvor alt syren har reageret med basen og en tilsat indikator skifter farve. Desuden kan man også bestemme ækvivalenspunktet ved at måle pH gennem titrationen, da et stort spring i pH indikerer, at punktet er nået. Metoden, hvor pH bruges hedder potentiometrisk titration, mens indikator-metoden kaldes kolorimetrisk titration.

Eksempel på syre-base-titration mellem saltsyre og natriumhydroxid.  $HCl(aq) + NaOH(aq) \rightarrow NaCl(aq) + H_2O(l)$ . Eller mere korrekt som  $H_3O^+(aq) + OH^-(aq) \rightarrow 2H_2O(l)$ .

Man kan se, at når titrationen begynder, findes der kun den stærke syre  $H_3O^+$ , men ved tilsætning af basen,  $OH^-$ , neutraliseres syren. Når ækvivalenspunktet er nået, er alt syren omsat. Opløsningen består så af natriumchlorid opløst i vand – pH på 7. <sup>7</sup>

Fældningstitration. Denne metode bruges til at bestemme mængden af ioner i en ukendt væske. Fx har man en væske med Cl-ioner, men ikke kender koncentrationen af Cl-ioner kan man bruge denne titration til bestemmelse af koncentrationen. Man gør på samme måde som ved syre-base-titration, men i stedet for base, bruger man  $AgNO_3$  (sølvnitrat), så i buretten har man sølvnitratet, som dryppes ned i analyseopløsningen. Når sølvnitratet dryppes ned i analyseopløsningen vil der dannes hvidt bundfald, som viser, at  $Ag^+$  og  $Cl^-$  ionerne er gået sammen, og danner  $AgCl$ (Sølvchlorid). Man kan se på indikatoren, når alt Cl er blevet opbrugt – den skifter farve. Så kan man nu beregne koncentrationen af Cl. <sup>8</sup>

---

<sup>6</sup> [http://denstoredanske.dk/It,\\_teknik\\_og\\_naturvidenskab/Kemi/Analytisk\\_kemi/titration](http://denstoredanske.dk/It,_teknik_og_naturvidenskab/Kemi/Analytisk_kemi/titration)

<sup>7</sup> Grundbog i Bioteknologi 2 – Kim Brunn, Pia Birgitte Geertsen og Karen Helmig – Gyldendal.

<sup>8</sup> [http://denstoredanske.dk/It%2c\\_teknik\\_og\\_naturvidenskab/Kemi/Analytisk\\_kemi/s%C3%B8lvnitratitration](http://denstoredanske.dk/It%2c_teknik_og_naturvidenskab/Kemi/Analytisk_kemi/s%C3%B8lvnitratitration)

Komplekstitrering er en titrering mellem en metalion og en ligand. I titreringen bestemmes mængden af metalion, ved brug af en væske indeholdende en kendt koncentration af ligand og foregår på samme måde som ovenstående.<sup>9</sup>

Redoxtitrering er en titrering baseret på en redoxproces. Bruges til kvantitativ bestemmelse af stoffer med redoxegenskaber.<sup>10</sup>

Hvordan bestemmer man så koncentrationen af fx Cl<sup>-</sup> ioner i opløsningen? – eksempel fra fældningstitrering.

Først finder man det ønsket volumen af den væske, som man vil finde koncentrationen af – fx 5 mL af væsken indeholdende Cl<sup>-</sup> ioner. Desuden har man fundet koncentrationen af AgNO<sub>3</sub> – 0.094M

Så drypper man AgNO<sub>3</sub> ned i analyseopløsningen indtil ækvivalenspunktet indtræffer. Så ser man hvor meget af AgNO<sub>3</sub>, man har brugt – fx 9.3 mL.

Så kan man lave følgende skema for udregning

Kemiske mængde beregning	Cl <sup>-</sup>	Ag <sup>+</sup>
n	$8.460 * 10^{-4} mol$	$8.460 * 10^{-4} mol$
C	0.1692M	0.094M
V	0.005L	0.0093L

$$n_{Ag} = 0.094M * 0.0093L = 8.460 * 10^{-4} mol$$

Da Ag<sup>+</sup> er ækvivalent til Cl<sup>-</sup>, er stofmængden den samme

Nu er det så muligt at bestemme koncentrationen af Cl<sup>-</sup> ioner i opløsningen på 5 mL.

$$C_{Cl} = \frac{8.460 * 10^{-4} mol}{0.005L} = 0.1692M$$

Derved er det muligt at bestemme en ukendt koncentration – hvis man kender volumen af opløsningerne og en kendt koncentration af titratoren.

### Anvendelsesområde:

Titrering er en metode der anvendes i laboratoriet. Titrering er den metode man bruger for at bestemme/mængdebestemme en kemisk forbindelse/et kemisk stof i en given prøve, inden for analytisk kemi.

Ved titrering bruger man en burette til at tilsætte titratoren, hvilket betyder, at volumen kan aflæses præcist på buretten. Formålet med titreringen er således, at titratoren skal reagere med prøven, også kaldt titranden, som man vil kende stofmængdekonzentrationen af, hvortil indikator anvendes. Det gør, at man kan vise et omslag/en ændring i prøven, således, at det kan påvises, at prøven har reageret med titratoren. Man kan dermed sige, at når den kemiske reaktion er forløbet til ende, er titreringens ækvæilentpunkt nået. Der findes flere måder at titrere på, men ved visuelle titreringer tilsættes en passende indikator eks. den førnævnte, der medfører et farveskift, når ækvivalenspunktet er nået. Dette kaldes (*kolorimetrisk titrering*). Kolorimetrisk titrering er når man ved iagttagelse af et farveskift bestemmer ækvivalenspunktet.

