



Skriv gruppens prøvenumre på tjeklisten.

Zooarchaeology by Mass Spectrometry (ZooMS)

A) Opløsning af proteiner fra læderprøve

1. Tilsæt 200 μ L NaOH (base) til røret med læderprøven. Omryst røret i vortexeren i 5 sekunder.
2. Centrifuger røret i 1 minut ved 13.000 omdrejninger/minut (rpm) i den store centrifuge.
3. Sug langsomt de 200 μ L NaOH (eller så meget som muligt) op fra røret uden at få læderstykker med op i pipettespidsen. Kassér pipettespids med NaOH i skraldespanden.
4. Tilsæt 200 μ L AmBic til røret med læderstykket. Omryst røret i vortexeren i 5 sekunder.
5. Centrifuger røret i 1 minut ved 13.000 omdrejninger/minut (rpm).
6. Sug langsomt de 200 μ L AmBic (eller så meget som muligt) op fra røret uden at få læderstykker med i pipettespidsen. Kassér pipettespids med AmBic i skraldespanden. Sæt én lille prik på rørets låg.
7. Gentag punkt 4-6 yderligere 2 gange, dvs. 3 gange i alt. Der er nu tre prikker på rørets låg.
8. Tilsæt 50 μ L AmBic til røret med læderstykket. Sæt røret i varmeklokken ved 65° C i en time. Varmeklokken står på det hvide bord, hvor I hentede røret med NaOH.

Kollagen er et protein som findes i bindevæv, som fx hud, knogler og brusk. Det består af peptidkæder som er arrangeret i lange fibre eller flader. Kollagen kan findes i forskellige produkter såsom ansigtscremer, kosttilskud og shampoo. Når kollagen opløses gennem kogning kaldes det gelatine. Gelatine bruges bl.a. til at lave slik, cheese cake og medicinkapsler.

Kvæg var middelalderens trækdyr, som udførte det meste af arbejdet på landet. Kvægets horn, skind, klove, hår, knogler, blære, blod og afføring blev brugt til eksempelvis sko, tøj, lygter, punge, husblas og brændsel i fortidens samfund.

Læderet blev opløst med NaOH, og AmBic har medført at kollagen-proteinet nu er i en vandig proteinopløsning.

B) Fordøjelse af protein til peptider

1. Brug den lille bord-centrifuge til at centrifugere røret med trypsin i 5 sekunder.
2. Tilsæt 5 μ L trypsin direkte til væsken i røret med proteinopløsningen. Brug samme pipettespids til at suge væsken op og ned i pipetten 5 gange. Slut af med at skyde væsken ud i røret og kassér den tomme pipettespids.
3. Sæt røret med opløsning i varmeklokken ved 37° C i minimum 12 timer.

Trypsin-enzymet kløver/fordøjer kollagen-proteinet til mindre dele (peptider). Prøven bliver færdiggjort senere af en anden klasse.

Trypsin er en serinprotease som katalyserer hydrolyse (kløvning) af peptidbindinger ved carboxyl-enden af Lysine og Arginine. Trypsin findes naturligt i de fleste hvirveldyrers fordøjelsessystem.

Du skal nu arbejde videre med en **ny prøve**, som en anden elev tidligere har behandlet fra del A-B. Skriv gruppens **nye prøvenumre** på tjeklisten.

Grisens kropsdele havde mange muligheder til brug i tidligere samfund. Hud/skind blev brugt til pergament, sadler, seletøj, vinbeholdere, tapet, møbelbetræk, handsker og bogbind. Skomageren brugte børster/hår som sytråd. Blæren blev brugt til opbevaring af bl.a. fedt.

C) Standsning af proteinfordøjelse ved pH-ændring

Den nye prøve du skal arbejde med har stået i varmeblokken ved 37° C i minimum 12 timer. Kollagen-proteinet er nu kløvet til peptider. Det er denne peptidopløsning du skal arbejde videre med. Inden du får prøven med peptidopløsning er den blevet centrifugeret i 1 minut ved 13.000 omdrejninger/minut (rpm).

1. Tag et nyt, tomt eppendorf-rør.
2. Indstil en pipette på 55 µL og sug langsomt væsken med peptidopløsningen op fra dit nye prøverør (med tre prikker på låget), men uden at få læderstykker med op i spidsen. Det kan være nødvendigt ikke at suge alle 55 µL op. Overfør denne peptidopløsning til det tomme eppendorf-rør.
3. Tag klistermærket med prøvenummeret af låget fra prøverøret (som nu kun indeholder små læderstykker), og sæt klistermærket på røret med selve peptidopløsningen (væsken). Dette rør skal du bruge fremadrettet.
4. Brug den lille bord-centrifuge til at centrifugere røret med TFA i 5 sekunder.
5. Tilsæt 10 µL TFA (syre) til peptidopløsningen for at inaktivere trypsinet. Brug samme pipettespids til at suge væsken op og ned i pipetten 5 gange. Slut af med at bruge samme pipettespids til at suge 2 µL fra peptidopløsningen op i spidsen.

