

## **Forord**

Arbeidet med denne masteroppgaven har blitt utført ved Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (IKBM), NMBU i perioden August 2013 til Mai 2014.

En stor takk rettes til hovedveileder Gerd Elisabeth Vegarud og biveileder Tove Gulbrandsen Devold for god veiledning og nyttige tilbakemeldinger på det skriftlige arbeidet.

Videre vil jeg takke Irene Comi for god hjelp med det praktiske laboratoriearbeidet og Morten Skaugen og Mohammad Ashiqul Islam for all hjelp med LC-MS- analyseringen. Til slutt vil jeg takke Hogne Vik ved ImmunoPharma, Geir Hetland ved Oslo Universitetssykehus og Anne Berit C. Samuelsen og Lise Berven ved Universitetet i Oslo for konstruktive innspill.

Ingeborg Almås Ingvaldsen

Lørenskog, 12 Mai 2014

## Sammendrag

AndoSan™ er et medisinsk soppekstrakt der hovedkomponenten er den champignonlignede sopp *Agaricus blazei* Murill (AbM). Preparatet inneholder også to andre sopparter, *Hericium erinaceum* og *Grifola frondosa*. De siste årene har det vært mye oppmerksomhet rundt ekstraktet da det antydes å ha positiv effekt på en rekke sykdomstilstander. Hvilke komponenter og virkningsmekanismer som er årsaken til dette er fortsatt uklart, men det antas at karbohydrater og proteiner spiller en rolle.

Målet med denne oppgaven har vært å undersøke proteiner i AndoSan™ og eventuelt påvise hva slags type proteiner dette var. Presipitering ble gjort for å oppkonsentrere proteindelen av ekstraktet. Videre ble det gjort analyseringer av proteinkonsentrasjon og proteinprofiler, sammen med identifisering av proteiner med LC-MS analyse og Mascot databasesøk. Det ble også undersøkt om proteinene ble fordøyd i et *in vitro* modellsystem med humane gastrointestinale enzymer. Proteinprofil og identifisering av peptider ble utført på de fordøyde prøvene.

Måling av proteinkonsentrasjon og analysering av proteinprofiler viste at det fantes proteiner i ekstraktet, samtidig som det tydet på at konsentrasjonen var lav. Mange av proteinbåndene ble først påvist etter farging med 0,1 % sølvnitrat. Resultatene fra LC-MS analyse og Mascot databasesøk viste at flere proteiner ble identifisert, blant annet aktin, histon H4 og endoxylanase. Disse proteinene ble identifisert i ulike proteinbånd separert på Bio-Rad geler (12 % og any kDa) og hadde MW på ca. 97, 30 og 14,4 kDa. Ved *in vitro* fordøyelse med humane fordøyelses enzymer viste SDS-PAGE resultatene at mange av proteinene i ekstraktet lot seg nedbryte. Samtidig ble det påvist fire peptidsekvenser etter fordøyelse med human gastrisk juice (HGJ). Disse hadde en lengde på 11-15 aminosyrer og tilhørte proteinet aktin.

Resultatene fra analysene som er blitt gjort viser at det finnes proteiner i AndoSan™. Det er imidlertid flere usikkerhetsmomenter knyttet til resultatene og for å kunne konkludere med tanke på proteininnhold og type proteiner i AndoSan™ bør videre analysering utføres. Det er også usikkert om de identifiserte proteinene og peptidene har betydning i forbindelse med den foreslåtte virkningen AndoSan™ har på immunforsvaret og kreft. Videre arbeid kan for eksempel undersøke om peptidsekvensene identifisert etter *in vitro* fordøyelsen, har noen effekt på kreftceller.

## **Abstract**

AndoSan™ is a mushroom extract that is used as an alternative remedy. The main component in AndoSan™ is *Agaricus blazei* Murill, but the extract also contain two other mushrooms, *Hericium erinaceum* and *Grifola frondosa*. In the last years, the extract has been subjected to much attention since it has shown to have positive effect on various diseases. Which components and mechanisms that cause this is rather unclear, but it is assumed that carbohydrates and proteins is involved.