<sup>9</sup> [http://denstoredanske.dk/It%2c\\_teknik\\_og\\_naturvidenskab/Kemi/Analytisk\\_kemi/komplekstitrering](http://denstoredanske.dk/It%2c_teknik_og_naturvidenskab/Kemi/Analytisk_kemi/komplekstitrering)

<sup>10</sup> [http://denstoredanske.dk/It%2c\\_teknik\\_og\\_naturvidenskab/Kemi/Analytisk\\_kemi/redoxtitrering](http://denstoredanske.dk/It%2c_teknik_og_naturvidenskab/Kemi/Analytisk_kemi/redoxtitrering)

**Udstyr og materialer:**

En burette

En pipette

En konisk kolbe

Magnetomrører

Indikator

Puffer

**Praktisk anvendelse:**

Når farmaceuter skal opnå den ønskede sammenblanding af forskellige lægemidler, bruger de titrering til det. Læger bruger ligeledes ofte titrering, når de skal give medicin direkte i blodåren og de derfor skal have den rigtige forhold mellem forskellige lægemidler.

I fødevarerindustrien bruges titrering også til at finde ud af hvilke olier og fedtstoffer, det er. Saltindholdet i smør kan også findes vha. titrering. Inden vin- og ost produktionen er færdig, bruger man også titrering for at se, om produktet er klar til salg.<sup>11</sup>

**Fordele og ulemper:**

<i>Fordele</i>	<i>Ulemper</i>
Nemt at udføre	Det kan tage lang tid
Billigt	Ved at bruge en forkert indikator
Materialerne er lettilgængelige	
Præcis og fastlagt metode	
Mange forskellige stoffer kan bestemmes	

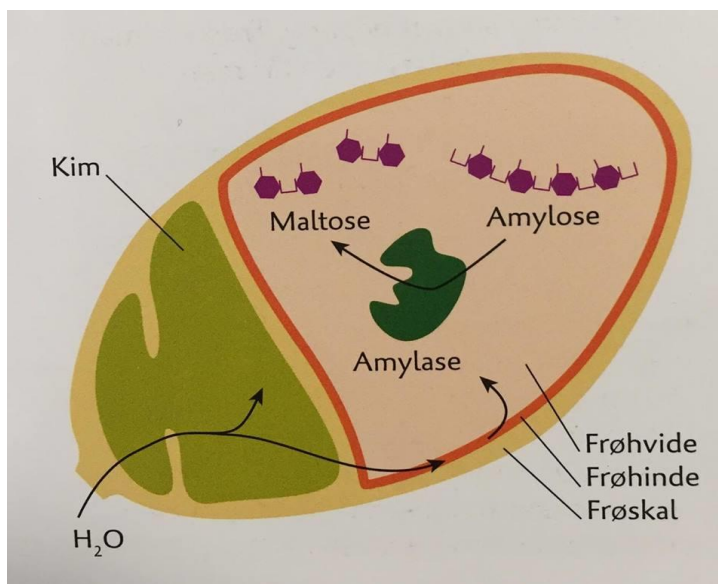
<sup>11</sup> [http://www.ehow.com/list\\_5968981\\_real-life-uses-titration.html](http://www.ehow.com/list_5968981_real-life-uses-titration.html)

# Fermentering

## Hvad er fermentering?

Fermentering handler om styringen og kontrollen af væksten for mikroorganismer, for at optimere produktionen af et specifikt produkt. Dette foregår i flere faser:

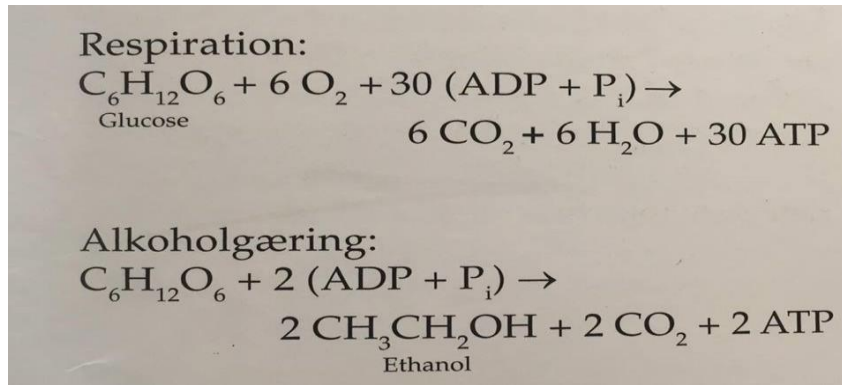
Fase 1 → Upstreamprocesserne, hvor der sker en klargøring forud for fermenteringen, ved blandt andet at forberede substratet, som mikroorganismene har brug for. Dette er de heterotrofe gærcellers substrat, som under fermentering forsyner dem med det der kaldes maltose, maltsukker og uorganiske næringssalte, for at øge deres vækst. produktionens råvare er stivelse, amylose, der kommer ofte fra bryg. Denne stivelse må først spaltes til Maltose, så gærcellerne kan bruges. Denne produktion sker under støbningen, hvor man sætter en spiring af byggen i gang. Under frøenes spiring spalter enzymer i frøet amylose til maltosen.



Maltbyg er tørrede korn. Byggen her kan suppleres med stivelse fra andre kornsorter, fx. majs. Dette kaldes råfrugt. Stivelsesspaltende enzymer tilsættes ofte til amyloser, sammen med råfrugten for at få en mere effektiv spaltning, ved højere temperatur, helt op til kogningen. Mikroorganismer har særlige behov for næringstoffer. Substrater til en heterotrof mikroorganisme indeholder en energikilde og næringssalte i en form, som kan anvendes. derudover har mange mikroorganismer brug for vitaminer.

Fase 2 → Fermenteringsprocessen, hvor substratet inokuleres med produktionsorganismene, og cellerne begynder at vokse og danne det ønskede produkt. Gæringen forgår i en gæringstank. Det klargjorte ølurt

tilsættes der en kultur gærceller til, hvilket vil påbegynde gæringsprocessen. Gærcellerne optager glukose og bruger det som energikilde. Det gør de ved respiration og alkoholgæring.



Fase 3 → Downstreamprocesserne, hvor produktet efterbehandles og klargøres til det endelige formål. Øl er mange forskellige restprodukter fra byg, humle og gær. Gærcellerne udskiller ethanol. Det betyder at Downstreamprocesserne sker når man frafiltrer gærcellerne og varmebehandle dem for at dræbe de sidste eventuelle gærceller før man hælder øllen på flaske.