Tilsætning af TFA medvirker at trypsin bliver inaktiv. TFA er desuden med til at gøre væsken mere kompatibel så peptiderne bedre kan binde til søjlematerialet i zip-tippen, som er næste skridt.

6. Dryp de 2 µL peptidopløsning på et lille stykke pH-indikatorpapiret. Kassér pipettespidsen. Aflæs pH-værdien og notér denne i prøve-porteføljen.

Før middelalderen var hestekød altid tilstede ved offermåltider og højtid. I middelalderen blev hesten brugt i krigsførelse og senere brugte kongelige og adelige mere elegante heste til jagt og parader, hvor den ansås som et statussymbol. Efter kristendommens indførelse blev det anset som ukristent at spise hestekød.

Aktiviteten af trypsin er højest ved neutral pH. Ved tilsætning af syre inaktiveres trypsin, og derved standses kløvning af kollagen til peptider.

D) Isolering af peptider via Zip-tipping

Prøven er nu en opløsning af peptider og mange andre organiske og uorganiske elementer. For at isolere peptiderne, og "rengøre" væsken, skal prøven igennem metoden Zip-tipping.

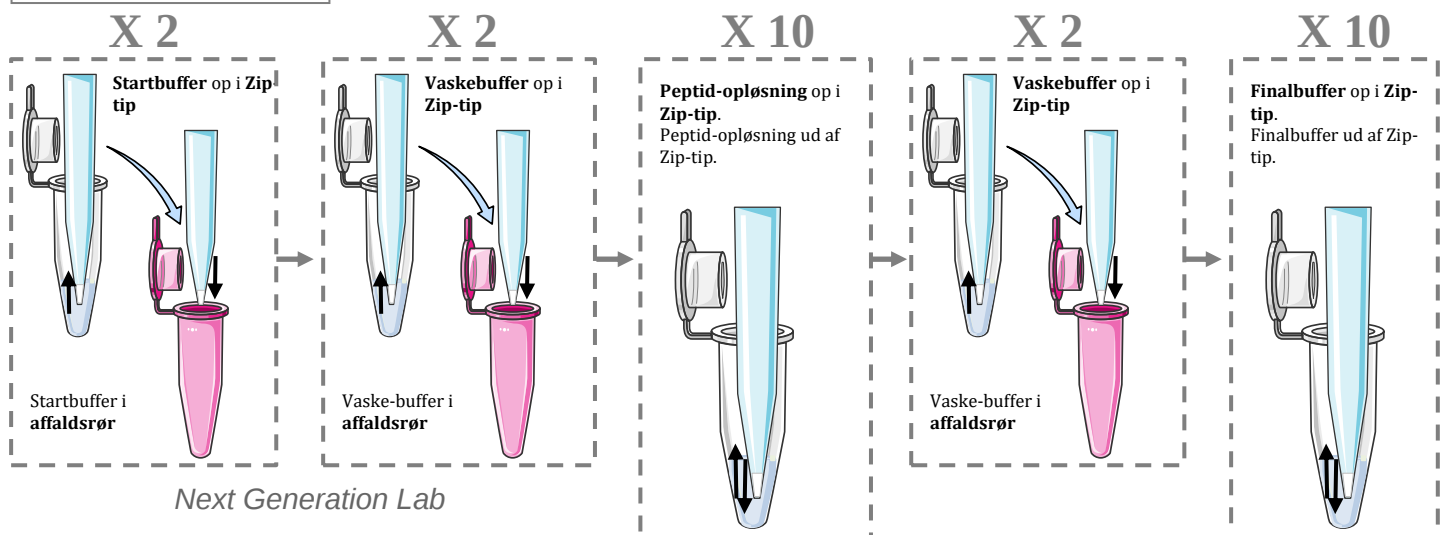
1. Sørg for at du har alle rør klar til brug (Prøven med peptidopløsning, start-buffer, 2 x vaske-buffer, final-buffer og affaldsrør) så du kan udføre efterfølgende punkter i én bevægelse. Du kan se forløbet af zip-tipping vist i tegningen på næste side.
2. Indstil en gul pipette på 100 µL, tag en zip-tip på pipetten. **OBS!** behold samme zip-tip på pipetten under hele del D!