The aim of this thesis has been to investigate proteins in AndoSan™ and possibly detect what kind of proteins this is. Precipitation was done to concentrate the protein part of the extract. Further, analysis was done to determine the protein concentration and protein profiles, together with identification of proteins with LC-MS analysis and Mascot database search. The digestion of proteins was also investigated with use of an *in vitro* model system with human gastrointestinal enzymes. Protein profiles and identification of peptides were done on the digested fractions.

Measuring of the protein concentration and analysis of protein profiles showed that there were proteins in the extract, but the concentration was low. Many of the protein bands were detected after silver staining. Further analysis with LC-MS and Mascot database search showed that several proteins were identified, including actin, histone H4 and endo-xylanase. These proteins were identified from different protein bands separated on Bio-Rad gels (12 % and any kD) and had MW about 97, 30 and 14,4 kDa. The SDS-PAGE results from the *in vitro* digestion showed that many proteins were digested. Four peptides were also identified after digestion with human gastric juice (HGJ). These were 11-15 amino acids long, and belonged to the actin protein.

The results from the different analyses show that there are proteins in AndoSan™. It is however, several uncertainties related to the results and to conclude further analysis has to be done. It is also uncertain whether the identified proteins and peptides have any effect associated with the proposed effect AndoSan™ has shown on the immune system and cancer. Further work can be done to investigate if the peptides identified after the *in vitro* digestion has any effect on cancer cells.



# Innholdsfortegnelse

<b>Forkortelser</b> .....	<b>1</b>
<b>1 Introduksjon</b> .....	<b>2</b>
<b>1.1 Innledning</b> .....	<b>2</b>
<b>1.2 Struktur og kjemisk sammensetning hos sopp generelt</b> .....	<b>2</b>
<b>1.3 AndoSan™ og <i>Agaricus blazei</i> Murill (AbM)</b> .....	<b>4</b>
<b>1.4 Sammensetning og mulige biologisk aktive komponenter i <i>Agaricus Blazei</i> Murill</b> ...	<b>6</b>
1.4.1 Karbohydrater .....	6
1.4.2 Steroider og Steroler.....	8
1.4.3 Proteiner og glykoproteiner .....	10
<b>1.5 <i>Agaricus blazei</i> Murill og helsemessige effekter</b> .....	<b>13</b>
1.5.1 Immunforsvaret .....	13
1.5.2 <i>Agaricus blazei</i> Murill- mulige virkningsmekanismer .....	15
<b>1.6 Målet med oppgaven</b> .....	<b>19</b>
<b>2 Materialer og metoder</b> .....	<b>20</b>
<b>2.1 Preparering av prøver</b> .....	<b>20</b>
2.1.1 Polyclar AT- fjerning av fargede forbindelser.....	21
2.1.2 Ammoniumsulfat (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> presipitering .....	22
2.1.3 Dialyse med Amicon Ultra/Microcon sentrifugefiltre .....	24
2.1.4 Trinnvis filtrering.....	25
2.1.5 Vann-og-etanol ekstraksjon.....	26
2.1.5.1 Videre behandling av etanolløselig vannekstrakt, ESW.....	27
2.1.5.2 Videre behandling etanoluløselig vannekstrakt, EIW .....	27
<b>2.2 Proteinanalyser</b> .....	<b>28</b>
2.2.1 Måling av proteinkonsentrasjon med NanoDrop (A280) .....	28
2.2.2 Analysering av proteinprofiler med SDS-PAGE.....	28
2.2.2.1 Bio-Rad geler (12 %, any Kd).....	30
2.2.2.2 Amersham/GE Healthcare geler ( 8-16 % gradient gel).....	31
2.2.2.3 Proteinfarging av geler med Coomassie Brilliant Blue .....	31
2.2.2.4 Proteinfarging av geler med sølvnitrat.....	32
2.2.3 Identifisering av proteiner og peptider, væskrokromatografi- massespektrometri (LC-MS) .....	33
2.2.3.1 Protein ekstraksjon fra geler ved "in gel digestion" .....	34
2.2.3.2 LC-MS analyse.....	35
2.2.3.3 Mascot protein databasesøk.....	36
2.2.4 In vitro fordøyelse av AndoSan™ med humane fordøyelsesenzymer .....	37
2.2.4.1 SDS-PAGE inkludert proteinfarging med CBB og sølvnitrat.....	40
2.2.4.2 Avsalting og oppkonsentrering av fordøyde prøver med C18 kolonne .....	40
2.2.4.3 LC-MS analyse av fordøyde prøver.....	42
2.2.5 Flytskjema for oppkonsentrering og fraksjonering, samt proteinanalyser på AndoSan™ og frysetørket AndoSan™ .....	42
<b>3 Resultater</b> .....	<b>44</b>
<b>3.1 Proteinkonsentrasjon i AndoSan™ og ulike fraksjoner</b> .....	<b>44</b>
<b>3.2 Proteinprofiler av AndoSan™ og ulike fraksjoner</b> .....	<b>46</b>
<b>3.3 Identifisering av proteiner i ulike AndoSan™ fraksjoner.</b> .....	<b>53</b>
<b>3.4 In vitro fordøyelse av AndoSan™ med humane fordøyelsesenzymer</b> .....	<b>58</b>
3.4.1 Proteinprofil av AndoSan™ og frysetørket AndoSan™ - fraksjoner fordøyd in vitro med humane fordøyelsesenzymer .....	58
3.4.2 Identifisering av peptider fra AndoSan™ og frysetørket AndoSan™ etter in vitro fordøyelse med humane fordøyelsesenzymer .....	61
<b>4 Diskusjon</b> .....	<b>62</b>

