



Samanburður á trypsíni einangruðu úr N-Atlantshafsporski og þorski frá Færeyjum

Guðrún Birna Jakobsdóttir

Raunvísindadeild
Verkfræði- og náttúruvísindasvið
Háskóli Íslands
Reykjavík, mars 2010

Samanburður á trypsíni einangruðu úr N-Atlantshafsporski og þorski frá Færeyjum

Guðrún Birna Jakobsdóttir

16 ECTS eininga ritgerð sem er hluti af
Baccalaureus Scientiarum gráðu í lífefnafræði

Leiðbeinendur
Prófessor Jón Bragi Bjarnason
Dr. Bjarki Stefánsson

Raunvísindadeild
Verkfræði- og náttúruvísindasvið
Háskóli Íslands
Reykjavík, mars 2010

Samanburður á trypsíni einangruðu úr N-Atlantshafsporski og þorski frá Færeyjum
16 ECTS eininga ritgerð sem er hluti af *Baccalaureus Scientiarum* gráðu í lífefnafræði

Höfundarréttur © 2010 Guðrún Birna Jakobsdóttir
Öll réttindi áskilin

Raunvísindadeild
Verkfræði- og náttúruvísindasvið
Háskóli Íslands
Dunhagi 3
107 Reykjavík

Sími: 525 4000

Skráningarupplýsingar:

Guðrún Birna Jakobsdóttir, 2010, *Samanburður á trypsíni einangruðu úr N-Atlantshafsporski og þorski frá Færeyjum*, BS ritgerð, Raunvísindadeild, Háskóli Íslands, 20 bls.

Reykjavík, mars 2010

Ágrip

Í því verkefni sem hér verður til umræðu var viðfangsefnið hvort sýna mætti fram á mun á trypsín serín próteinösum úr N-Atlantshafsporski (íslenskum)- og færeyskum þorski með lífefnafræðilegum greiningum. Framkvæmd fól í sér hreinsun og einangrun trypsíns úr meltingarfærum færeysks þorsks, keyrslu á jónaskiptasúlu, jafnhleðslustillingu, mólmassaákvörðun og mótefnisþrykk.

Tileinkað Jóni V. Halldórssyni (afa Nonna)

Efnisyfirlit

Ágrip.....	iii
Efnisyfirlit	vi
Myndir.....	viii
Töflur.....	ix
Þakkir	x
1 Inngangur.....	1
1.1 Trypsín.....	2
2 Aðferðir.....	3
2.1 Prótein- og virknimæling.....	3
2.2 Jónaskiptaskiljun	4
2.3 Rafdráttur.....	4
2.3.1 Jafnhleðslustilling.....	6
2.3.2 Tricine-SDS-PAGE	6
2.4 Litunaraðferðir.....	7
2.5 Westernþrykk	7
3 Efni.....	8
4 Framkvæmd.....	9
4.1 Einangrun og hreinsun.....	9
4.2 Jónaskiptaskiljun	9
4.3 Virknimæling.....	9
4.4 Próteinmæling.....	10
4.5 Jafnhleðslustilling.....	10
4.6 Tricine-SDS-PAGE	11
4.7 Mótefnisþrykk	11
4.8 Botnfelling þunnra sýna fyrir jafnhleðslustillingu.....	11
5 Niðurstöður og umræða.....	12
5.1 Einangrun og hreinsun.....	12
5.2 Próteinmæling.....	13
5.3 Jónaskiptaskiljun	14
5.4 Jafnhleðslustilling.....	17
5.5 Tricine-SDS rafdráttur.....	18
5.6 Western-þrykk	19
6 Lokaorð	20
Heimildir	21

Myndir

Mynd 1 Samanburður á meðalþyngd fullvaxta þorsks úr N-Atlantsshafi.....	1
Mynd 2 BSA-próteinstaðalferill.....	13
Mynd 3 Keyrsla trypsín sýnis úr færeyskum þorski á jónaskiptaskilju.....	14
Mynd 4 Keyrsla trypsín sýnis úr íslenskum þorski á jónaskiptaskilju.....	15
Mynd 5 Keyrsla trypsín sýna saman á jónaskiptaskilju.....	16
Mynd 6 IEF-rafdráttur í ureu geli yfir pH sviðið 3-9.....	17
Mynd 7 Ósamfelldur Tricine-SDS-PAGE rafdráttur.....	18
Mynd 8 Westernþrykk trypsín sýna.....	19

Töflur

Tafla 1 Próteinstaðlar í IEF-rafdrætti.....10

Tafla 2 Einangrunartafla trypsíns úr skúflangavef færeysks þorsks.....12

Þakkir

Sérstakar þakkir fá Dr. Jón Bragi Bjarnason fyrir úthlutun þessa verkefnis, Dr. Bjarki Stefánsson fyrir ómælda hjálp og góðan félagsskap, Karen Ósk Pétursdóttir fyrir aðstoð við úrvinnslu gagna og Guðrún H. Jónsdóttir (Gígja mamma) fyrir almenna góðvild.

1 Inngangur

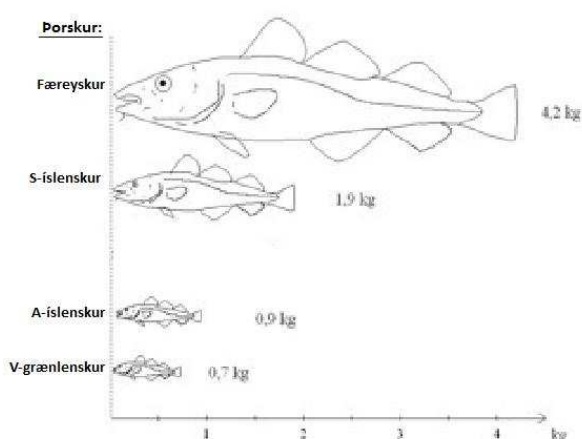
Á undanförunum árum hafa kuldakær ensím, einkum serín próteasar úr N- Atlantshafsþorski (*Gadus morhua*), verið rannsóknæfni Raunvísindastofnunar Háskóla Íslands. Dr. Jón Bragi Bjarnason, prófessor í lífefnafræði við Háskóla Íslands stofnaði fyrirtækið Ensímtæki ehf. sem sérhæfir sig í rannsóknum á kuldaaðlöguðum ensímum og í notkun þeirra í snyrtivörum og í húðáburði. Ensímtækni ehf. framleiðir PENZIM, húðáburð sem inniheldur trypsín einangrað úr þorski sem hefur djúpverkandi áhrif á líkamann.

Rannsóknir hafa leitt í ljós að virka efnið í PENZIM-áburðinum vinni á yfirborðspróteinum í frumum ónæmiskerfisins eins og CD4, CD8, CD54 og CD102 auk ýmissa annarra próteina á borð við málmpróteinasa og stýripróteina (e. cytokines). Mörg þeirra eru talin koma við sögu í sjúkdómum, s.s. bólgu, psoriasis, eczemi o.fl. (Ensímtækni 2010).

Nýlegar rannsóknir hafa leitt í ljós að PENZIM nýtist hugsanlega gegn sýkingum af völdum herpes veira og vinni bug á flensuafbrigðinu H3N2 og fuglaflensuafbrigðinu H5N1 á húð og *in vitro* (Kristinn Ingvarsson 2007).

Komið hefur í ljós við rannsóknir að færeyski þorsstofninn vex hlutfallslega hraðar í samanburði við aðra þorsstofna úr N-Atlantshafi; er bæði stærri og feitari (mynd 1). Af þeirri ástæðu er talið að trypsín færeyska stofnsins hafi háa hvötunargetu – jafnvel þá hæstu meðal þorsksstofna á norðurslóðum þar sem trypsín hefur hefur stórt hlutverk í fæðunýtingu þorsks og þannig vexti hans (Hóraldur Joensen 2009:1-2, 4-5).

Ef hægt væri með virkum hætti að sýna fram á að svo væri, þá væri trypsín færeyska þorskins tilvalið sem hið virka innihaldsefni í PENZIM.



Mynd 1: Samanburður á meðalþyngd fullvaxta þorsks í N-Atlantshafi (Hóraldur Joensen 2009:5).

1.1 Trypsín

Trypsín er sérín próteinasi sem finnst í meltingarvegi margra hryggdýra þar sem það vatnsrýfur prótein. Trypsín og aðrir sérín próteinasar tilheyra vatnsleysanlegum próteinum sem auðvelt er að draga út í buffer og þannig auðvelt að vinna með.

Miklar rannsóknir hafa verið gerðar á trypsíni spendýra og sömuleiðis trypsíni annarra hryggdýra og hryggleysingja (Bjarni Ásgeirsson 1989:85).