### Anvendelse – Fremstilling af øl

Når urter skal omdannes til øl skal sukkeret fra planterne omdannes til ethanol og carbondioxid. Udover disse produkter dannes der også nogle biprodukter som har betydning for øllets smag. Man starter med at koge urterne og når de er kølet ned kan gærings processen starte. På bryggerier i store tanke tager disse gæringer normalt 3-10 dage. Under gæringen vil gærcellerne pga. stofskifteprocesserne blive varme, derfor køles tankene ned. Egentlig vil gærcellerne danne mere ethanol jo varmere de er, men da dette også giver nogle uønskede aromaer køles de ned.

De sukre der normalt er i urter man bruger til øl brygning er bl.a. glukose, maltose og maltotriose. Sukkeret i gæren skal nedbrydes i en meget bestemt rækkefølge da gæren skal hydrolyserere di- og trisakkarider inden de kan nedbrydes i glykolysen. Man inddeler derfor nedbrydningen i to dele:

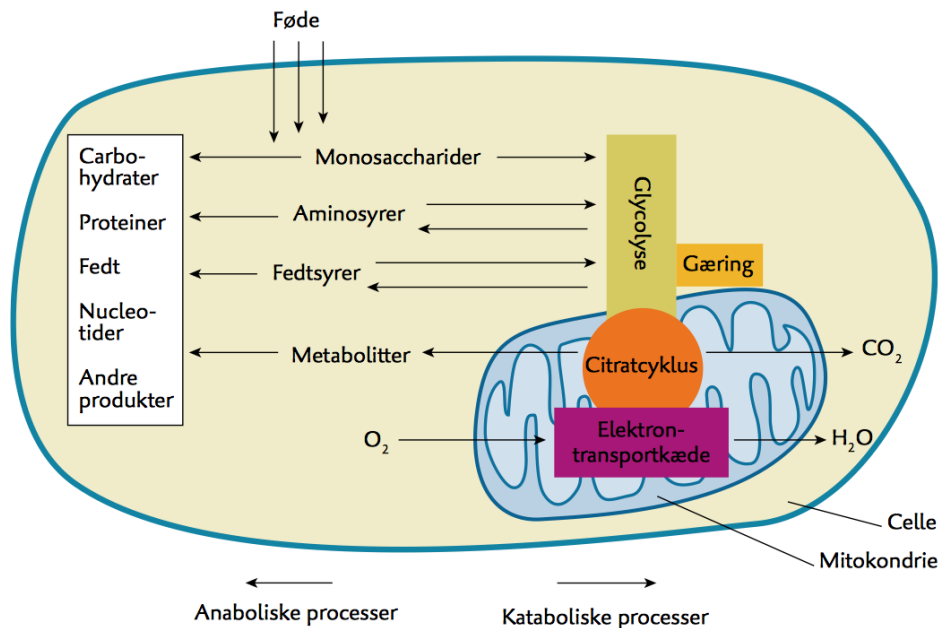
- Hovedgæring: glukose og maltose
- Sekundær gæring: maltotriose

Gærcellerne har ligesom menneskeceller mitokondrier. Derfor er de i stand til at nedbryde glukosen helt til carbondioxid og vand. Under anaerobe forhold (Gæring uden ilt) er denne helt nedbrydning dog ikke mulig. Denne nedbrydning ser derimod sådan ud:

- $\text{NADH} + \text{H}^+ + \frac{1}{2}\text{O}_2 \rightarrow \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O}$

### Stofskifte

Stofskifte er en energiomsætning af kemiske forbindelser i levende organismer. Dvs, at det er nedbrydning og omdannelse af mad til energi. Fermentering er derfor en bioteknologiske udnyttelse af mikroorganismernes stofskifteprodukter.



Billedet herover viser stofskifteprocesserne i en gærcele.

## Respiration

Respiration er en måde hvorpå organismer oprenser energi fra energi-rige molekyler såsom glucose, uden at benytte oxygen. Den anden måde at danne energi uden oxygen kaldes fermentering.

Der findes to slags respirationer; anaerobisk og aerobisk respiration. Disse er begge respirations metoder, hvor der bliver oxideret uden tilstedeværelse af oxygen.

### Anaerobisk respiration:

Anaerobisk respiration minder om aerobisk respiration, da de begge foregår i cellen. I begge processer bliver de elektroner der er ekstraheret ført ned gennem en elektron transport kæde og energien bliver brugt i ATP syntesen.



Men anaerobisk respiration er anderledes da det sidste molekyle i slutningen af transportkæden ikke er O<sub>2</sub>. Nogle organismer bruger sulfat og andre sulfur som det sidste elektron-acceptor. Dette er molekyler, der ikke kræver store mængder elektroner, hvilket betyder, at en mindre mængde energi bliver frigjort fra et givent energi molekyle. Anaerobisk respiration tillader organismer at ekstrahere en vis mængde energi fra molekyler, hvor der ikke er oxygen tilgængeligt.

Anaerobisk respiration er ikke den eneste måde, hvorpå oxidation af energigivende molekyler foregår uden oxygen.

Nogle organismer benytter en mere simpel metode kaldet fermentering.

**Fermentering** bliver elektroner ikke transporteret og oxidation af phosphorylation foregår ikke. I stedet er den eneste energi ekstraktion der foregår er fra glycolyse.

Disse reaktioner regenerer NAD<sup>+</sup> fra NADH produceret under glycolysen. Dette trin er nødvendigt, da hver celle har en pøl med NAD<sup>+</sup>, der skifter mellem dets oxideret form og dets reduceret form. Uden regenerations mekanismen ville alle NAD<sup>+</sup> sidde fast i deres NADH form, og glycolysen ville stoppe fordi NAD<sup>+</sup> ikke ville være tilgængeligt til at tage del i nogle reaktioner.

Der er flere forskellige former for fermentering, men en af de bedst kendte er fermentering af alkohol:

Fermentering af alkohol foregår ved at NADH donerer dets elektroner til en derivat af pyruvat, hvilket producerer ethanol som et produkt. Dette foregår i to trin.

I det første trin fraspaltes en carboxylgruppe fra pyruvatet og bliver derved frigjort som et carbondioxid, hvilket producerer et carbonmolekyle kaldet acetaldehyd.