4.1 Proteinkonsentrasjon i AndoSan™ og ulike fraksjoner .....	62
4.2 Proteinprofil og identifisering av proteiner i AndoSan™ og ulike fraksjoner .....	64
4.3 <i>In vitro</i> fordøyelse av AndoSan™ med humane fordøyelsesenzymer .....	67
4.4 Videre arbeid .....	68
<b>5 Konklusjon .....</b>	<b>69</b>
<b>Referanser .....</b>	<b>70</b>
<b>Vedlegg 1 .....</b>	<b>76</b>
Kjemikalier .....	76
<b>Vedlegg 2 .....</b>	<b>77</b>
Løsninger .....	77

## Forkortelser

AbM- *Agaricus Blazei* Murill

ACN- aceton nitrile

AndoSan™- kommersielt preparat fra Immunopharma AS, flytende soppekstrakt

APC- Antigen presenterende celle

CBB- coomassie brilliant blue

DDT- dithiothreitol

Da- Dalton, måleenhet

EIW- ethanol insoluble water extract

ESW- ethanol soluble water extract

FA- eddiksyre

Frysetørket AndoSan™- frysetørket pulver fra AndoSan™

HDJ- human duodenal juice

HGJ- human gastrisk juice

kDa- kilo Dalton

MW- Molecular Weight

m/z- masse/ladning

NF- $\kappa$ B- Nukleær faktor kappa beta

ng- nanogram

PAMP- Pattern associated molecular patterns

PRR- Pattern recognition reseptor

PVP- polyvinylpyrrolidone

SDS-PAGE- sodium dodecyl sulfat polyakrylamid gel elektroforese

TFA- trifluoroeddiksyre

TLR- Toll lignende reseptor

ts- tørrstoff



# 1 Introduksjon

## 1.1 Innledning

AndoSan™ er et soppekstrakt som benyttes som et alternativt legemiddel. Det produseres i Japan og distribueres fra det norske legemiddelfirmaet ImmunoPharma AS. Hovedkomponenten i AndoSan™ er den champignonlignede sopp *Agaricus blazei* Murill (AbM), men preparatet inneholder også to andre sopparter, *Hericium erinaceum* og *Grifola frondosa* (Hetland et al. 2011; Tangen et al. 2014).

