Ohjaajan ohje: Väriaineiden erottelu agaroosigeelielektroforeesin avulla

Työn tavoite Työn tavoitteena on tutustua elektroforeesin toimintaperiaatteeseen ja ymmärtää sen sovellusmahdollisuudet biologisessa tutkimuksessa. Työssä tutustutaan myös luonnontieteellisen tutkimuksen tekemiseen. Työssä valetaan oma geeli ja tehdään agaroosigeelielektroforeesiajo erilaisilla väriaineilla. Tutkimustehtävänä on selvittää, ovatko tutkitut väriaineet positiivisesti varautuneita, negatiivisesti varautuneita vai varauksettomia.

Kohderyhmä Yläkoulu ja lukio.

Opetussuunnitelman sisällöt Yläkoulu: Biologinen tutkimus (S1), Mitä elämä on? (S4). Lukio: Biologian sovellukset (BI5).

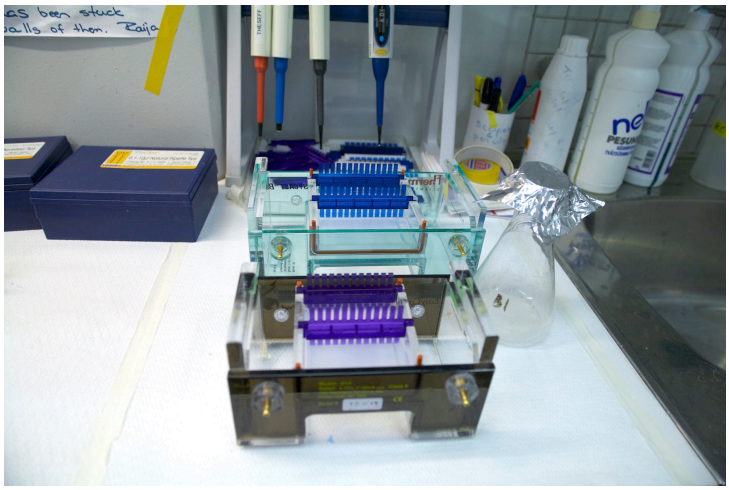
Työn kesto 120 min + esivalmistelut 30 min.

Taustatietoa

Elektroforeesissa sähköisesti varautuneita aineita erotellaan sähkökentän avulla. Sähköisesti varautuneet aineet kulkeutuvat sähkökentässä kohti vastakkaismerkkistä varausta. Esimerkiksi negatiivisesti varautunut DNA-molekyyli kulkeutuu kohti laitteiston positiivista napaa. **Tehtävänäsi on selvittää, millaisia varauksia elintarvikeväreissä käytettävillä väriainemolekyyleillä on.**

Elektroforeesilaitteisto muistuttaa rakenteeltaan elektrolyysikennoa. Laitteistoon kuuluu virtalähde, elektrodit, ajoastia sekä tutkittavat näytteet. Yleensä näytteitä ajetaan geelimäisessä väliaineessa, jotta ne erottautuisivat paremmin. Tässä työssä hyödynnetään agaroosigeeliä, joten kyseessä on agaroosigeelielektroforeesi (AGE).

Geelielektroforeesissa näytteiden ajautumisnopeuteen vaikuttavat sekä aineen molekyylien koko että sähkövaraus. Isommat molekyylit ajautuvat hitaammin kuin pienemmät, sillä geeli vastustaa enemmän suurempien molekyylien kulkua. Tämän vuoksi geelielektroforeesissa esimerkiksi suuret DNA-pätkät ajautuvat hitaimmin ja pienimmät nopeimmin. Näin erikokoisia molekyylejä voidaan erotella toisistaan.



Kuva 1. Kaupallinen agaroosielektroforeesilaitteisto.

Tämä teos on lisensoitu Creative Commons Nimeä-JaaSamoin 4.0 Kansainvälinen –lisenssillä. Salla Merenheimo & Justus Mutanen / BioPop-tiedeluokka 2019.

Pohdittavaksi ennen työtä

1. Mihin elektroforeesia voidaan käyttää?

   Biologisessa tutkimuksessa elektroforeesia hyödynnetään useimmiten erikokoisten DNA-molekyylien erotteluun. Sen avulla voidaan esimerkiksi arvioida restriktioentsyymeillä katkaistujen DNA-palojen kokoa, erotella erikokoisia DNA-paloja puhdistusta varten tai analysoida PCR-tuotteita esimerkiksi osana geneettistä diagnosointia.

2. Mitä agaroosi on ja mihin sitä voidaan käyttää?

   Agaroosi on punalevistä eristetty ja puhdistettu polysakkaridiseos. Biologiassa sitä käytetään muun muassa elektroforeesigeelien, kromatografiapylväiden ja mikrobien kasvualustoiden valmistuksessa. Elintarviketeollisuudessa agaroosia käytetään vegaanisena hyytelöimisaineena liivatteen sijasta.

3. Jos tehtävänäsi on selvittää, millaisia varauksia tutkituilla aineilla on, mihin kohtaan geeliä sinun tulee pipetoida näytteet?