I den anden del NADH overfører dets elektroner til acetaldehyd, hvilket derved regenerer NAD<sup>+</sup> og former ethanol.

# Tyndtlagschromatografi ( TLC )

---

## Apparatur:

Filtrerpapir

Kromatografkar

Opløsningsmiddel

Opløsning af de stoffer der skal analyseres

Referencestof(er)

UV-lys

Tyndtlagsplader

## TLC

Tyndtlagschromatografi (TLC) er en kromatografisk separationssteknik. Tyndtlagschromatografi består af en stationærefase og en mobil fase. Når man benytter sig af TLC, har man en plade, denne plade kunne fx være lavet af glas, eller kraftigt aluminiumsfolie, denne plade er "coatet", belagt, med et stof, som har forskellige egenskaber, alt efter hvilket stof man vil adskille. Dette er den stationærefase. Man markerer en startlinje på pladen, dette kan gøres med en blød blyantsstreg, denne startlinje skal placeres ca. 1 cm. fra bunden. På startlinjen skal de prøver, man vil analysere, placeres med et mellemrum mellem hinanden sammen med diverse referenceprøver. Alle prøverne skal være i en opløsning, og påføres på startlinjen.

Lad pletterne tørre, og mens dette sker, så forberedes et kromatografkar, dette gøres ved at hælde løbevæske i karret (den mobile fase). Det er vigtigt løbevæsken er et stof, som kan opløse de forskellige stoffer i prøven, her bliver ethanol eller propan-2-on ofte anvendt. På indersiden af kromatografkarret lægges et stykke filtrerpapir og der lægges låg på karret, låget bliver lagt på, for at forhindre væsken i at fordampe og filtrerpapiret gør, at luften i karret bliver mættet med dampene af opløsningsmidlet. Alt dette gør, at kromatografien forløber hurtigere.

Den stationærefase (pladen) sættes i karret, og kromatografien begynder. Nu vil den mobilefase trække sig op igennem den stationærefase. Prøver, som vi vil analysere, trækkes op igennem pladen, og hvor langt de kommer op igennem den stationærefase afhænger af deres opløselighed i den mobile fase. Derfor vil et stof, som er meget opløseligt bevæge sig langt henad pladen, hvorimod et stof med lilleopløselighed ikke bevæge sig lige så langt henad pladen. Før den mobile fase har nået den øverste kant, så tages pladen op af kammeret, nu markeres væskefronten, og man lader pladen (kromatogrammet) tørre.

Selve analysen af kromatogrammet foregår, ved at sammenligne distancen af prøverne, fra startlinjen. Langt de fleste prøver, er farveløse, derfor skal pletterne "fremkaldes". De skal altså gøres synlige. Dette

gøres ved at spraye pladen med et reagens, som vil reagere med de farveløse stoffer i pletterne og danne en farvet forbindelse. Nogle gange indeholder TLC pladerne et fluorescerende stof, så kan man belyse pladen med et ultraviolet lys, hvorved de farveløse pletter, som ikke fluorescerer, de kan ses som skygger.



Selve placeringen af en plet, kan bestemmes ved dets  $R_f$ -værdi, denne værdi er afstanden fra startlinjen til pletten divideret med afstanden mellem startlinjen og væskens "slutpunkt", altså der hvor væskefronten er markeret.

$$R_f = \frac{\text{Plettens afstand fra startlinjen}}{\text{Væskefrontens afstand fra startlinjen}}$$

Nu kommer referenceprøverne i spil, hvis en af vores analyseprøver bliver samme  $R_f$ -værdi som referenceprøven, så tyder det på, at de to stoffer er ens. Hvis man vil have en større sikkerhed i sin konklusion, så kan man foretage forsøget igen, med en anden mobil fase.<sup>12 13 14</sup>

#### Fordele/ulemper:

Fordelen ved, at benytte sig af tyndtlagschromatografi er, at det er en relativ billig analysemetode, den kræver ikke dyrt apparatur, mange mennesker eller flere dage. En ulempe, er at den kun er analytisk og man ikke kan være 100% præcis i sin analyse

#### Praksis:

TLC kan anvendes i praksis til at finde, ud af om en reaktion er ført til ende, dette er typisk i organisk kemi. Altså, man benytter TLC, for at finde ud af, om det forventede produkt er dannet.

Hvis vi fx har et stof A og B, som reagerer sammen og danner stof C, så sætter vi en prøve af rent stof C, på pladen (den stationærefase), og lader den mobilefase køre op igennem pladen, så vil den mobilefase trække stoffet C og vores produkt op igennem pladen. Så vil vi kunne se om, vores produkt har reageret fuldstændigt og "vandret" ligeså langt igennem pladen, som stoffet C. Vi kan derudover indsætte rene prøver af stof A og B, for at sammenligne med, hvorvidt stoffet har reageret og dannet C. Dette kan bruges i medicin, til at analysere på renheden af det producerede stof

<sup>12</sup> Bioteknologi 2 side 196

<sup>13</sup> <http://www.biosite.dk/leksikon/tyndtlagskromatografi.htm>

<sup>14</sup> [https://www.youtube.com/watch?v=HaeDrz\\_T3hY](https://www.youtube.com/watch?v=HaeDrz_T3hY)

**Video:** [https://www.youtube.com/watch?v=HaeDrz\\_T3hY](https://www.youtube.com/watch?v=HaeDrz_T3hY), <https://www.youtube.com/watch?v=e3IRt9XdV0s>

Den første video illustrerer, hvordan man udfører TLC i praksis, den anden illustrerer princippet bag TLC.