*Agaricus blazei* Murill er blitt viet mye oppmerksomhet de seneste årene da det har vist seg at den kan gi helsemessige gevinster. Det har vært mye forskningsaktivitet på soppens egenskaper og virkningsmekanismer, og ulike studier tyder på at den har positiv effekt på en rekke sykdommer som kreft, infeksjoner, inflammasjoner, allergier, astma og diabetes. Det antas at noen av disse effektene skyldes at komponenter i AbM er i stand til å påvirke og stimulere immunforsvaret (Biedron et al. 2012).

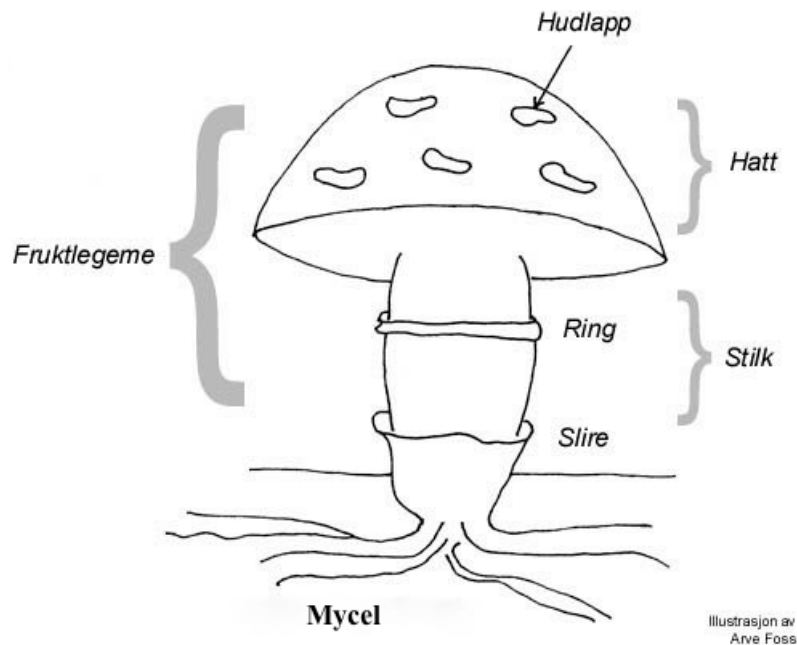
Selv om det har blitt utført mange studier på AbM og AbM-baserte ekstrakter (inkl. AndoSan™), er det fortsatt en del usikkerhet angående virkningsmekanismer og hvilke komponenter fra soppen som er bioaktive. Formålet med denne oppgaven har derfor vært å undersøke proteindelen av AndoSan™.

## 1.2 Struktur og kjemisk sammensetning hos sopp generelt

Sopp er en stor og variert gruppe av eukaryote organismer. I følge Miles og Chang (2004) defineres de som makrofungus og består av et fruktlegeme og mycel (Figur 1.1). Sopper kan deles i flere underkategorier avhengig av deres egenskaper. Noen sopper er giftige, andre blir brukt som matsopp, og noen blir anvendt for deres medisinske egenskaper (Miles & Chang 2004).

Den kjemiske sammensetningen til sopp varierer med ulike typer sopp, men normalt sett består de gjennomsnittlig av 90 % vann, 2-40 % protein, 2-8 % fett, 1-55 % karbohydrat, 3-32 % fiber og 8-10 % aske (Firenzuoli et al. 2008).

Mange matsopper og medisinske sopper tilhører stilksporesoppene (basidiomycota). I følge Hetland et al. (2008) tilhører også de tre soppene i AndoSan™, AbM, *Hericium erinaceum* og *Grifola frondosa* denne kategorien. Det samme gjør matsoppen *Agaricus bisporus*.