Trypsín er framleitt í óvirku formi (zymógen) sem trypsínógen í brisi og seytt út í meltingarveg líkamans. Við virkjun vatnsrýfur trypsín peptíðkeðjur karboxylmegin (C-enda) við basísku amínósýruleifarnar lýsín (K) og argínín (R) að því undanskildu að prólín (P) fari á undan þeim. Þannig er trypsín endópeptídasi þar sem klipping verður innan keðju en ekki á enda hennar. Það hefur neðst í hvarfstöð sinni neikvætt hlaðna amínósýru, D¹⁸⁹, sem styður að bindingu hinna jákvætt hlöðnu amínósýra lýsín og argíníns. Í hvarfstöð allra sérín próteinasa er að finna þrjár skautaðar amínósýrur sem mynda svokallaða hvötunarþrennd en þær eru His⁵⁷, Asp¹⁰² og Ser¹⁹⁵.

Við hreinsun á trypsíni er súluefnið *p*-amínóbenzamidín sem er sértækur hindri fyrir trypsín.

Þorskur í N-Atlanshafi (*Gadus morhua*) er þekktur fyrir að mynda margvísleg ísóform trypsíns, kölluð trypsín I, II og III (Bjarni Ásgeirsson 1989). Einnig hafa cDNA raðir af þorskatrypsíni (trypsin I, trypsin X and trypsin Y) verið einangraðar og raðgreindar (Ágústa Guðmundsdóttir o.fl. 1993).

2 Aðferðir

2.1 Prótein- og virknimæling

Virknimæling

Virknimælingar eru gerðar til þess að fylgjast með hvar og hve mikla ensímvirkni er að finna í vinnsluferli. Ef annaðhvort hvarf- eða myndefni efnahvarfs gleypa ljós á sýnilega eða útfjólubláa sviðinu er hægt að fylgjast með minnkun á styrk hvarfefna eða aukningu á styrk myndefna á tímaeiningu við ákveðna bylgjulengd.

Ef gleypnibreyting á styrk hvarf- eða myndefnis er þekkt má reikna út þá styrkbreytingu sem verður skv. Beer's lögmáli:

$$\frac{dA}{dt} = \varepsilon \cdot b \cdot \frac{dC}{dt}$$

þar sem dA/dt er gleypnibreyting á tímaeiningu, ε er eðlisgleypni efnisins, b er breidd kúvettu og dC/dt er styrkbreyting.

Ef gleypnibreyting hvarf- eða myndefnis er þekkt má ákvarða styrkbreytingu á tímaeiningu skv. Beer's lögmáli.

Ensímvirkni er gefin upp sem breyting á styrk hvarfefnis á tímaeiningu. Ein ensímeining (U) er yfirleitt skilgreind sem það magn ensíms sem breytir styrk hvarfefnis um 1 μ mól á mínútu.

Sértækt hvarfefni fyrir trypsín sem notað er í þessari rannsókn er benzoýl-glycine-proline-arginín-*p*-nitróanilíð (BA-GPR-*p*-NA) en með hjálp trypsín eyðist það hratt. Sérvirknin ræðst af hliðarkeðju argínin amínósýrunnar sem binst í hvarfstöð ensímsins (Bjarni Ásgeirsson 2009:10-11) sem síðan klippir af *p*-NA hópinn sem gleypir við bylgjulengdina 410nm (eðlisgleypni *p*-NA, $\varepsilon_{p-NA} = 8.800M^{-1}cm^{-1}$). Á þennan hátt má fylgjast með gangi hvarfsins með gleypnimælingu.

Mælingar á próteinstyrk

Við einangrun og hreinsun próteina er nauðsynlegt að geta mælt próteinstyrk lausna.

Algengasta aðferðin er aðferð Bradford's sem hefur þann kost að vera hröð og skilvirk, er einföld, næm og notar aðeins eitt hvarfefni. Hún byggist á því að amínóhópar próteina binda litarefnið coomassie-blue G-250 magnbundið. Ókostur aðferðarinnar er að prótein innihalda hlutfallslega mismarga amínóhópa.

Útgáfa Zaman og Verwilghen af mæliaðferð Bradford's er algengari í dag. Þar er litarefnið leyst upp í perklórsýru (HClO_4) í stað fosfórsýru (H_3PO_4) – þannig helst liturinn stöðugri við geymslu (Bjarni Ásgeirsson 2009:12-13).

Sem staðalprótein er nautgripaalbumín (e. bovine serum albumin, BSA) notað af þekktum styrk. Gleypni (A_{620}) er mæld og gildi dregin upp sem fall af próteinstyrk og styrkur lausna sem mæla á er fundinn út frá staðalferli BSA-lausna.

2.2 Jónaskiptaskiljun

Jónaskiptaskiljun er aðferð til að aðgreina efni eins og prótein eftir mismunandi hleðslu þeirra. Við aðgreiningu er notað sérstakt jónaskiptaefni úr óleysanlegu smákornóttu stoðefni yfirleitt úr sellulósa eða sykurfjölliðum. Jónaskiptaefni er hlaðið í gler- eða plastsúlu og er þakið jákvætt- (anjónaskiptir) eða neikvætt hlöðnum tengihópum (katjónaskiptir).

Talað er um sterka og veika jónaskipta. Sterkir jónaskiptar halda hleðslu sinni á breiðara pH-bili en veikir jónaskiptar og eru notaðir fyrir utan pH sviðið 4-9.

Í upphafi keyrslu eru hleðslur stoðefnis og próteins paraðar gagnjónum.

Gagnjónir þarf að losa (eða skipta út) af tengihóp til að binding próteins og stoðefnis verði möguleg.

Að velja bufferefni og stilla pH-gildi þess er mikilvægur þáttur. Sýrustig buffers hefur áhrif á hleðslu próteins, jónaskiptaefnis (ef það er veikt) og ef það er ekki nægilega vel stillt geta svokölluð Donnan áhrif myndast sem lýsa sér í myndun breytilegs pH þar sem hleðsluþéttleiki er mikill.

Losun af jónaskiljum getur farið fram með breytingu á pH-gildi og/eða saltstyrk skollausnar. Breytingar í saltstyrk er sú aðferð sem mest er notuð og er þá salstyrk breytt í þrepum eða með hallanda. (Bjarni Ásgeirsson 2009).

2.3 Rafdráttur

Rafdráttur (e. electrophoresis) er aðferð til að skilja að hlaðnar stórssameindir á borð við prótein og má nota til að greina prótein út frá mismunandi jafnhleðslugildi (pI) eða stærð (mólmassi) þeirra í þar til gerðum rafdráttarkerfum. Hugmyndafræði aðferðarinnar er að í

rafsviði ferðast hlaðnar agnir í átt að andstætt hlöðnu rafskauti. Ef rafdrátturinn er framkvæmdur í hentugu og gengdræpu stoðefni má að loknum rafdrætti festa og lita sameindir þar sem þær eru þá staddar í gelinu – þá fást einkennandi litarbönd fyrir þá sameindablöndu sem greind er.

Þegar gel úr polyacrýlamíði er steipt er lausn með acrýlamíði og krosstengjandi efni (bisacrýlamíði) blandað við bufferlausn og fjölliðun komið af stað. Með því að breyta styrk acrýlamíðs eða bisacrýlamíðs fást gel með mismunandi möskvastærð. Krosstengjandi efnið verður til þess að langar polyacrýlamíðkeðjur tengjast sín á milli í stóra sameind – gel.

Oft er persúlfat (ammoníum persúlfat, APS) notað til fjölliðunarhvötunar auk tertíer amíns (tetrametylétylen diamín, TEMED). Persúlfat og tertíer amín hvata myndun stakeinda.

Gellausn er síðan látin milli glerplatna þar sem hún hvarfast og úr verður hlaup.

Til að fylgjast með próteini í keyrslu er örlitlu af litarefni blandað í sýnin, t.d. brómóphenýl bláum.

Að rafdrætti loknum eru hlaup tekin úr tækinu og lituð með próteinlit eða sérvirkum litunaraðferðum sem gefa til kynna staðsetningu ákveðinna próteina í geli (Bjarni Ásgeirsson 200974-75).

Talað er um samfelld og ósamfelld rafdráttarkerfi. Í samfelldu rafdráttakerfi er sami buffer hafður í öllu kerfinu, í hlaupinu og efra og neðra kerfi. Ferðahraði próteina ræðst af stærð og hleðslu þeirra. Aðgreining byggist á því að stærri prótein eiga erfiðara með að troðast í gegnum þetta möskva pólýacrýlamíðs-hlaupsins, tefjast meira og ferðast því styttra. Jafnstór prótein aðgreinast eftir hleðslu.