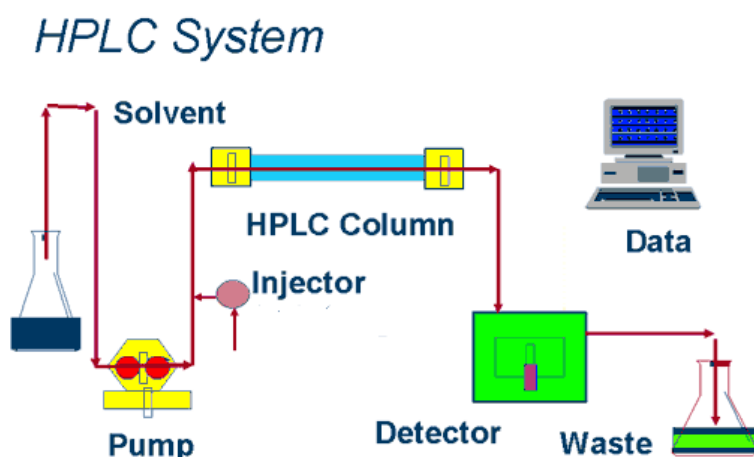
# HPLC -Væskekromatografi

## Beskrivelse:

Væskekromatografi, eller HPLC (High Pressure/Performance Liquid Chromatography), er en metode/teknik indenfor analytisk biokemi/bioteknologi, som bruges til at adskille blandinger, analysere og dermed identificere stofferne i en blanding. For at bestemme hvilket stof der er i en væske vha. væskekromatografi, identificeres prøvens komponenter, og denne del af analysen indenfor væskekromatografi kaldes for den kvalitative undersøgelse. For at bestemme mængden af et stof i en væske, kigges der på arealtoppene af stoffet fra signalerne, som registreres ved en dataopsamling.

## Princip:

Et HPLC-system består af en beholder, en pumpe, en injektionsventil, en kolonne, en detektor og en dataopsamlingsenhed og en printer eller skriver. Nedenstående illustration beskriver systemet af ved en undersøgelse vha. væskekromatografi.



I beholderen er der en væske, som pumpen hele tiden fører gennem systemet. Væsken skal også føre prøven, der skal undersøges, gennem systemet. Væsken kaldes enten for eluenten eller den mobile fase. Inden den mobile fase kommer til injektionsventilen, løber den først igennem et vakuumkammer, hvor væsken bliver afgasset, da mulige luftbobler vil give forstyrrelser i målingen. Efterfølgende indløber væsken til injektionsventilen, hvor en lille mængde af prøveopløsningen føres ind i væskestrømmen.

Væskestrømmen med prøven føres nu til kolonnen, hvor den centrale adskillelse af stofferne i prøven foregår. Adskillelsen foregår ved, at stofferne ikke bevæger sig lige hurtigt gennem kolonnen. Et stof der letopløseligt i mobile basen dvs. det binder sig stærkt til mobile basens molekyler og som dermed vil binder dårligt til kolonnematerialet vil bevæge sig forholdsvis hurtigt gennem kolonnen. Hvis et stof omvendt

binder godt til kolonnematerialet og måske oven i købet er mindre opløseligt i mobile basen bevæger det sig forholdsvis langsomt gennem kolonnen. Prøvens dele passerer nu en detektor, der indskrifter, hvor meget der til et givet tidspunkt passerer og derved giver signalet videre til en computer, der optegner et kromatogram for prøven.

## Anvendelsesområde:

Man kan bruge det til at analysere bestanddele i en blanding eller en forbindelse, derfor kan det gøre at der er et stort udvalg af muligheder til at anvende det. For eksempel at anvende det til retsvidenskab væskechromatografi i en undersøgelse, som forbinder det med sporanalyse og toksikologiske analyse, det vil sige nogle stoffer og blandinger med en helt almindelig analyserende opfattelse så det kan identificeres, eksplosive, farvestoffer, narkotika, alkohol, og ukendte stoffer.

Det mest almindelige anvendelse af væskechromatografi er at man kan bruge væskechromatografi i fødevarer sikkerheden, altså mad og drikkevarer bliver grundigt analyseret for at finde dets komponenter, om de er sikre for mennesker at indtage. De ting som man analyserer væskechromatografi er frugtsaft, sportsdrik, øl, sodavand og vin.

Det mest almindelige anvendelse af væskechromatografi er at man kan bruge væskechromatografi i fødevarer sikkerheden, altså mad og drikkevarer bliver grundigt analyseret for at finde dets komponenter, om de er sikre for mennesker at indtage. De ting som man analyserer væskechromatografi er frugtsaft, sportsdrik, øl, sodavand og vin.

Væskechromatografi kan også bruges i miljøet, som i miljøvidenskab. I miljøvidenskaben bruger man det til at screene vand, for spormetal elementer, eksplosive elementer, pesticider og herbicider. Det bliver specielt anvendt til at screene og behandle kommunalt og industrielt vandforsyninger. For at analysere spildevand.

## Udstyr, materialer, mm.:

De udstyr, som benyttes til at analysere et eller flere stoffer i en blanding vha. væskechromatografi, er anført nedenstående:

- Eluent/den mobile fase, som er den væske, der gerne vil analyseres.
- Reservoir, som er beholderen, hvor eluenten tilsættes i.
- Pumpe/vakuumkammer, hvor eluenten derefter overføres gennem et rør. Her bliver væsken afgasset, så der bliver fjernet eventuelle luftbobler, som kan give forstyrrelser i målingerne.
- Injektionsventilen, hvor en lille mængde af prøveopløsningen bliver ført ind i væskestrømmen.
- Analytisk kolonne, som er en termostat, hvor den egentlige adskillelse af stofferne i prøven foregår.
- Detektor, hvor stofferne i blandingen bliver analyseret.
- Afløbsspand med afløbsrør, hvor væsken udløber efter analysen.
- Dataopsamling/computer, som registrerer signalerne fra prøven.

De materialer til væskechromatografi, der anvendes til analysen, kan være forskellige væsker, hvis stoffer og hvor stor en mængde af stofferne i væsken gerne vil identificeres. F. eks. kan indholdet af koffein i kaffe undersøges vha. væskechromatografi.

## Praktisk anvendelse:

Væskekromatografi kan benyttes som nævnt tidligere til at bestemme mængden af koffein i bla. kaffe eller andre læskedrink. Udover stoffet koffein kan der også undersøges andre stoffer i nogle væsker, som danner en større viden om, hvilke stoffer og stort et indhold af stoffer der er i forskellige væsker. Væskekromatografi kan også give en generelt større viden om, hvordan metoden/teknikken praktisk fungerer og hvordan analysen skal udføres udover teoretisk forståelse på metoden.