Figur 1.1 Generelt oppbygning av sopp (Foss u.d).

### 1.3 AndoSan™ og *Agaricus blazei* Murill (AbM)

Hovedingrediensen i AndoSan™ AbM, er en soppart som først ble oppdaget i Piedade, en liten landsby som ligger i fjellområdene rundt Sao Paulo i Brasil. Der har den blitt konsumert av lokalbefolkningen i århundrer (Biedron et al. 2012). Etter at AbM ble oppdaget i Piedade har den blitt brakt til andre deler av verden og blitt benyttet både som matsopp og innen alternativ medisin (Mizuno et al. 1990).

Tabell 1.1 Taksonomisk oversikt, *Agaricus blazei* Murill (Hibbett et al. 2007).

Rekke (phylum)	Basidiomycota
Sub-rekke	Agaricomycotina
Klasse	Agaricomycetes
Orden	Agaricales
Familie	Agaricaceae
Slekt	<i>Agaricus</i>
Art	<i>Agaricus blazei</i> Murill

*Agaricus blazei* Murill tilhører slekten *Agaricus* (Tabell 1.1) og har en 7-2 cm bred, konveks hatt med en brun-gullaktig farge. Stilken er kort og tykk med brune basidiosporer (Figur 1.2) (Firenzuoli et al. 2008). AbM er i slekt med den utbredte matsoppen champignon (*Agaricus bisporus*) (Hetland et al. 2011) og blir i dag kommersielt dyrket i Japan, Kina og Brasil (Firenzuoli et al. 2008).



Figur 1.2 *Agaricus blazei* Murill (AbM) (Stevens u.d).

AndoSan™ inneholder 80 % AbM, 15 % *Hericium erinaceum* og 3 % *Grifola frondosa* (Hetland et al. 2011). Ved produksjon blir det laget vannekstrakter, der tørket pulver fra ulike stammer av de tre soppene brukes. Sammensetningen i 100 gram tørket pulver er vist i tabell 1.2.

Tabell 1. 2 Sammensetning i 100 gram tørket AbM blandet pulver i AndoSan™ (Førland et al. 2010).

Innhold	Mengede (g)
Karbohydrater	89,4
- $\beta$ -glukaner	2,8
Vann	5,8
Protein	2,6
Aske	1,9
Fett	0,3

AndoSan™ inneholder i tillegg (per liter) 11 mg natrium, 254 mg fosfor, 35 mg kalsium, 483 mg kalium, 99 mg magnesium og 60 mg sink (Førland et al. 2010; Førland et al. 2011). Det er blitt påvist at AbM er den biologisk aktive hovedingrediensen i AndoSan™ og det er dermed denne som blir beskrevet mer detaljert i neste avsnitt (Førland et al. 2010).

