

Artsbestemmelse ved hjælp af alignment og ZooMS

Kollagen er det mest almindelige protein i knogler og hud og ligesom andre proteiner, så er det opbygget af kæder af aminosyrer. Rækkefølgen af aminosyrerne kalder vi for kollagensekvensen, og den varierer mellem arter (på samme måde som rækkefølgen af nukleotider i DNA-stregen varierer mellem arter). Arter der er nært beslægtede, har meget ens (endog nogle gange identiske) kollagensekvenser (f.eks. hund og ulv samt moderne mennesker og neandertaler), mens kollagensekvenserne for arter der ikke er nært beslægtede (f.eks. hund og gås) er mere forskellige.

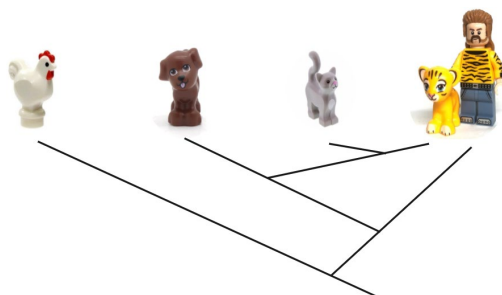
Ved at studere kollagensekvenserne for forskellige arter kan man derfor undersøge, hvor nært beslægtede de er med hinanden.

Nedenfor ser I et hypotetisk eksempel på kollagensekvenser for fire forskellige arter (skrevet med X, Y og Z). Her kan I se, at art 1 og 2 er mest ens, hvilket betyder at de er tættest beslægtede. Desuden kan I se, at art 3 er tættere beslægtet med art 1 og 2 end art 4. Denne metode til at sammenligne forskellige sekvenser kaldes "alignment".

Art	Kollagensekvens
1	XXXXXXXXYYYYYYYYYYYYZZZZZZ
2	XXXXYXXXXYYYYYXYYYYYYYYZZZYZZZ
3	XXYYXXXXZZZYYYYYYYYYYZZZYZZZ
4	XYYXXXXXZZZYYYYYYYYYYZZZYZZZ

a) Nederst i dette dokument finder I kollagensekvenserne for menneske, hund, tiger, kat og høne. I skal nu på samme måde sammenligne sekvenserne og vurdere hvor nært beslægtede de forskellige sekvenser er med hinanden. Dette gør I ved at markere de steder på kollagensekvenserne der varierer mellem arterne.

b) Ved at sammenligne resultatet fra del a med det fylogenetiske træ nedenfor, skal I vurdere hvilken sekvens der hører til hvilken art.



Skriv arterne her:

Art 1:

Art 2:

Art 3:

Art 4:

Art 5:

Ved at tage udgangspunkt i ZooMS-analysen, skal I nu teste om I fik matchet de fem kollagensekvenser med de rigtige arter.

ZooMS- analysen går ud på at artsbestemme arkæologiske materialer, som indeholder kollagen, fx læder- og knoglematerialer. Først skal man trække kollagen ud af materialet og herefter skal kollagen fordøjes ved at tilsætte enzymet trypsin. Trypsin skærer altid kollagen på højre side (C-terminal) af hver R (arginin) og K (lysin).

For at gøre denne øvelse mere simpel, indeholder de dele af kollagen, som I skal kigge på ikke arginin. I skal derfor kun forholde jer til, at trypsin klipper efter hvert lysin.

Hvis I f.eks. har et kollagen-molekyle med sekvensen nedenfor...

DPVDPLDIR**DEADPADPADPADPR****DPR****DEADPVDPADPTDAR**

... vil det efter trypsinfordøjelse blive fragmenteret til:

DPVDPLDIR
DEADPADPADPADPR
DPR
DEADPVDPADPTDAR

Vi kalder disse fragmenter for peptider. Eftersom kollagensekvensen varierer mellem arter samt at forskellige aminosyrer har forskellige masser, vil peptidernes masser (summen af aminosyrernes masser) være unik for en bestemt art. Masserne kan måles på et massespektrometer, og når vi kender dem, kan vi artsbestemme det arkæologiske materiale.