Í ósamfelldum rafdrætti eru tvö misgljúp hlaup í sama plötukerfinu og þrjú mismunandi bufferar. Neðra hlaupið – aðgreiningarhlaupið er eins og hlaupin sem notuð eru við samfelldan rafdrátt. Efra hlaupið – þéttihlaupið hefur annað sýrustig en aðgreiningarhlaupið og búið til úr lausn með lægri acrýlamíðstyrk svo möskvarnir eru það stórir að þeir tefja ekki flæði sameinda. Próteinsýni er skammtað í brunna á efra hlaupi og efri buffer þar ofan á. Efri buffer inniheldur a.m.k. tvenns konar bufferjónir, for- og bakjón. Neðri bufferinn hefur yfirleitt svipaða samsetningu og sýrustig og sá sem er í aðgreiningarhlaupinu.

Þegar straumur er settur á kerfið ferðast sameindir inn í efra hlaupið. Hreyfanleiki annarra bufferjónarinnar, forjónar breytist er hún kemur í nýtt sýrustig þéttihlaupsins.. Afstæð jónasamsetning í þéttihlaupinu verður að forjón fer fyrst, þá prótein og síðast bakjón. Til að viðhalda jöfnum flutningi á hleðslum í þverskurði hlaupsins leitast jónir við að viðhalda þessari röð. Þannig þjappast próteinsameindir saman í fínt band milli for- og bakjóna.

Þegar þjappað sýnið berst inn í aðgreiningarhlaupið sem hefur annað sýrustig eykst hreyfanleiki bakjóna og þær færast gegnum próteinbandið. Útkoman verður fæst örfínt próteinband. (Bjarni Ásgeirsson 2009:74-77).

2.3.1 Jafnhleðslustilling

Við ákveðið sýrustig er nettó hleðsla próteins út á við engin, þ.e. jafnmargar jákvæðar og neikvæðar hleðslur eru fyrir hendi sem núlla hvor aðra út. Við önnur sýrustig er próteinið hlaðið. Við þetta ákveðna sýrustig er talað um jafnhleðslupunkt próteinsins stundum kallað ísóelektrískt pH (pI). Fyrir ofan pI gildi próteins er hleðsla þess neikvæð og fyrir neðan það jákvæð.

Við jafnhleðslustillingu er sýrustigshallandi í gelinu og prótein færast þar til þau koma að því sýrustigi sem samsvarar jafnhleðslugildi (pI) þeirra – þar stöðvast þau og mynda örmjótt band.

Til að mynda sýrustigshallanda er höfð súr lausn öðrum megin við hlaupið og basísk hinum megin. Í hlaupið er blandað amphóterískum buffersameindum, svk. amfólýtum sem hafa öll möguleg pK_a gildi. Þegar stöðugri rafspennu milli rafskauta er komið á kerfið raða þessar sameindir sér við pI-gildi sín og viðhalda þannig sýrustigshallanda.

Til að ná amfólýtum úr geli og koma í veg fyrir að þeir trufla litun banda eru gel þegin með þríklóredíksýru (e. trichloroacetic acid) (Bjarni Ásgeirsson 2009:87, Jón Bragi Bjarnason 2010).

Hægt er að ákvarða pI gildi próteina og ferðahraða á geli samkvæmt eftirfarandi jöfnum:

$$\text{Ferðahraði (R}_f\text{)} = \frac{\text{Vegalengd próteinbands}}{\text{Vegalengd fremsta bands}}$$

og

$$\text{pI} = aR_f + b$$

þar sem pI er jafnhleðslugildi, a er hallatala staðalferils, R_f er ferðahraði eða hlutfallið milli færslu próteinbands og heildarlengd gels og b er skuðpunktur við y-ás.

2.3.2 Tricine-SDS-PAGE

Tricine-SDS-PAGE er ósamfellt rafdráttarkerfi og er almennt notað til aðgreiningar próteina á stærðarsviðinu 1-100kDa og hentar vel fyrir prótein <30kDa að stærð.

Jöfn Tricine-SDS gel aðgreina vel á litlu massasviði; 10% gel aðgreina prótein á bilinu 1-100kDa og 16% gel á bilinu 1-70kDa (Hermann Schägger 2006:16).

2.4 Litunaraðferðir

Margar aðferðir hafa verið notaðar til að lita stórsameindir í rafdráttargelum. Litun með coomassie brilliant blue R-250 er ein algengasta litunaraðferðin. Oftast er liturinn leystur í þríklóróediksýru (TCA) eða metanól- ediksýru vatnsblöndu. Hlaup eru höfð í litnum í 1-2klst (eða lengur) og síðan aflituð í samskonar lausn án litarefnisins. Litstyrkur próteinbanda er ekki endilega í réttu hlutfalli við próteinstyrk þeirra þegar litað er (Bjarni Ásgeirsson 2009:82).

2.5 Westernþrykk

Eftir rafdrátt og litun próteinbanda má nota ákveðna aðferð – mótefnisþrykk, sem byggir á því að nota sérhæfð mótefni gegn ensíminu sem sóst er eftir, til að kanna hvort það ensím, sem stóð til að einangra, sé til staðar í sýni og hvar á rafdráttargeli það er staðsett.

Með rafdrætti eru prótein flutt - þeim er þrykkt, úr geli á annað stoðefni (oft nítrusellulósa) og þar binst mótefni mótefnisvaka. Himnan er síðan þvegin til að fjarlægja óbundin mótefni. Mjólkurprótein eða bovine serum albumin (BSA) er oft notað til að hindra ósértæka bindingu mótefna við himnuna. Himnan er síðan látin liggja í lausn með sértæku mótefni gegn því próteini (eða ensími) sem skoða á.

Lykillinn að mótefnisþrykki felst í sértækni mótefnis sem rannsakandi hefur undir höndum. Mótefni geta verið ein- eða fjölstofna. Fjölstofna mótefni eru ekki eins sértæk og ekki eins dýr og einstofna mótefni.

Litun aðferðarinnar byggir á tveimur tengiskrefum með mótefnum, 1° og 2° mótefnum. 1° mótefni (e. primary antibody) er sértækt gegn mælipróteininu en 2° mótefni (e. secondary antibody) tengist á almennan hátt þeim flokki mótefna sem fyrra mótefnið tilheyrir. Á seinna mótefninu hanga ensím, t.d. alkalískur fosfatasi eða flúrljómandi smásameindir sem tengdar eru við F_C hluta mótefnissameindar. Ensímin mynda ljósmerki þegar þau er sett í ákveðna lausn og efnahvörf fara af stað sem skilja eftir sig sjáanlega afurð - próteinbönd (Bjarni Ásgeirsson 2009:67).

3 Efni

Efni notuð frá Sigma: *p*-amínóbenzamidín-Agarósa súluefni, kalsíum klóríð (CaCl_2), Tris, natríum klóríð (NaCl), etanól, metanól, sértækt hvarfefni fyrir trypsín BA-GPR-*p*-NA, nautgripaalbúmín (bovine serum albumin, BSA), coomassie-brilliant blár R-250 litarefni, þvagefni (urea, $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$), DTT (dithiothreitol), brómóphenýl blár (e. bromophenyl blue), metýl rauður (e. methyl red), acrylamíð/bisacrylamíð, ammoníum persúlfat (APS), TCA (trichloroacetic acid) og próteinstaðlar (carbonic anhydride, mýóglóbúlín, β -laktóglóbúlín).

Efni notuð frá Fluka: amfólýtar, glýseról, TEMED (tetrametýletýlendíamín)

Efni notað frá BDH Laboratory Reagent: þíóþvagefni (thiourea, CSN_2H_4)

Efni notuð frá Merck: saltsýra (HCl), etanólamín (ETA), sulfosalicylic sýra (SSA) molybdate, succinic sýra, fosfórsýra (H_3PO_4)

Efni notuð frá Across organic: natríum oxalat ($\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$)

Efni notuð frá Riedel-de Haën: ediksýra (CH_2COOH)

Efni notuð frá Thermo Scientific: CHAPS

Efni notuð frá Appli chem. pýrógallol rauður (e. pyrogallol red)

4 Framkvæmd

4.1 Einangrun og hreinsun

Um $\frac{1}{2}$ kg af skúflangavef og innyflum þorsks (*Gadus morhua*) veiddum við Suðurey í Færeyjum voru send til Háskóla Íslands til frekari hreinsunar og greiningar.

Hreinsunarferli fór fram við $\sim 4^{\circ}\text{C}$.