## **1.4 Sammensetning og mulige biologisk aktive komponenter i *Agaricus Blazei***

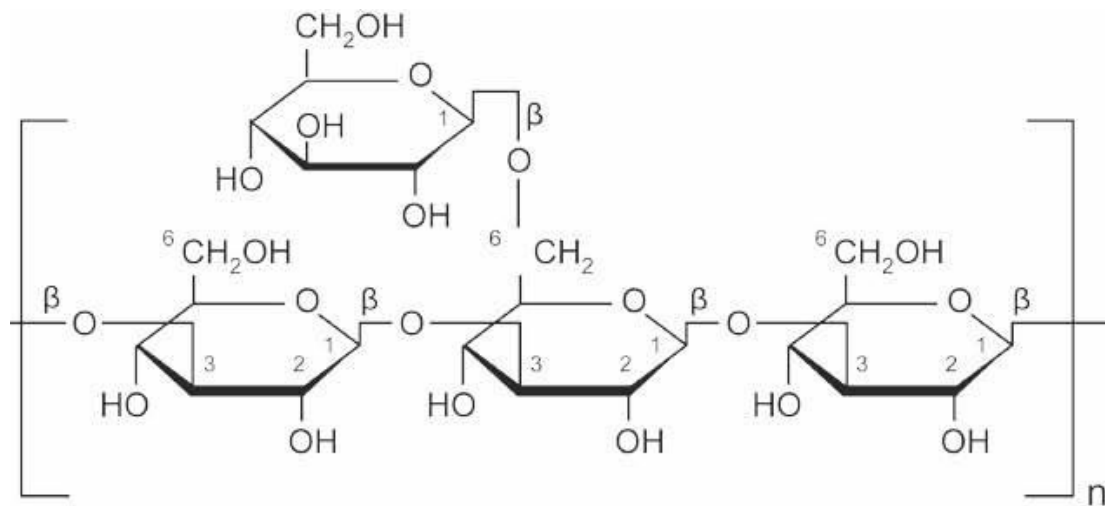
### **Murill**

Studier som er utført for å undersøke om AbM har effekt på ulike sykdomstilstander tyder på at soppen er i stand til å påvirke og stimulere immunforsvaret på en positiv måte. Det er i tillegg blitt demonstrert at den viser antitumor egenskaper (Biedron et al. 2012). Det er blitt foreslått flere mulige biologiske komponenter som kan være medvirkende til disse egenskapene, og karbohydrater og glykoproteiner er per i dag to av de mest sentrale.

#### *1.4.1 Karbohydrater*

Polysakkaridkjeder som  $\beta$  (beta)-glukaner er en type karbohydrater det finnes mye av i celleveggen til sopp. De består av kjeder med D-glukose molekyler bundet sammen med  $\beta$ -1,3-bindinger. I tillegg til denne hovedstrukturen har de ulike sideforgreninger bundet til hovedkjeden, hos sopp er disse bundet med  $\beta$ -1,6-bindinger.  $\beta$ -glukanene varierer ofte stort med hensyn på både lengde av hovedkjede og sideforgreninger (Chan et al. 2009). Den kjemiske strukturen av  $\beta$ -glukaner er vist i Figur 1.3.

Polysakkarider som  $\alpha$ -1,6-glukaner,  $\alpha$ -1,4-glukaner,  $\beta$ -1,6-glukaner,  $\beta$ -1,3-glukaner, samt glucomannan (vannløselige polysakkarider) utgjør hoveddelene av komponenter i AbM. Man antar at  $\beta$ -glukanene er den komponenten i AbM med høyest biologisk aktivitet (Biedron et al. 2012).

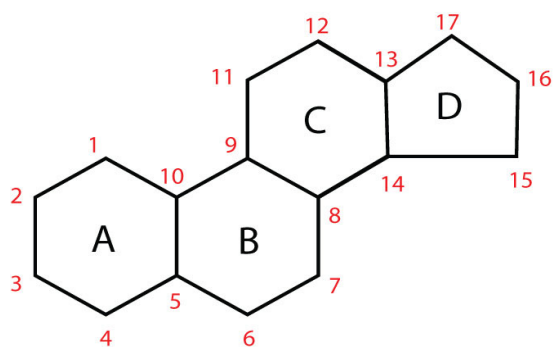


Figur 1.3 Kjemisk struktur av  $\beta$ -1,3-glukaner (*Basic molecular scheme u.d.*)

Av  $\alpha$  (alfa)-glukanene, er det spesielt vannløselige  $\alpha$ -1,4-glukaner som er blitt påvist i AbM (Biedron et al. 2012; Firenzuoli et al. 2008; Fujimiya et al. 1998). Studier viser at konsentrasjonen av  $\alpha$ -1,4-glukanene øker under AbMs modningsfase og at tidspunkt for høsting av soppen dermed har betydning for konsentrasjonen av disse i soppen (Firenzuoli et al. 2008).