### Fordele og ulemper:

Fordelen ved HPLC er, at metoden giver hurtigere resultater, og den kræver ikke at blive suspenderet til hexan eller methanol, som er organiske opløsningsmidler. Derfor vil det give bedre muligheder til analytiske forbindelser. Den giver også en meget bedre adskillelse af stofferne, og den kan analysere de stoffer og fortælle, om de egner til gaskromatografi.

Ulempen er at det er for dyrt at have en HPLC, også at HPLC-systemet kræver mange materialer til at fungere, såsom opløsningsmidler, filtre og plastslanger, pumpemanchetter og rotorér. De skal skiftes regelmæssigt og udskiftes korrekt for at kromatografi kan virke ordenligt. HPLC har også brug for kolonner til at virke, og det er det dyreste materiale kromatografi skal bruge.

### Videoer:

Nedenstående link til en video er anført for at belyse processen ved en analyse af et væske vha. væskekromatografi:

<https://www.youtube.com/watch?v=IUwRWn9pEdg>

### Litteraturliste:

Der blev anvendt følgende kilder til denne del af kompendiet:

- [http://scitech.au.dk/fileadmin/site\\_files/formidling/Kromatografi\\_01.pdf](http://scitech.au.dk/fileadmin/site_files/formidling/Kromatografi_01.pdf)
- <http://www.danskkemi-online.dk/files/DAK11-2014-s24-27.pdf>
- <http://www.danskkemi-online.dk/2014/11/01/modeller-inden-for-vaeskekromatografi-hvad-kan-vi-bruge-dem-til/>
- <http://www.einsten.net/2/2014/08/styrker-og-svagheder-i-HPLC.html>
- <http://e2h.bleste.com/hvordan-man-skal-forsta-anvendelser-af-vaskekromatografi>
- [http://denstoredanske.dk/It,\\_teknik\\_og\\_naturvidenskab/Kemi/Analytisk\\_kemi/kromatografi](http://denstoredanske.dk/It,_teknik_og_naturvidenskab/Kemi/Analytisk_kemi/kromatografi)

# DNA-sekventering

---

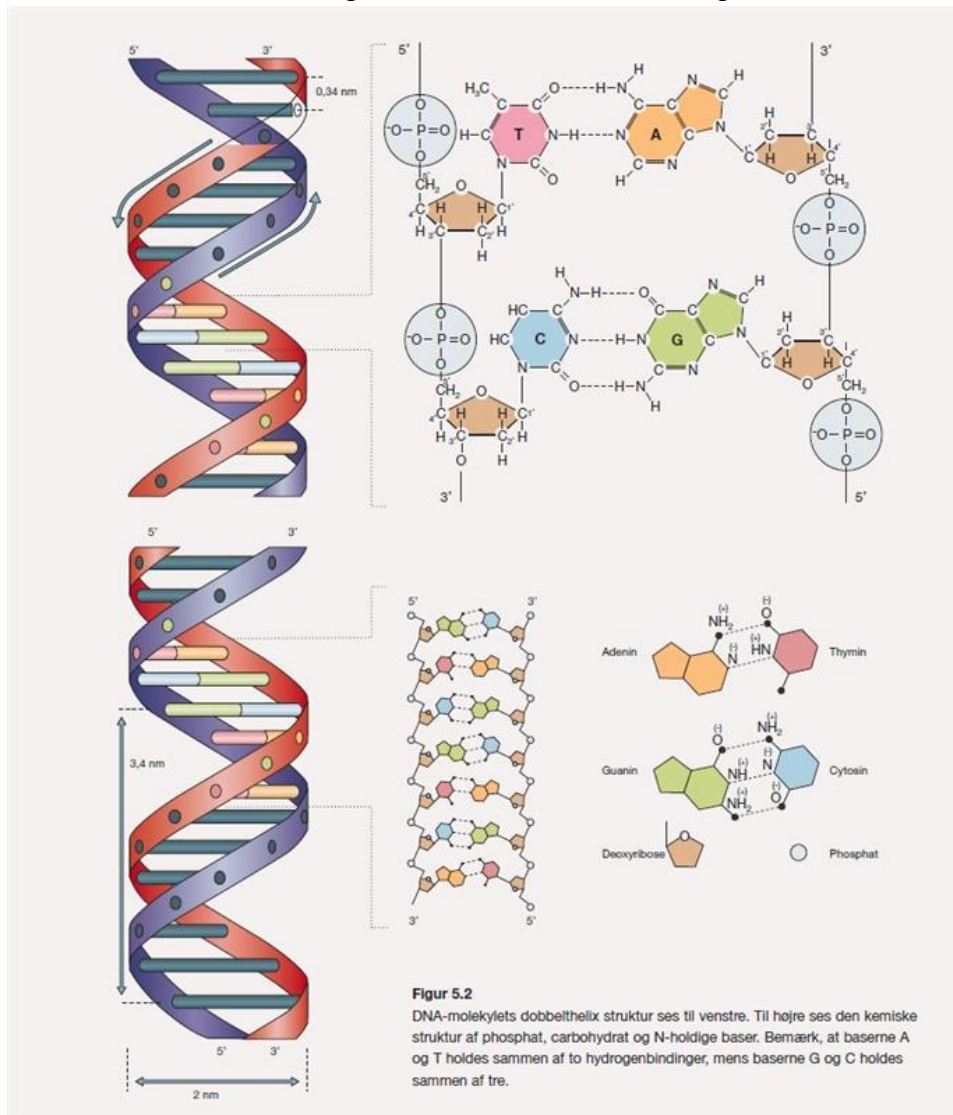
Mennesket er den mest komplicerede maskine der findes på jorden. For at producere alle delene til maskinen korrekt, er det nødvendigt at have en "opskrift", man kan følge. Denne såkaldte "opskrift" finder vi i menneskets DNA. I DNA'et kan man derved spore alle trinnene, der er gået forud for, at vi er blevet til et menneske. I DNA'et gemmer der sig også information om eventuelle genetiske sygdomme. Hvis man kunne sekvensere hele et menneskes genom, kunne man lokalisere fx et gen, der koder for en sygdom, og derved "klippe" det ud, hvilket ville resultere i, at individet undgik sygdommen. Dette er præcis meningen med DNA-sekventering, udover at man selvfølgelig kan lægge kortlagte genomer op i databaser til sammenligning og videre forskning til fordel for bioinformatikken.