Skúflangavefur var lagður í útdráttarlausn (100mM Tris, 20mM CaCl_2 pH 8,2), látinn þiðna og aðskilinn frá öðrum innyflum þorskins. Sýni spunnið niður í skilvindu (x2) við 10.000rpm í 30mín. Sýrustig jafnað með NaOH að pH 8,0. Hrat skilið frá, floti safnað og fita fjarlægð með filtrun. Sýni keyrt á sértækri *p*-amínóbenzamidín-Agarósa skilju jafnaðri með jöfnunarbuffer (100mM Tris, 20mM CaCl_2 pH 8,2) á flæðihraða $\sim 3 \text{ mLmín}^{-1}$. Súla skoluð með jöfnunarbuffer, gegnumflæði safnað og gleypni (A_{280}) mæld þar til stöðugu gildi var náð. Ósértækt bundin efni losuð með þvottabuffer (25mM ediksýra, 20mM CaCl_2 pH 5,0). Sértækt bundin efni (trypsín) losuð með losunarlausn (25mM ediksýra, 20mM CaCl_2 pH 3,0) og safnað í söfnunarlausn (200mM Tris, 20mM CaCl_2 pH 8,5). Gleypni (A_{280}) mæld reglulega.

Að lokum gengið frá súlu á videigandi hátt með skollausn (10mM HCl, 1M NaCl pH 2,0), afjónuðu vatni (dH_2O) og að síðustu geymslulausn (25% etanól, 0,1M NaCl pH 7,5).

Lokasýni var skipt til helminga og geymt í kælikáp; annar helmingur sýnis geymdur í 50% glýseróli við -25°C og hinn frystur í köfnunarefni (N_2) og geymdur við -25°C .

Til samanburðarmælinga voru fengin tilbúin trypsínsýni (ZPX 3007 í súlukeyrslu og ZMP 3001 á gel) af rannsóknastofu Dr. Jóns Braga Bjarnasonar frá Ensímtækni ehf. unnið úr íslenskum þorski veiddum í N-Atlantshafi.

4.2 Jónaskiptaskiljun

Trypsín sýni keyrt á MonoQ 5/5 jónaskiptasúlu sem var tengd við Äkta hreinsi (e. Äkta purifier) frá Pharmacia Biotech með Unicorn hugbúnaði. Súlan var jöfnuð með buffer A (20mM Tris, 3mM etanólamín, 10mM CaCl_2). Notaður var 0-650mM NaCl saltstigull á flæðihraðanum $1 \frac{\mu\text{mol}}{\text{min}}$ til að losa prótein af súlu.

4.3 Virknimæling

Virknimælingar fyrir trypsín voru gerðar með hvarfefnislausn BA-GPR-*p*-NA sem og 100mM Tris, 5mM CaCl_2 (pH 8,0) sem buffer. Hver ensímeining var ákvörðuð sem vatnsrof á $1 \frac{\mu\text{mol}}{\text{min}}$ af hvarfefni.

Innihald plastkúvettu (940 μ L buffer, 10 μ L hvarfefnislausn) var blandað vel saman með plasthræru og leyft að ná jafnvægi við 25°C í að a.m.k. 3 mín. áður en 50 μ L af sýni sem innihélt 0,25-1,05 μ M var bætt út í. Þau sýni sem féllu utan línulegs mælisviðs voru þynnt. Virkni mældist á bilinu 0,2-0,9 U mL^{-1} . Ultrospec 4000 ljósgleypnimælir (frá Pharmacia Biotech) var notaður til mælinga. Mælt var við 410nm.

4.4 Próteinmæling

Styrkur trypsíns var ákvarðaður með gleypnimælingu (A_{620}) með því að nota Beer's Lambert lögmálið ($A = \epsilon bc$) og próteinstyrkur ákvarðaður með aðferð Zaman og Verwilche með BSA sem staðalprótein. Gleypni var mæld með Ultraspec 4000 gleypnimæli tengdum við tölvu með SWIFT II hugbúnaði (frá Pharmacia Biotech).

4.5 Jafnhleðslustilling

Gel (1,5mm að þykkt) voru steipt í Mighty-Small II SE250 kerfi frá Hoefer sem innihéldu 6% acrylamíð, 0,2% bis-acrylamíð, 8M þvagefni, 0,4% amfólýta, 1% CHAPS, 0,01% APS og 0,001% TEMED. Gel voru sett í rafdráttarker með 10mM fosfórsýru í neðra hólfi og 25mM Tris í efra hólfi. Próteinsýni, próteinstaðlar og einangruð trypsínsýni, voru blönduð við sýnabuffer (7M urea, 2M thiourea, 2% CHAPS, 0,8% amphólýtar (pH 3-10), 50mM DTT, 4% glýseról, snefill af brómóphenól bláum) og sýnum hlaðið í brunna. Rafdráttur fór fram við 200V í 30mín; 500V í 15mín; 750V í 15mín og að lokum 1000V í 75mín með spennugjafa frá Hoefer. Meðan á keyrslu stóð var rafdráttarker lagt í vatnsbað (~23°C) til kælingar, segull settur í neðri bakka kers og lagt á segulhræru (Jeffrey C. Anderson 2008: 881-885).

Gelin voru lituð með coomassie-blue R-250 lit.

Í rafdrætti voru prótein með þekkt pI gildi notuð sem staðalprótein. Sjá töflu 1.

Tafla 1: Próteinstaðlar í IEF-rafdrætti.

pI gildi í svipmótuðu- og afmynduðu ástandi staðalpróteina*

Próteinstaðall	Uppruni	pI (svipmótað prótein)	pI (afmyndað prótein)
Mýóglóbúlín	Hjartavefur hests	6,9-7,4	7,4-8,3
Karbonic anhýdrasi	Blóðkorn nautgripa	6,0	7,3
Cýtócróm C	Hjartavefur hests	10,7	9,8
Glúkósa oxídasi	<i>Aspergillus niger</i>	4,2	5,5
Trypsín hindri	Soyjabaunir	4,5	5,0
β -laktóglóbúlín	Mjólk nautgripa	5,3	5,80
Amýlóglúkósíðasi	<i>Aspergillus niger</i>	3,8	4,80

*Upplýsingar fengar frá SERVA (Þýskaland) úr "Isoelectric Focusing in the Presence of Urea Application to 2D Electrophoresis"

4.6 Tricine-SDS-PAGE

Unnið samkvæmt verklýsingu Hermanns Schägger um Tricine-SDS-PAGE rafrátt í greininni *Tricine-SDS-PAGE*.

4.7 Mótefnisþrykk

Unnið samkvæmt verklýsingu GE Healthcare í bæklingnum Amersham ECL Plex Western blotting system um Westernþrykk. Til að flytja sýni yfir á himnu var stuðst við leiðbeiningar frá BIO-RAD í hefti um Trans-Blot[®] Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell. Notað var peptíðmótefni hannað gegn C-enda þorska trypsíns I og X ((NH₂-)CVLSGWVRDTMA (-COOH)).

4.8 Botnfelling þunnra sýna fyrir jafnhleðslustillingu

Unnið samkvæmt verklýsingu úr greininni *Precipitation of Dilute Chromatographic Samples (ng/ml) Containing Interfering Substances for SDS-PAGE* eftir Roberto M. Aguilar et. al.

5 Niðurstöður og umræða

5.1 Einangrun og hreinsun

Yfirlit yfir einstök skref hreinsunarferlis á trypsíni úr færeyskum þorski má sjá í töflu 2. Það ber að taka fram að mæling á virkni- og próteinmæla gegnumflæði af súlu við þvott fyrst fyrir.

Tafla 2: Einangrunartafla trypsíns úr skúflangavef færeysks þorsks.

Yfirlit yfir einstök skref hreinsunarferlis trypsíns.

Til virknimælinga var vatnsrof trypsíns á sértæka hvarfefninu BA-GPR-pNA mælt (A_{410}) við $\sim 25^{\circ}\text{C}$.

Til ákvörðunar á próteinstyrk var aðferð Zaman og Verwilghen notuð með BSA sem staðalprótein (A_{620}).