I eksemplet ovenfor ville vi kunne måle følgende masser, angivet som Dalton (molekylvægt):

1038 Da
1550 Da
386 Da
1582 Da

I praksis vil instrumentet kun kunne måle masser højere end 800 Da. Derfor vil peptidet med masse 386 Da ikke blive målt, og derfor vil vores artsbestemmelsen kun være baseret på tre af de fire peptider.

e) Ved at tegne på arket med de 5 kollagensekvenser nederst i dette dokument, skal I opdele hver af dem i de peptider der ville fremkomme, hvis I fordøjer dem med trypsin.

d) I skal nu udregne hvad massen af hvert peptid er. Til dette skal I bruge masserne af de enkelte aminosyrer, og dem kan I finde i tabel 1 nedenfor:

Tabel 1: Masser af aminosyrer

1-bogstavkode	3-bogstavkode	Kemisk formel	Masse (Da)
A	Ala	C ₃ H ₅ ON	71.03711
R	Arg	C ₆ H ₁₂ ON ₄	156.10111
N	Asn	C ₄ H ₆ O ₂ N ₂	114.04293
D	Asp	C ₄ H ₅ O ₃ N	115.02694
C	Cys	C ₃ H ₅ ONS	103.00919
E	Glu	C ₅ H ₇ O ₃ N	129.04259
Q	Gln	C ₅ H ₈ O ₂ N ₂	128.05858
G	Gly	C ₂ H ₃ ON	57.02146
H	His	C ₆ H ₇ ON ₃	137.05891
I	Ile	C ₆ H ₁₁ ON	113.08406
L	Leu	C ₆ H ₁₁ ON	113.08406
K	Lys	C ₆ H ₁₂ ON ₂	128.09496
M	Met	C ₅ H ₉ ONS	131.04049
F	Phe	C ₉ H ₉ ON	147.06841
P	Pro	C ₅ H ₇ ON	97.05276
S	Ser	C ₃ H ₅ O ₂ N	87.03203
T	Thr	C ₄ H ₇ O ₂ N	101.04768
W	Trp	C ₁₁ H ₁₀ ON ₂	186.07931
Y	Tyr	C ₉ H ₉ O ₂ N	163.06333
V	Val	C ₅ H ₉ ON	99.06841

e) For at lave den endelige artsbestemmelse baseret på ZooMS- analysen, skal I sammenligne jeres udregnede masser med masserne angivet i tabel 2.

NB!: De beregnede masser vil være 19 Da mindre end masserne af peptiderne anført i tabel 2. Dette skyldes bl.a. at peptiderne kan binde vandmolekyler, som tilføjer ekstra masse. I skal derfor lægge 19 Da til alle beregnede masser inden I laver sammenligningen. Peptidmasser der varierer med op til 1 Da, kan I betragte som ens.

Table 2:

Art	Masser af udvalgte peptider			
Tiger	867.960	1261.360	328.371	1281.348
Kat	867.960	1261.360	328.371	1281.348
Hund	867.960	1261.360	328.371	1311.374
Menneske	867.960	1235.322	328.371	1297.347
Høne	835.918	1273.371	328.371	1291.386

d) Tjek om metoden med alignment og det fylogenetiske træ (del a og b) giver samme resultat som ZooMS- analysen (del c til e).

Diskussionsspørgsmål:

- 1) Hvad ville der ske med peptidmasserne i ZooMS-analysen hvis der skete en ”silent” punktmutation i genet for kollagen, og hvad kan det have af betydning for resultatet?
- 2) Hvad ville der ske med peptidmasserne i ZooMS-analysen hvis der skete en ”missense” mutation i genet for kollagen, og hvad kan det have af betydning for resultatet?
- 3) Hvorfor er kollagensekvenser hos nært beslægtede arter meget ens?

Øvelsen er oprindeligt udviklet af professor Matthew Collins, Globe Institute, Københavns Universitet. Denne version af øvelsen er modificeret, så den er tilpasset gymnasieelever.

Kollagensekvenser for 5 arter

Art 1: GPSGPQGIRGEAGPAGPAGPAGPRGPRGEAGPSGPAGPTGARGPK

Art 2: GPSGPQGIRGEAGPAGPAGPAGPRGPRGEAGPSGPAGPTGARGPK

Art 3: GPSGPQGIRGEAGPAGPAGPAGPRGPRGETGPSGPAGPTGARGPK

Art 4: GPSGPQGIRGEAGAAGPAGPAGPRGPRGESGPSGPAGPTGARGPK

Art 5: GPAGPQGPRGEAGPPGPAGPGGPRGPRGEAGPPGPAGPTGARGPK