   Näytteet tulee pipetoida geelin keskelle. Väriainemolekyylien varausta ei tunneta, joten ne voivat lähteä liikkumaan kohti laitteiston positiivista napaa, negatiivista napaa tai pysyä paikoillaan.

Työssä tarvittavat välineet

- Geelikelkka ja –kammat
- maalarinteippiä
- Agaroosijauhetta
- tarkka vaaka agaroosin punnitsemista varten
- 1 x TAE -puskuriliuosta
- 0,25 x TAE-ajopuskuria
- mittalaseja
- 250 ml erlenmeyer-pullo tai muu mikronkestävä lasiastia
- Mikroaaltouuni
- Väriainenäytteitä (sis. elintarvikeväriä ja glyserolia)
- Mikropipetti ja pipetinkärkiä / pasteur-pipettejä
- Elektroforeesilaitteisto ja virtalähde
- patakinnas
- Suojavarusteet: suojatakit ja -hanskat

Esivalmisteluissa tarvittavat välineet

- 50 x TAE -puskuriliuosta (kantaliuos)
- tislattua vettä
- mittalasi

Tämä teos on lisensoitu Creative Commons Nimeä-JaaSamoin 4.0 Kansainvälinen –lisenssillä. Salla Merenheimo & Justus Mutanen / BioPop-tiedeluokka 2019.

- 1 l lasipulloja
- erivärisiä elintarvikevärejä (pulloissa lukee väriainemolekyylien nimet)
- glyserolia
- mikroputkia
- permanent-tussi näytteiden nimeämiseen

Esivalmistelut

1. Valmista geeliä varten 1 x TAE -puskuria sekoittamalla 10 ml 50 x TAE -kantaliuosta ja 490 ml tislattua vettä.
2. Valmista ajoa varten 0,25 x TAE -elektroforeesipuskuria sekoittamalla 250 ml 1 x TAE -puskuria ja 750 ml tislattua vettä.
3. Tee erivärisiä väriainenäytteitä (esim. punainen, sininen ja näiden sekoituksena violetti). Valmista 1 ml kutakin väriainenäytettä lisäämällä mikroputkeen 250 μl glyserolia ja 750 μl elintarvikeväriä. Sekoita näytteet huolellisesti. Nimeä näytteet.

Työturvallisuus

- Ole varovainen kuuman geelimassan kanssa! Käännä erlenmayerin pullonsuu ihmisistä poispäin kuumennuksen jälkeen. Käytä seoksen käsittelyssä patakinnasta tai muuta suojavarustetta.
- Käytä suojatakkia koko työn ajan.
- Käytä suojahanskoja käsitellessäsi väriainenäytteitä.
- Käytä agaroosielektroforeesin virtalähdettä vain ohjaajan avustuksella.

Työohje

a) Geelin valmistus

Ohjeesta saadaan kaksi geeliä.

1. Mittaa erlenmeyeriin 1 g agaroosia.
2. Lisää 100 ml 1 x TAE -puskuriliuosta ja sekoita huolellisesti.
3. Kuumenna seosta varovasti mikroaaltouunissa välillä sekoitellen, kunnes seos on kirkasta. Seos ei saa kiehua.
4. Jäähdytä seosta pöydällä tai viileän vesihanan alla. Seuraa kuitenkin, ettei seos ala jähmettymään.
5. Kaada jäähtynyt seos geelikelkkaan. Varo, ettei kelkkaan jää ilmakuplia.
6. Aseta kampa kelkan **keskelle** (tutkimuksen alussa ei tiedetä väriainemolekyylien varausta, joten varaudutaan näytteiden kulkeutumiseen kumpaan tahansa suuntaan).
7. Anna geelin jähmettyä (jähmettymiseen on hyvä varata n. 20-30 min).

Tämä teos on lisensoitu Creative Commons Nimeä-JaaSamoin 4.0 Kansainvälinen –lisenssillä. Salla Merenheimo & Justus Mutanen / BioPop-tiedeluokka 2019.

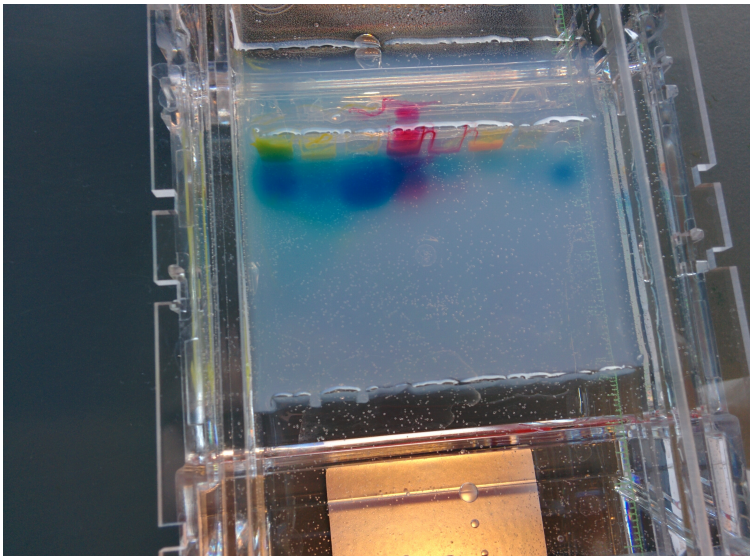
Kuva 2. Agaroosin punnitseminen.