Skref	Rúmmál (V) [mL]	Styrkur (C) [$\frac{\text{mg}}{\text{mL}}$]	Virkni (V) [$\frac{\text{U}}{\text{mL}}$]	Heildar- eining (U) [U]	Massi (m) [mg]	Eðlisvirkni (E) [$\frac{\text{U}}{\text{mg}}$]	Heimtur (%) [%]	Hreinsun (x) [x]
Upphafssýni eftir 10.000rpm spuna (x2) í 30mín og síun keyrt á sértækri p-amínóbenzamidín-Agarósa súlu.	250	0,65	27,5	6.875	162,8	42,2	100,0	1,0
Gegnumflæði upphafssýnis af p-amínóbenzamidín-Agarósa súlu.	230	0,43	0,50	113,9	98,4	1,2	1,7	0,0274
Skolunarbuffer látinn á á p-amínóbenzamidín-Agarósa súlu og gegnumflæði safnað og mælt.	125	0,21	0,20	25,6	26,1	1,0	0,4	0,0232
Losunarlausn látin á p-amínóbenzamidín-Agarósa súlu og sýni safnað í söfnunarlausn og mælt.	42,0	0,15	58,8	2.470	6,3	389,4	35,9	9,23

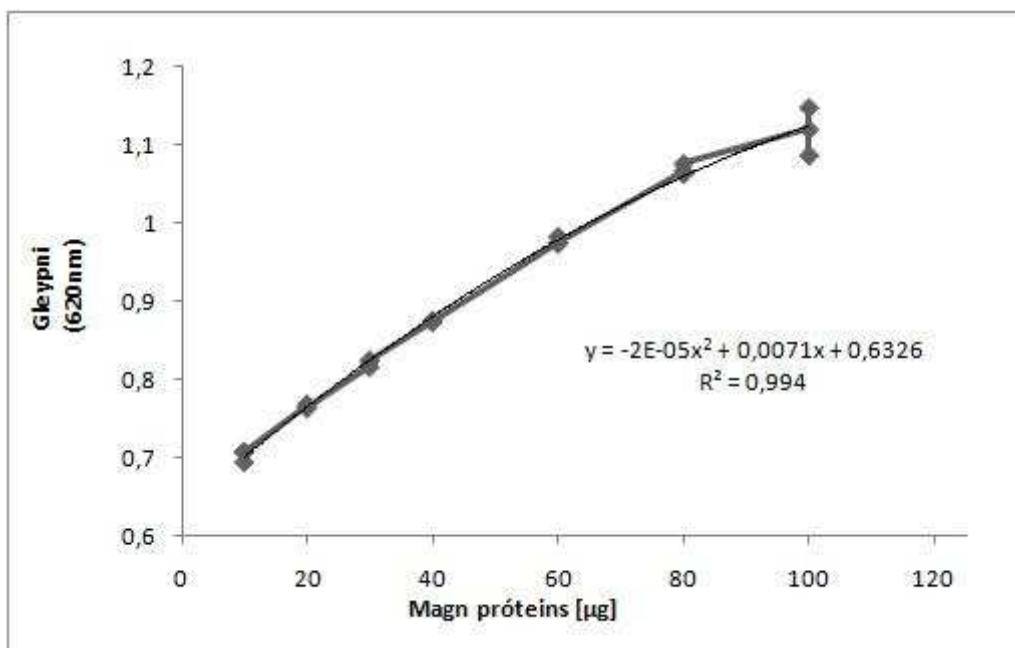
Af töflu 2 má sjá að heildarhreinsun trypsíns úr skúflangavef færeysks þorsk er u.þ.b. 9-föld og heimtur um 36%. Litlar heimtur má t.d. útskýra með því að buffervirkni hafi ekki verið nægilega góð. Slíkt gæti eyðilagt viðkvæmt ensímið. Í hverju skrefi hreinsunarferlis

verður alltaf tap á efni. Sömuleiðis getur verið að hluti ensíms hafi afmyndast við sýrulosun og jafnframt má vera að eitthvað ensím hafi orðið eftir á súlu við losun. Melta og sjálfmelta ensíma geta einnig skýrt lágur heimtur, þ.e. niðurbrot á trypsíni við hreinsun.

Í lokaskrefi mælist hæsta ensímvirknin sem og eðlisvirkni eins og við var búist. Lág virkni og lítill próteinstyrkur mælist í milliskrefunum sem voru m.a. til þess fólgin að losa efni sem bundin voru ósértækt súlu og því ekki nema von að mælingar sýni lág gildi. Heildarfjöldi ensímeinga mælist töluvert lægri í lokaskrefi hreinsunar en í byrjun en það má skýra með því að í vatnsúrdrætti upphafi hafi verið form ensíms sem bindast súlu ekki vel þó þau virki á hvarfefnið.

5.2 Próteinmæling

Dreginn var upp BSA-próteinstaðalferill til ákvörðunar á magni próteina í trypsínsýnum. Jafna ferils í gegnum gögn er notuð til ákvörðunar á próteinmagni- og styrk í sýnum, þar sem y er gleypni við 620nm og x er magn próteins. Sjá mynd 2.



Mynd 2: BSA-próteinstaðalferill.

Til magngreiningar próteinsýna.

Gleypni mæld ($\times 3$) við 620nm á móti ákveðnu magni af BSA-próteinstaðli að þekktum styrkleika.

Af mynd 2 má sjá:

- jöfnu BSA-staðalferils: $y = 2 \cdot 10^{-5} x^2 + 0,007x + 0,6326$ ($R^2 = 0,994$)

þar sem y er gleypni (v. 620nm) og x er magn próteins.

5.3 Jónaskiptaskiljun

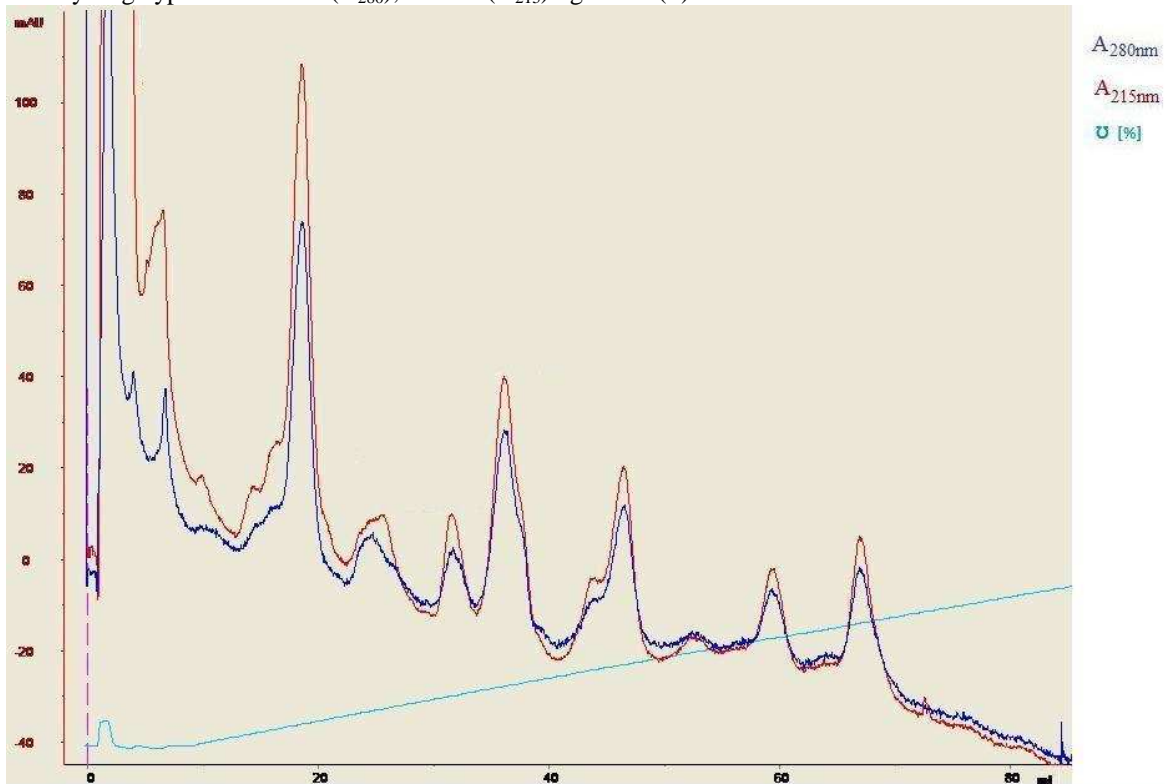
Trypsín úr færeyskum þorski sem búið var að einangra á sértækri *p*-amínóbensamidín-Agarósa skilju og frysta í nitri (geymt við -25°C) var keyrt á jónaskiptaskilju. Fyrir keyrslu var sýrustig sýnis aðlagð að pH $\sim 9,1$ með 0,1M NaOH. Sjá niðurstöðu keyrslu á mynd 3.

Mynd 3: Keyrsla trypsín sýnis úr færeyskum þorski á jónaskiptaskilju.