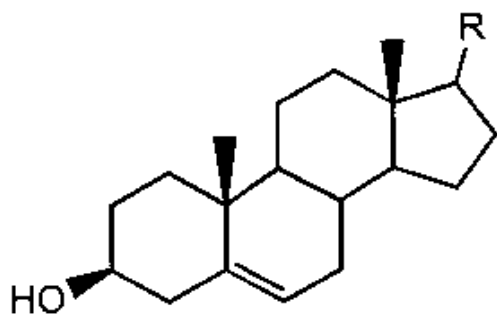
### 1.4.2 Steroider og Steroler

Steroider er en type lipider oppbygget av fire sammenhengende karbonringer (cyklopentanoperhydrofenantren) med 17 karbonatomer totalt (Figur 1.4). Steroler er en undergruppe av steroidene, der en hydroksylgruppe (OH-gruppe) finnes på en eller flere av karbonringene (Figur 1.5) (Yeagle 2010). Begge disse komponentene har viktige funksjoner i sopp generelt og begge har blitt påvist i AbM.



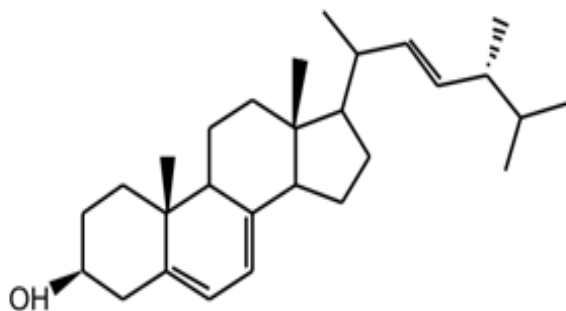
(a) Steroid skeletton

Figur 1.4 Kjemisk struktur av et steroid skjelett (Ball et al. 2011).



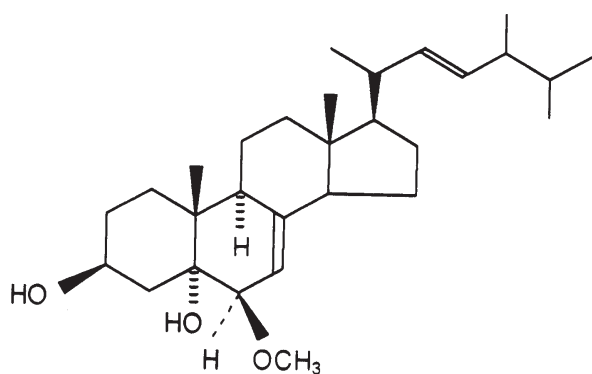
Figur 1.5 Kjemisk struktur av sterol (Bloch 1983).

Ergosterol er hovedformen av steroler i sopp og finnes i mange sopparter (Dupont et al. 2012; Weete et al. 2010). En av oppgavene til ergosterol er å være provitamin til vitamin D2, samtidig som det er en viktig komponent i celleveggen hos eukaryote celler (Jasinghe & Perera 2005; Weete et al. 2010). Ergosterol derivater har blitt påvist i AbM (Biedron et al. 2012). Den kjemiske strukturen til ergosterol vises i Figur 1.6.



Figur 1.6 Kjemisk struktur av ergosterol (Weete et al. 2010).

Blazein er et steroid som har blitt påvist i AbM. Det ble påvist etter acetonekstraksjon av AbM fruktlegermer og viste seg å kunne hemme proliferasjon (celledeling) av celler, samtidig som det var i stand til å indusere apoptose (celledød) (Itoh et al. 2008). Kjemisk struktur av blazein vises i Figur 1.7.



Figur 1.7 Kjemisk struktur av blazein (Itoh et al. 2008).



Blazeispiroler er en annen type steroider som er blitt påvist i fermenterte ekstrakter av mycel fra AbM. De er bygd opp av ergostaner, en organisk komponent som også finnes i ergosterol. Flere undergrupper har blitt påvist, blant annet A-F og X, Y og Z, og disse er modifikasjoner av strukturen (Hirotnani et al. 2000; Hirotnani et al. 2002).