Kuva 3. Agaroosigeelin valmistus mikroaaltouunissa.

b) Geelin ajaminen

Tutustu ohjaajan opastuksella mikropipetin käyttämiseen ennen työn aloittamista!

1. Irrota kampa varovasti jähmettynestä geelistä.
2. Aseta kelkka geeleineen elektroforeesilaitteiston ajoastiaan.
3. Kaada 0,25 x TAE -ajopuskuria ajoastiaan varovasti niin, että geeli juuri ja juuri peittyy puskuriliuokseen.
4. Pipetoi tutkittavia väriainenäytteitä geelin kuoppiin. Jos käytät automaattipipettiä, käytä pipetissä AINA kärkeä. Älä käännä pipettiä koskaan kyljelleen tai ylösalaisin, jos kärjessä on nestettä! Sopiva määrä pipetoitavaa nestettä on noin 15 μl per kaivo.
5. Kytke ajoastia virtalähteeseen ja käynnistä geeliajo. Sähkökentän muodostuessa puskuriliuoksessa alkaa muodostua kuplia.
6. Aja näytteitä geelillä noin 20–30 minuuttia 100 V jännitteellä.



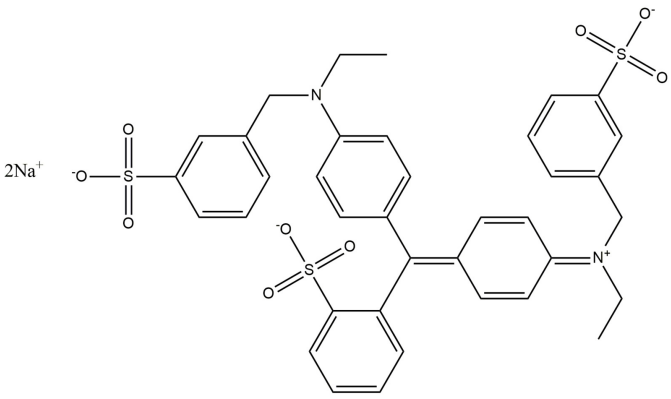
Kuva 4. Geeliajon lopputulos puolen tunnin jälkeen.

Tämä teos on lisensoitu Creative Commons Nimeä-JaaSamoin 4.0 Kansainvälinen –lisenssillä. Salla Merenheimo & Justus Mutanen / BioPop-tiedeluokka 2019.

Pohdittavaksi työn jälkeen

1. Selvitä, mitä väriaineita eri väriainenäytteet sisälsivät. Ovatko nämä positiivisesti varautuneita, negatiivisesti varautuneita vai varauksettomia molekyylejä?

   Elintarvikevärin sisältämät väriaineet selviävät ainesosaluetteloista. Sininen elintarvikeväri sisältää usein briljanttisinistä (negatiivisesti varautunut molekyyli). Punainen elintarvikeväri sisältää usein karmiinia (negatiivisesti varautunut molekyyli). Keltainen elintarvikeväri sisältää usein erilaisia karotenoideja, kuten luteiinia (varaukseton molekyyli).



Kuva 5. Briljanttisinisen rakennekaava. Kaavasta nähdään, että briljanttisininen on negatiivisesti varautunut molekyyli. Kuva: Wikimedia Commons (Arzagh, CC-BY SA 4.0)

2. Miksi eri molekyylit kulkevat geelielektroforeesissa eri nopeudella?

   Molekyylien kulkeutumisnopeuteen vaikuttavat sen koko ja sähköinen varaus. Molekyyli kulkeutuu sitä nopeammin, mitä pienempikokoinen se on ja mitä suurempi on sen sähköinen varaus.

3. Miksi puskuri alkaa kuplia, kun se kytketään virtalähteeseen? Mitä elektrodeilla muodostuu?

   Ajoastiassa tapahtuu veden elektrolyysi. Tällöin puskuriliuokseen muodostuu happi- ja vetykaasua veden hajotessa. Anodilla eli positiivisella elektrodilla muodostuu happea ja katodilla eli negatiivisella elektrodilla muodostuu vetykaasua.

4. Miksi kaikki väriaineet eivät kulkeudu geelillä?

   Väriaineen kulkeutuminen edellyttää, että väriainemolekyyli on sähköisesti varautunut. Varauksettomat molekyyli eivät kulkeudu geeliajon aikana.

Tämä teos on lisensoitu Creative Commons Nimeä-JaaSamoin 4.0 Kansainvälinen –lisenssillä. Salla Merenheimo & Justus Mutanen / BioPop-tiedeluokka 2019.