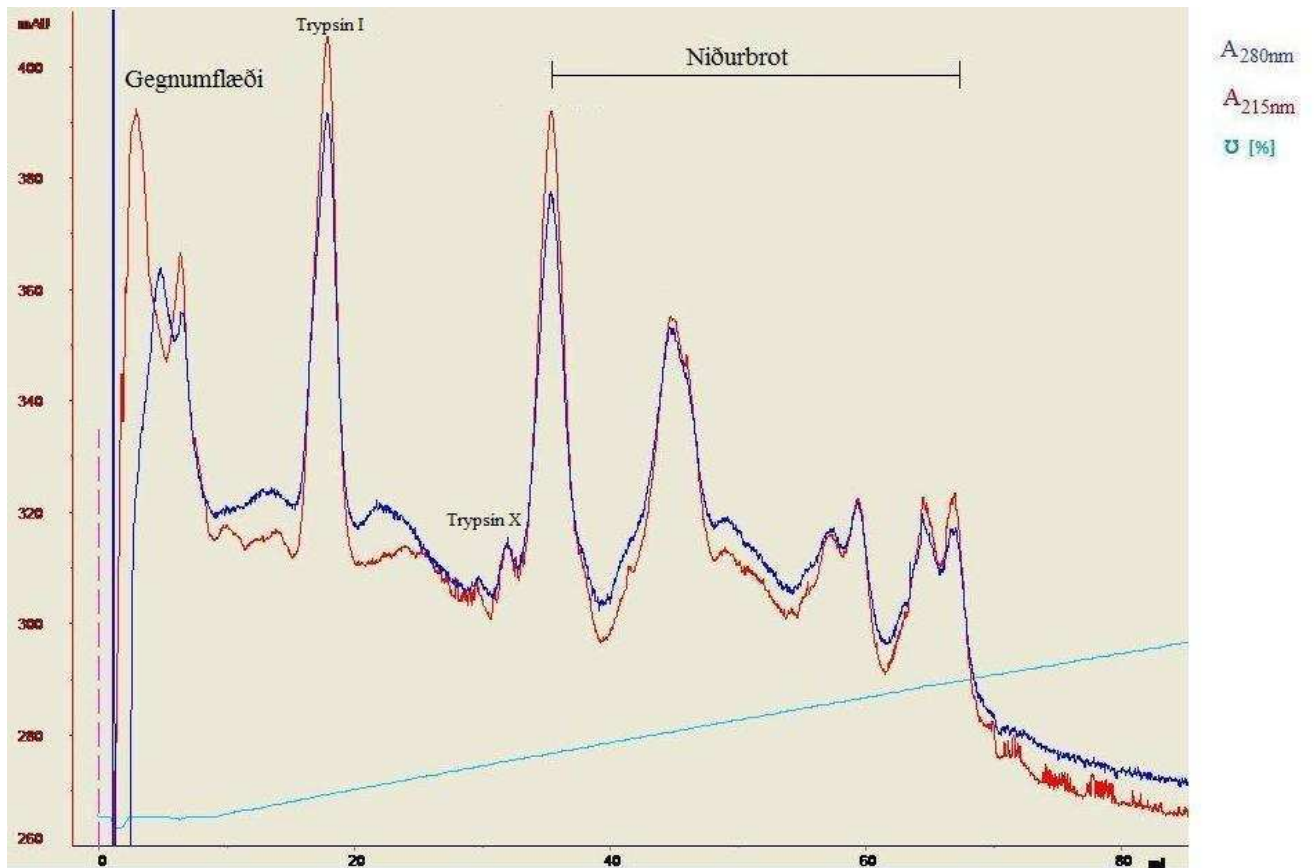
Notast var við óþynnt sýni sem fryst hafði verið fryst í N_2 og geymt við -25°C .

Sýni var jafnað að pH $\sim 9,1$ fyrir keyrslu.

Graf sýnir gleypni við 280nm (A_{280}), 215nm (A_{215}) og leiðni (\square) á móti flæðirúmmáli.



Til samanburðar var trypsín úr íslenskum þorski (ZMP) sem búið var að einangra og geyma til helminga við glýseról keyrt í hlutföllunum 1:1,5 við buffer A á jónaskiptaskilju. Fyrir keyrslu var sýrustig sýnis jafnað að pH $\sim 9,1$ með 0,1M NaOH. Sjá niðurstöður keyrslu á mynd 4.



Mynd 4: *Keyrsla trypsín sýnis úr íslenskum þorski á jónaskiptaskilju.*

Hlutföll notuð við súlukeyrslu 1:1,5 (trypsín:buffer A).

Sýni var jafnað að pH ~9,1 fyrir keyrslu.

Graf sýnir gleypni við 280nm (A_{280}), 215nm (A_{215}) og leiðni (σ) á móti flæðirúmmáli.

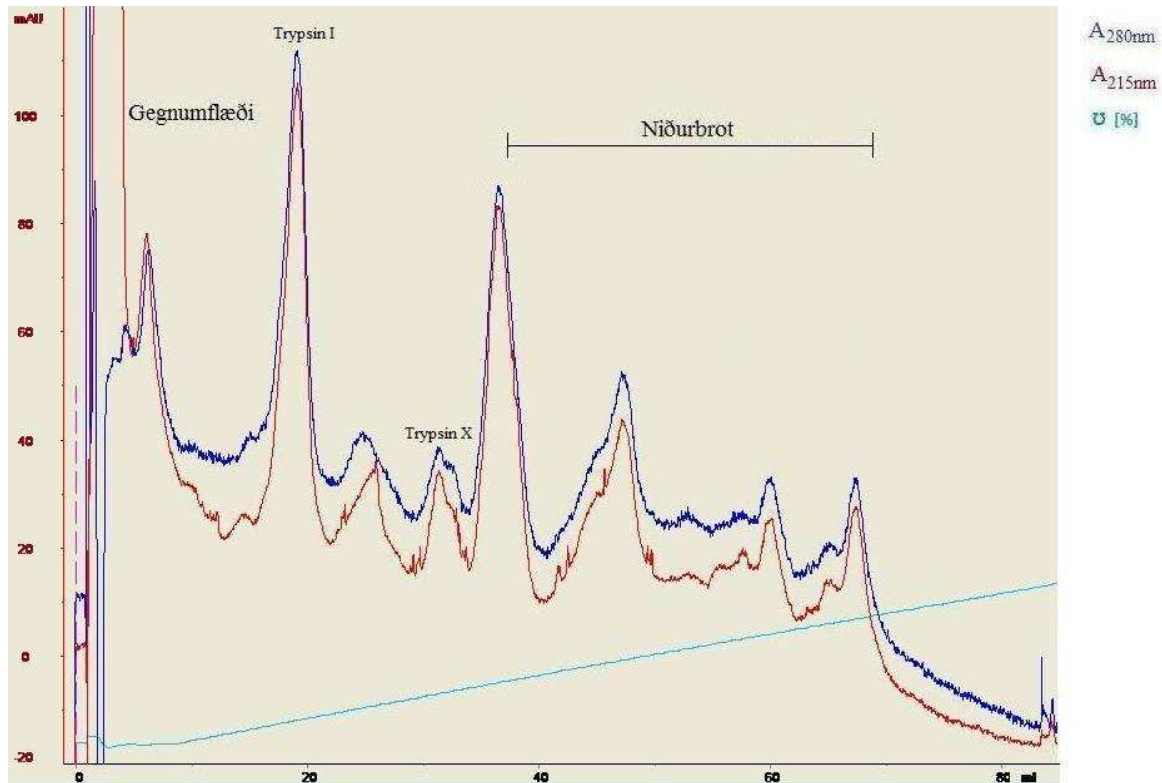
Á mynd 4 er merkt inn á það sem fyrri niðurstöður rannsókna með SDS-PAGE og massageiningu á tilraunastofu Jóns Braga Bjarnasonar (óútgefið efni) hafa leitt í ljós að merktir toppar trypsín I og trypsín X innihaldi eingöngu þau ísóform trypsíns auk þess að toppar merktir niðurbrot séu afurðir niðurbrots vegna meltu og sjálfmeltu ensíma sem gæti átt sök á því að trypsín sé klippt niður í búta og sést sem misstórir toppar á grafi.

Af myndum 3 og 4 má sjá að áberandi toppar fást á sama stað, við ~19mL annars vegar og ~30mL hins vegar sem gefur til kynna að þeir innihaldi þau ísóform ensímsins sem áður voru nefnd (trypsín I og X) þó ekki hafi það verið staðfest.

Glögg auga greinir að toppar súlukeyrslu eru misháir, þ.e. mismikil gleypni mælist í sýnunum og að fjórfalt hærri gleypni (A_{280} og A_{215}) mælist hjá trypsíni I úr íslenska þorskinum miðað við samsvarandi topp hjá þeim færeyska, eða 400mAU og 100mAU. Það má skýra út frá mun á þéttleika sýnanna. Próteinstyrkurinn í sýninu með trypsíni úr íslenska þorskinum var mun hærri en sýnið sem innihélt trypsín úr færeyska þorskinum. Próteinstyrkur sýnis úr íslenska þorskinum (ZMP) var ekki mældur sérstaklega en niðurstöður súlukeyrslu gefa glögglega til kynna styrkleikamun. Próteinstyrk trypsíns úr færeyska þorsksins má sjá í töflu 2.