## DNA:

Da DNA er centralt i selve metoden, vil jeg i dette afsnit gøre rede for DNAs opbygning. DNA er en forkortelse for deoxyribonucleinsyre, hvilket skyldes DNA'ets struktur. DNA'et indeholder cellens genetiske koder, der gennem proteinsyntesen bliver til alt i kroppen. DNA'et i mennesker findes i kromosomernes kerne sammen med histonerne og strukturproteiner. For at forestille sig DNAs struktur, kan man tænke på en snoet stige. Den består af to lange vanger/strenger, der skiftevis består af fosfat og carbohydratet deoxyribose. På deoxyribosens første carbonatom(carbonatom nr. 1), er der bundet én af de fire nitrogenholdige baser, nemlig Cytosin(C), Guanin(G), Thymin(T) og Adenin(A). Fortsætter vi med metaforen om stigen, kan vi forestille sig at baserne på hver sin streng, binder sig sammen og danner trinnene på trappen. Baserne kobles parvis og følger princippet kaldet baseparringsreglen, der går ud på, at C sidder overfor G, og A sidder overfor T. Når en deoxyribose, fosfat og en base er bundet sammen beregnes dette som et nucleotid. Nucleotiderne er bundet sammen af kovalente bindinger, der findes mellem den ene nucleotids carbohydrat og det andet nucleotids fosfatgruppe. Mellem baserne findes der desuden hydrogenbindinger, der holder sammen på DNA'ets struktur. Det er rækkefølgen af de fire baser, der gør hver enkelt menneske unikt, da denne rækkefølge



kan variere i det uendelige. Det er denne rækkefølge, der fastslås ved en DNA-sekventering.<sup>15</sup>



Figur 6 Billede taget fra hjemmesiden <http://www.biotek.gyldendal.dk/Bioteknologi%201/Kapitel%205.aspx>

## Enzymatisk sekventering

Under enzymatisk sekventering findes en del metoder, der dog alle er bygget på samme grundprincip, der her beskrives.

Den enzymatiske sekventering er bygget på DNA-replikationen, der fungerer som en naturlig DNA-kopieringsmaskine. Gennem oprenset DNA-polymerase danner man kopier af DNA'et. Metoden kræver, at DNA'et er single-stranded, altså enkeltstrenget. Hvis DNA'et er dobbeltstrenget, skal de på forhånd adskilles, altså denatureres.

DNA-polymerasen kan ikke selv starte syntesen af en ny DNA-streng, men kan til gengæld forlænge et eksisterende stykke. Derfor er det nødvendigt at man kemisk syntetiserer en sekvensprimer, der er et kort stykke enkelt-streng-DNA. Selve sekvensen i sekvensprimeren er komplementær til det DNA-område, der ligger tæt på det DNA-stykke, der skal analyseres. DNA-fragmentet og sekvensprimeren vil således bindes sig til hinanden på grund af komplementariteten. Der tilsættes dernæst de fire nucleotider, altså deoxynukleosidtrifosfaterne

<sup>15</sup> Bruun: Grundbog i bioteknologi 1. 1. udg. Gyldendal, 2012. (Bog)

dATP, dGTP, dCTP og dTTP, der fungerer som DNA-polymerasens substrat. Det er her essentielt, at man kan genkende de forskellige nukleotider fra hinanden. Derfor har man forinden mærket nukleotiderne med detektbare komponenter, såsom radioaktive isotoper eller fluorescerende grupper.

Efterfølgende kommer man en lav koncentration af kædestoppere i blandingen, der tilfældigt stopper DNA-polymerasen, således, at vi ender ud med alle forskellige størrelser af DNA-stykker, der hver især ender på et fluorescerende nukleotid, alt efter, hvilken kædestopper, der er benyttet. Herefter kan man bruge gel-elektroforese eller søjlekromatografi til at inddele DNA-stykkerne efter størrelse. Ud fra størrelsen af DNA-stykkerne og deres fluorescerende nukleotid, er det herefter muligt at sammenstykke den fulde DNA-sekvens, enten ved hjælp af røntgen eller ved hjælp af en maskine, der kan detekterer det radioaktive henfald.<sup>16</sup>

## Sekventering:

Når man skal lave en sekventering, ønsker man at finde rækkefølgen af baserne i det ukendte stykke DNA. DNA-sekvens er rækkefølgen af de fire forskellige nucleotider, som udgør grundenheden i DNA-strengen. Ved DNA-sekventering bruger man PCR-metoden, og det er i princippet det samme som opformering af DNA, Der tilsættes DNA-polymerase, primer, nucleotider, sammen med nogle modificerede nucleotider, som stopper selv replikationen. udover de frie nucleotider benyttes nogle som er tilsat en fluorescerende farve, de farvede nucleotider har hver sin farve, efter hvilken base de har, og de virker som stopklodser, og de kaldes deoxyribonucleotider, eller ddATP, ddCTP, ddGTP og ddTTP, og det er mærket med hver sit fluorescerende stof, når PCR-reaktionen er løbet færdig, vil der pga. stopnucleotiderne opstået

DNA-fragmenter med forskellige størrelser, alle fragmenterne starter det samme sted med den primer man har anvendt i reaktionen, fragmenterne stopper med et ddNTP, der fluorescerer en farve, og farven angiver hvilket nucleotid der er på den pågældende position.