3. Sug startbuffer op i zip-tippen. Skyd væsken ud i røret med 'Affald', men sørg for at filteret akkurat er dækket af buffervæske.
4. Gentag punkt 3.
5. Sug vaskebuffer op i zip-tippen. Skyd væsken ud i røret med 'Affald', men sørg for at filteret akkurat er dækket af buffervæske.
6. Gentag punkt 5.
7. Placer zip-tippen i røret med prøven med peptidopløsningen. Sug op og ned 10 gange i væsken, men sørg for at filteret hele tiden er dækket af væske. Afslut med at skyde væsken ud af zip-tippen ned i røret med peptidopløsningen igen, men sørg for at filteret akkurat er dækket af væske. Nu er peptiderne bundet i filteret.
8. Sug vaskebuffer op i zip-tippen. Skyd væsken ud i røret med 'Affald', men sørg for at filteret akkurat er dækket af buffervæske.
9. Gentag punkt 8.
10. Placer zip-tippen i røret med finalbuffer. Sug op og ned 10 gange i væsken, men sørg for at filteret hele tiden er dækket af væske. Afslut med at skyde væsken ud af zip-tippen ned i røret med finalbuffer. Herefter kan zip-tippen kasseres i skraldespanden.
11. Tag klistermærket fra låget af røret med peptidopløsning og sæt det på låget af final-røret. Aflever final-røret til underviseren.

Zip-tipping er en mini-udgave af søjlekromatografi, som er en teknik der bruges til at isolere proteiner og peptider. Peptiderne i opløsningen er hydrofobisk og bindes til det hvide filter-materiale i zip-tippen. Der er tilsat kemikaliet acetonitril til både Startbuffer og Final (elueringsbuffer). Acetonitril bryder hydrofobiske bindinger, og sørger for at peptider ikke kan binde sig til zip-tippen.

Zip-tippen blev klargjort med startbufferen således at søjlematerialet blev frigjort for alle bindinger. Startbufferen blev vasket væk med Vaskebufferen, således at peptiderne kan binde til søjlematerialet ved gentagende gange at pipettere i peptidopløsningen. Rester af ubundne peptider og andre stoffer blev herefter vasket væk med Vaskebuffer. Peptidernes binding til søjlematerialet blev frigjort vha. bufferen i final. Nu er peptiderne fra kollagen isoleret i finalbufferen og klar til videre forløb med massespektrometri.

Forløb af Zip-tipping



Ordliste

ACN	Acetonitril. Polær organisk solvent. Kan opløse en række ioniske og ikke-polære stoffer. Acetonitril bryder bindinger mellem ikke-polære, hydrofobiske overflader (peptiderne) og søjlematerialet.
Ambic	Ammoniumbicarbonat, NH_4HCO_3 er også kendt som hjortetaksalt. Ved høj varme vil AmBic løsne proteiner fra læderet.
Aminosyre	Molekyle der indeholder en aminogruppe og en carboxylsyregruppe ($-\text{COOH}$).
Buffer	Væske indeholdende forskellige kemikalier.
Centrifuge	Apparat, hvor centrifugalkraften udnyttes til at bundfælde væsker eller komponenter i væsker.
Finalbuffer	Er en blanding af ACN og TFA. Final buffer er en elueringsbuffer som sørger for, at alle bindingerne mellem søjlematerialet og peptiderne i zip-tippen brydes. Ordet 'eluering' dækker over at udtrække et ønsket stof.
Kollagen	Protein der findes i bindevæv, som fx. hud, knogler og brusk. Består af peptidkæder som er arrangeret i lange fibre eller plader.
MS	Massespektrometri. Analysemetode hvor stoffer ioniseres og afskilles på baggrund af masse/ladningsforhold (m/z).
NaOH	Natriumhydroxid eller kausisk soda. Stærk base der bruges som opløsningsmiddel, bl.a. i afløbsrens til at opløse hår og fedt.
Peptid	Små kæder af aminosyre, der er bundet sammen af peptidbindinger. Peptider består typisk af op til 50 aminosyre.
Protein	Store molekyler der er essentielle for alle levende organismer. Er bygget op af aminosyrekæder.
Startbuffer	Er en blanding af ACN og TFA. Startbufferen er en forberedelsesbuffer som sørger for, at alle bindinger mellem søjlematerialet og eventuelle peptidbindinger der måtte være på zip-tippen brydes.
TFA	Trifluoroacetic acid, CF_3COOH . Stærk syre der bl.a. bruges som pesticid. Sørger for at peptider nemmere binder til zip-tippen.
Trypsin	Enzym, der kløver proteiner til peptider via. hydrolyse. Findes i menneskers tolvfingertarm, og bruges i forbindelse med fordøjelsen af proteiner.
Vaskebuffer	Indeholder 0,1% TFA. Bruges til at vaske ACN og eventuelle kontaminanter ud af zip-tippen.
Vortex	Apparat der bruges til at omryste mindre rør.
Zip Tip	Zip-tippen fjerner kontaminanter og gør, at peptiderne er i optimal tilstand til Masse Spektrometri. Dette sker ved at hydrofobiske peptider bliver tilbageholdt i søjlematerialet indtil der elueres med acetonitril.
ZooMS	Zooarchaeology by Mass Spectrometry. Metode til at undersøge kollagen i nogle typer af organisk arkæologisk materiale med henblik på at artsbestemme det.