Trypsín úr færeyskum- og íslenskum þorski sem var blandað saman í hlutföllunum 1:1, (íslenskur:færeyskur) en áður var búið að þynna sýni íslenska þorsksins í hlutföllunum

1:1,5 (trypsín:buffer). Gripið var til þessa ráðs til að þess að fá nokkurn veginn sama styrk próteins í blöndu en eins og áður segir var um nær fjórfaldan styrkleikamun á sýnum að ræða. Fyrir keyrslu var sýrustig trypsínsýnablöndu jafnað að pH ~9,1 með 0,1M NaOH. Sjá niðurstöður keyrslu á mynd 5.



Mynd 5: Keyrsla trypsín sýna saman á jónaskiptaskilju.

Færeyskur og íslenskur þorskur saman. Hlutföll notuð við súlukeyrslu 1:1 (trypsínblanda:buffer A). Búið var að þynna trypsín sýni 1:1,5 (trypsín:buffer A) við buffer fyrir blöndun.

Sýni var jafnað að pH ~9,1 fyrir keyrslu.

Graf sýnir gleypni við 280nm (A_{280}), 215nm (A_{215}) og leiðni (\square) á móti flæðirúmmáli.

Niðurstöður keyrslu sem sýnd er á mynd 5 gefa til kynna að það sé sama prótein í toppinum sem er merktur fyrir trypsín I á báðum sýnum. Það sama virðist eiga um trypsín X. Það undirstrikar það sem á undan var sagt (af mynd 3 og 4) að toppar innihaldi að öllum líkindum sömu ísóform ensíms (trypsín I og X) þó það hafi ekki verið staðfest frekar.

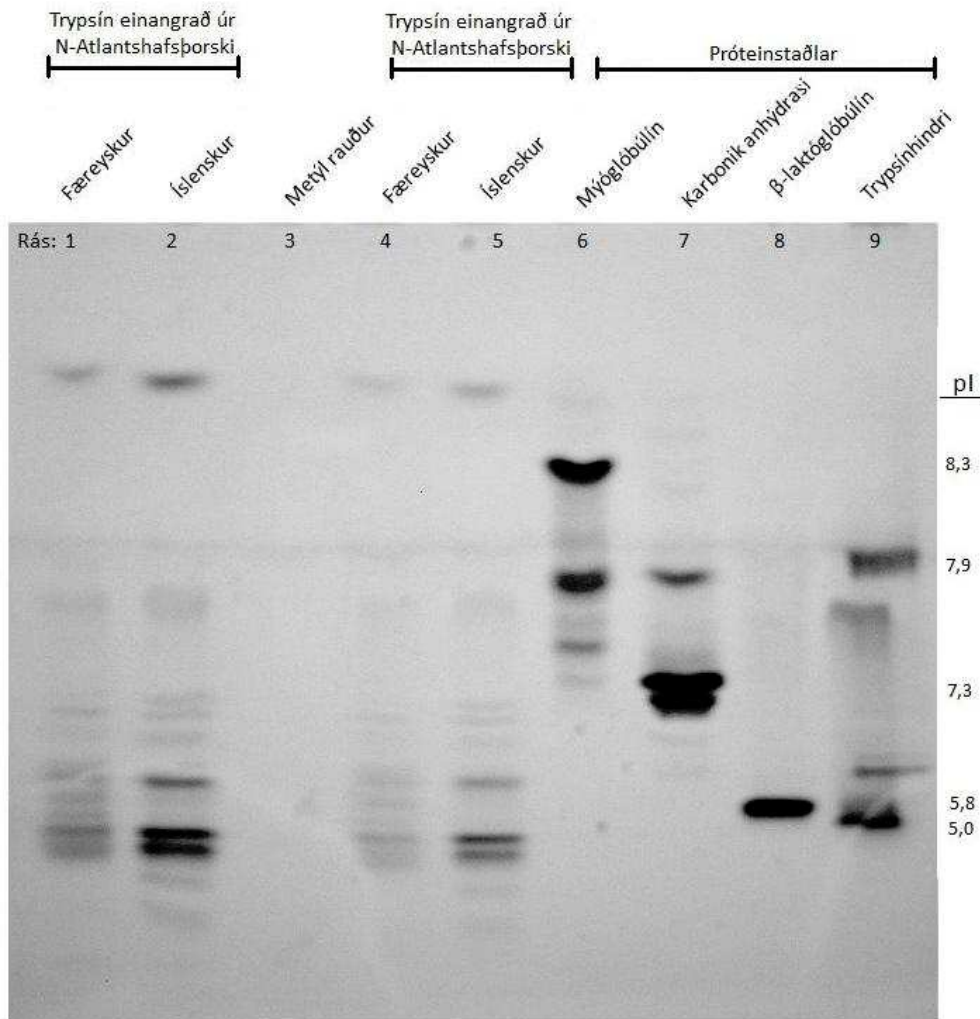
5.4 Jafnhleðslustilling

Jafnhleðslustilling var framkvæmd með rafdrætti á trypsín sýnum úr færeyskum- og íslenskum þorski auk staðalpróteina (sjá pI gildi í töflu 1). Sýni keyrð á urea geli og lituð með coomassie-bláum að rafdrætti loknum. Sjá niðurstöður á mynd 6.

Mynd 6: IEF-rafdráttur í urea geli yfir pH sviðið 3-9.

Í rásum 6-9 eru staðalprótein með þekkt pI gildi: mýóglóbúlín (pI 8,3); karbonik anhydrazí (pI 7,9;7,3); β -laktóglóbúlín (pI 5,8 (pI 5,6 ekki sýnt)); trypsínhindri (pI 5,0).

Í rásum 1 og 4 trypsín úr færeyskum þorski og 2 og 5 trypsín úr íslenskum þorski.

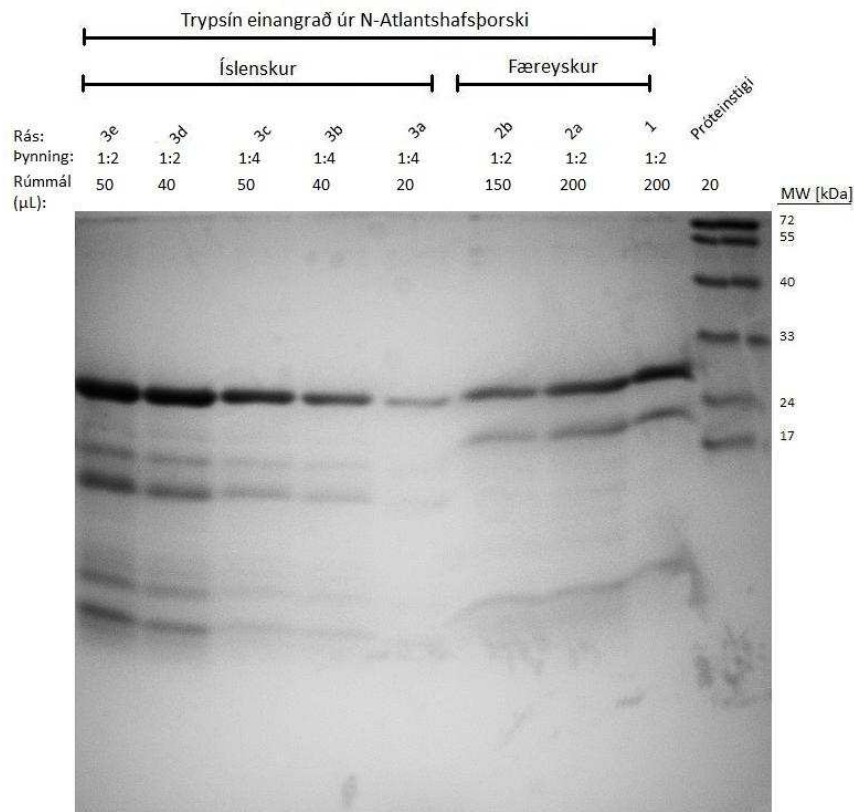


Af mynd 6 sem sýnir jafnhleðslurafdrátt trypsín sýna úr íslenskum og færeyskum þorski á urea geli má sjá að próteinbönd koma á sama stað í sýnunum tveimur. Bæði sjást mismunandi ísóform ensímanna og niðurbrotsafurðir. Efsta bandið í rásum trypsín sýna (rásir 1,2,4 og 5) er mögulega basísk niðurbrotsafurð.

Styrkleikamunur á lit samsvarandi próteinbanda hjá færeyskum- og íslenskum þorski má rekja til þess að sýni úr íslenskum þorski var með hærri próteinstyrk. Próteinstyrkur trypsín í íslenska þorskinum mældist $0,544 \text{ mg/mL}$ og $0,151 \text{ mg/mL}$ í þeim færeyska.