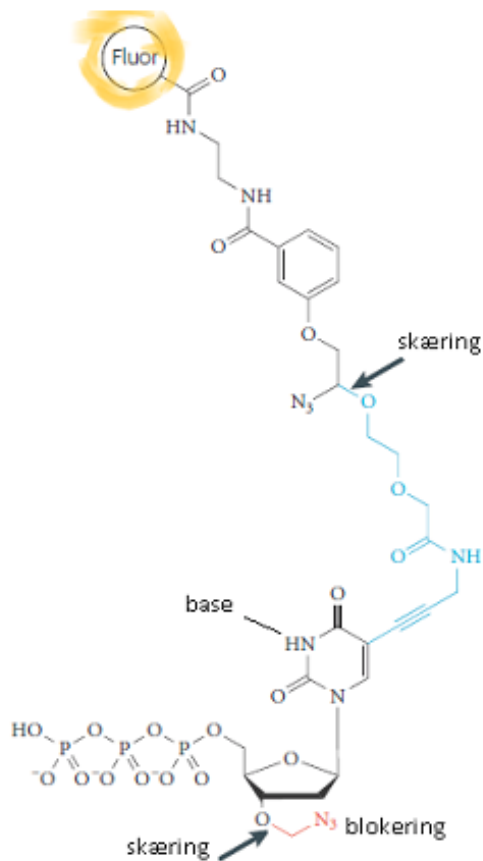
sekventering er en blanding af kemi og biologi, hvor de specielt designede nucleotider og DNA-replicerende Enzym, DNA polymerase, som indgår i en særlig reaktion. I denne sekventeringsteknik bruges cyklisk reversibel terminering (CRT), denne metode går ud på at

DNA-polymerase kopiere det enkelstrengede DNA, som er forberedt til sekventering, I stedet for at bygge en ny kopi af DNA-strengen med de naturlige nucleotider, er det tilsat kemiske forandrede versioner af nucleotiderne, og det gør, det muligt at aflæse hvilken nucleotid der sættes ind i kopien.

---

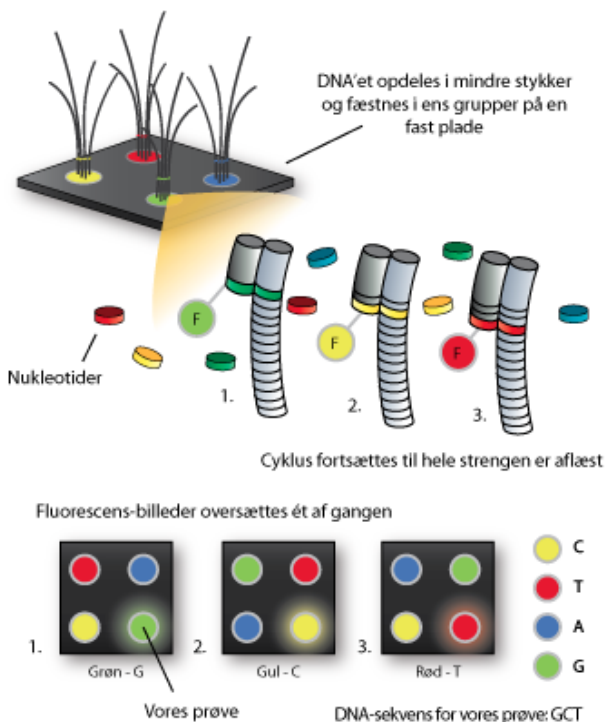
<sup>16</sup> DNA-sekventering. Udgivet af Gyldendal.

Internetadresse: [http://denstoredanske.dk/Natur\\_og\\_milj%C3%B8/Biokemi\\_og\\_molekyl%C3%A6rbiologi/Molekyl%C3%A6rbiologi/DNA-sekventering](http://denstoredanske.dk/Natur_og_milj%C3%B8/Biokemi_og_molekyl%C3%A6rbiologi/Molekyl%C3%A6rbiologi/DNA-sekventering) - Besøgt d. 13.01.2016 (Internet)



**illumina-metoden:**

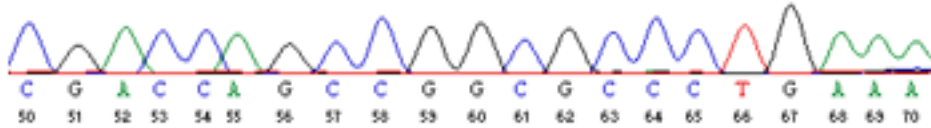
det DNA som skal sekventeres, skal først skæres ud i korte længder, som så derefter skal skilles fra hinanden, som bliver sekventeret hver for sig, de kopieres første op i antal, så de senere kan give et klart signal i sekventeringen, det minder om en salgs PCR, og det sørger for de kopirede sekvenser sidder fast på bunden ved siden af hinanden



DNA-sekventeringen forgår ved kopieringen af DNA, hvor de brugte nucleotider bærer en fluorescerende gruppe, i aflæsningsresultatet er hver farve et område, hvor gruppen af ens DNA-strenges sekventeres .

## Princippet bag sekventering

det er ofte robotter som udfører DNA-sekventeringen ,detektionen fungerer ved at laserstrålerne sendes mod DNA-fragmenterne, som giver et bestemt udslag af fluorescens. Signalet af fluorescens hører til et bestemt DNA-fragments stopnucleotid som opsamles i et datasæt på en computer.



Her er et eksempel på et datasæt for DNA-sekventering. De forskellige toppe viser hvilket nucleotid der er blevet detekteret i den position som er givet, i nogle af stederne kan man komme i tvivl om hvilken af baserne er korrekt, og det ses ved at opstår overlappende toppe, grunden til at der opstår to toppe oven i hinanden er at teknikken brugt ikke er perfekt, og det kan f.eks. være meget svært at adskille de meget små fragmenter fra hinanden, samtidigt med de bliver detekteret.

<http://www.biotechacademy.dk/Undervisningsprojekter/Gymnasiale-projekter/genteknologi/teori/4genteknologisketools/dna-sekventering>

<http://www.biotechacademy.dk/Undervisningsprojekter/Gymnasiale-projekter/darwin/Teori/Metoder>

[http://denstordanske.dk/Natur\\_og\\_miljø/Biokemi\\_og\\_molekylærbiologi/Molekylærbiologi/DNA-sekventering](http://denstordanske.dk/Natur_og_miljø/Biokemi_og_molekylærbiologi/Molekylærbiologi/DNA-sekventering)

## Opsummering

- En DNA-sekvens er et stykke DNA, der består af en række nukleotider, der derved koder for nogle forskellige gener
- DNA-sekventering er en metode, hvorpå man får fastlagt rækkefølgen af nukleotider i den givne DNA-sekvens
- Ved at kende DNA-sekvensen kan man videre påvirke generne fx via genterapi kurerer folk for genetiske nedarvede sygdomme