5.5 Tricine-SDS rafdráttur

Tricine-SDS-PAGE rafdráttur var notaður til ákvörðunar á mólmassa trypsíns úr færeyskum- og íslenskum þorski. Hreinsað trypsín sýni úr færeyskum þorski, geymt til helminga í glýseróli og fryst í nitri (sýni geymd við -25°C) og hreinsað sýni úr íslenskum þorski voru keyrð á geli. Til hliðsjónar var próteinstigi (PageRuler™) frá Fermentes notaður til stærðarviðmiðunar. Sjá niðurstöður á mynd 8.



Mynd 7: Ósamfelldur Tricine-SDS-PAGE rafdráttur.

Til mólmassaákvörðunar á trypsíni úr færeyskum- og íslenskum þorski. Próteinstigi (PageRuler™) til stærðarviðmiðunar.

Í rás 1: trypsín úr færeyskum þorski blandað við glýseról (50:50); rásir 2a-b: trypsín úr færeyskum þorski fryst í nitri; rásir 3a-e: trypsín úr íslenskum þorski blandað við glýseról (50:50).

Pynningar og mæld rúmmál í brunna sýnd.

Af mynd 7 má sjá að aðal bandið í báðum sýnum er á sama stað á geli, við um 26kD, sem er sambærilegt við fyrri niðurstöður. Fyrri niðurstöður mólmassaákvörðunar á trypsíni með rafdrætti gefa mólmassa um 24kDa (Bjarni Ásgeirsson o.fl. 1989:88). Skýringar á þessum mun á milli fyrri niðurstaðna og hér stafa mögulega af því að mismunandi próteinstaðlar og mismunandi rafdráttaraðferðir voru notuð (Tricine SDS PAGE og Laemmli rafdráttur). Í sýnunum tveimur sjást bönd á sama stað en þó virðist próteinmagnið vera mismunandi þegar próteinböndin eru borin saman innan sýnanna. Bandið í færeyska trypsín sýninu um 22kDa sést líka í íslenska sýninu við háan styrk. Hugsanlega er þetta niðurbrotsafurð sem að er síðan brotin enn frekar niður. Það ferli gæti hafa verið komið lengra í íslenska sýninu þar eð það var eldra en hið færeyska

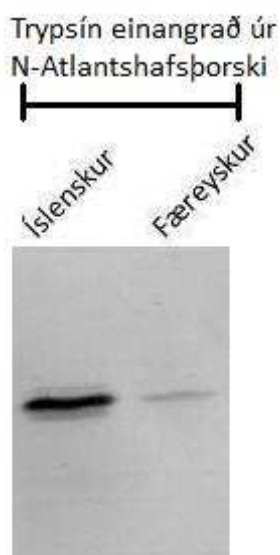
Ástæðan fyrir því að aðalbandið í rás 3a er ekki á nákvæmlega sama stað og sambærileg bönd í hinum rásunum er líklega vegna þess að mun minna próteinmagn er í rás 3a. Munurinn gæti líka stafað að því að keyrð var trypsínblanda en ekki einangruð ísóform trypsíns áður en rafdráttur var framkvæmdur eins og í þeirri tilraun sem vísað er í þar sem mólmassi var ákvarðaður 24kDa.

Ef vel er rýnt í gel á mynd 7 sjást bönd á sama stað við 17kDa og 15kDa í báðum sýnum en það er erfitt að dæma um minnstu böndin því skerpan er lítil fyrir bönd í færeyska trypsín sýninu.

Tricine-gel hefur þann ókost fram yfir IEF-gelið að það er „brosandi“ sem truflar aðeins túlkun niðurstaða.

5.6 Western-þrykk

Sýni úr íslenska og færeyska þorskinum voru keyrð á IEF-geli færð yfir á himnu og þreifufð með mótefni sem binst trypsin I og trypsin X.. Sjá niðurstöður á mynd 9.



Mynd 8: Westernþrykk trypsín sýna úr íslenskum og færeyskum þorski.

Notað var peptídmótefni hannað gegn C-enda þorska trypsíns I og X ((NH₂-) CVLSGWVDRDTMA (-COOH)).

Af mynd 8 kemur í ljós að bönd koma á nákvæmlega sama stað í rásinni, þ.e. renna á sama stað. Bandið sem sést í báðum rásunum er líklega trypsin I þar sem það er í mestu magni a.m.k. í trypsín sýni íslenska þorsksins og veiku böndin sem sjást hjá íslenska þorskinum eru líklega bönd fyrir trypsin X þó ekki hafi það verið staðfest. Band fyrir trypsíns úr íslenskum þorski er dekkra sem stafar af því að sýnið var hlutfallslega þéttara en samsvarandi sýni úr færeyskum þorski eins og áður segir.

6 Lokaorð

Markmið þess verkefnis sem hér hefur verið til umræðu var að athuga hvort sýna mætti fram á mun með lífefnafræðilegri greiningu á trypsíni einangruðu úr N-Atlantshafs (íslenskum)- og færeyskum þorski.

Kveikjan að verkefninu var að komið hefur í ljós við rannsóknir að færeyski þorskstofninn er feitari og stærri samanborið við aðra þorsksstofna í N-Atlantshafi. Með það að leiðarljósi var trypsín einangrað úr skúflangavef þorsks veiddum við strendur Færeyja borið saman við trypsín úr íslenskum þorski. Sýni voru keyrð á MonoQ-jónaskiptasúlu í sitt hvoru lagi og saman, keyrð saman á IEF- og Tricine-SDS-PAGE geli og að lokum voru prótein færð yfir á himnu eftir rafdrátt þar sem sérhannað mótefni var tengt við þau eftir Westernþrykk.

Á súlukeyrslu kom í ljós að toppar sem fyrri niðurstöður hafa leitt ljós að innihaldi ákveðin ísóform trypsíns sjást einnig í súlukeyrslu á trypsínsýni úr færeyskum þorski við sömu aðstæður, próteinbönd á IEF-geli koma á sama stað og niðurstöður úr keyrslu Tricine-SDS-PAGE gels gefa sömu niðurstöður og að lokum sýnir Westernþrykk sömu niðurstöður.

Niðurstöður fengar við þessa rannsókn gefa því til kynna að trypsín einangrað úr íslenskum og færeyskum þorski eru eins.

Frekari rannsóknir á viðfangsefninu til staðfestingar á fyrri niðurstöðum væru t.d. að keyra 2D gel sem gefur betri aðgreiningu en IEF-gel sem einnig sýnir niðurbrotsafurðir ensíms, ýmsar hraðafræðilegar mælingar, ákvörðun amínósýruraða, einangrun og raðgreining DNA raða trypsíns úr færeyskum þorski. Aukin heldur mætti bera saman stöðugleika trypsín færeyska þorsksins við þann íslenska hvað varðar pH og hitastig, skoða hindravirkni og virkni yfir lengri tíma.

Guðrún Birna Jakobsdóttir
Rvk. 18. mars 2010

Heimildir

- Ágústa Guðmundsdóttir o.fl. 1993. „Isolation and charecerizaion of cDNAs from Atlantic cod encoding two different forms of trypsinogen.“ *Eur. J. Biochem.* 217, 1091-1097.
- Bjarki Stefánsson o.fl. 2010. „Characterization of cold-adapted Atlantic cod trypsin I – Kinetic paramters, autolysis and thermal stability.“ *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B.* 155, 186-194.
- Bjarni Ásgeirsson o.fl. 1989. „Purification and characterization of trypsin from the poikilothern *Gadus morhua*.“ *Eur. J. Biochem.* 180, 85-94.
- Bjarni Ásgeirsson. 2009. *Verklegar æfingar í lífefnafræði fyrir námskeiðið Lífefnafræði 3.* Háskóli Íslands. Reykjavík.
- Ensímtækni. 2010. „Um ensímtækni.“ Vefslóð: <http://www.ensimtaekni.is>
- Hermann Schägger. 2006. „Tricine-SDS-PAGE.“ *Nature protocols* tbl. 1 (nr. 1).
- Hóraldur Joensen. 2009. „Trypsin from Faroe Bank cod pylorci caevum and intestines.“ University of Faroe Islands.
- Jeffray C. Anderson og Scott C. Peck. 2008. „A simple and rapid technique for detecting protein phosphorylation using one-dimensional isoelectrinc focusing gels and immunoblot analysis.“ *The Plant Journal.* 55, 81-885.
- Jón Bragi Bjarnason. 2010. Glósur úr kennslustund í Efnafræði ensíma G (LEF611G) vor 2019. Háskóli Íslands.
- Kristinn Ingvarsson. 2007. „Penzim vinnur bug á flensuveirum.“ Morgunblaðið, 19. apríl. Vefslóð: http://www.mbl.is/mm/frettir/taekni/2007/04/19/penzim_vinnur_bug_a_flensuveirum/
- Roberto M. Aguilar o.fl. 1999. „Precipitation of Dilute Chromatographic Samples (ng/ml) Containing Interfering Substances for SDS-PAGE.“ *Analytical Biochemistry* 267, 344-350.