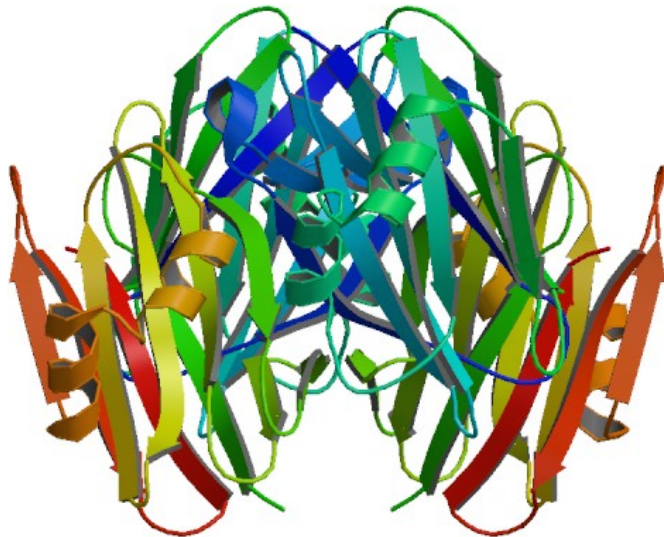
### *1.4.3 Proteiner og glykoproteiner*

I sopp generelt produseres det store mengde proteiner og peptider som kan være biologisk aktive. Selv om mange av studiene på medisinske sopper dreier seg om karbohydrater, antas det at proteinene også kan ha funksjonell betydning. Eksempler på biologisk aktive proteiner i sopp er blant annet lektiner, fungale immunmodulerende proteiner (FIP), ribosom inaktiverende proteiner (RIP), antimikrobielle proteiner, ribonukleaser og laccaser (Wong et al. 2010; Xu et al. 2011).

Som nevnt innledningsvis inneholder AndoSan™ 2,6 gram proteiner per 100 g tørrstoff (ts) (Førland et al. 2010; Førland et al. 2011). Dette er en nokså liten del sammenlignet med mengden karbohydrater (89,4 gram/100 gram ts), men det antas likevel at noen av virkningsmekanismene skyldes proteiner, og da spesielt glykoproteiner.

Et glykoprotein er et protein der karbohydrater (oligosakkarider) er kovalent bundet til aminosyrekjeden. Andelen karbohydrater varierer og kan være fra under 1 % og opp til 80 % av den totale vekten til proteinet (Kornfeld & Kornfeld 1976).

Lektiner er en type glykoproteiner som er blitt påvist i ulike slag sopp, inkludert AbM. De kan spesifikt binde ulike karbohydrater og flere av de har vist seg å ha antiprolifererende- og antitumor egenskaper (Wang et al. 1998; Xu et al. 2011). Krystallstrukturen til et lektin fra *A. bisporus* er vist i Figur 1.8.



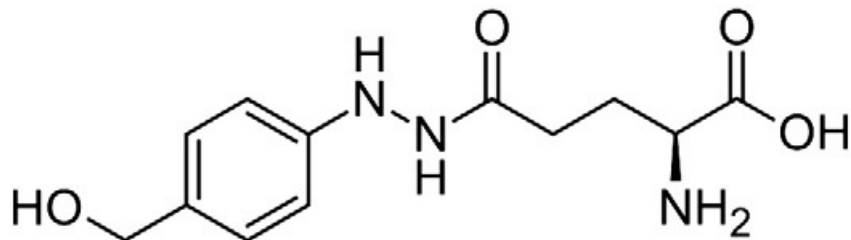
Figur 1.8 Krystallstruktur til et lektin fra *Agaricus bisporus* (1,50 Å) (Carrizo 2004).

Kawagishi et al. (1988) påviste et lektin fra fruktlegemeekstrakter av AbM. Dette var et glykoprotein med en molekyl vekt (MW) på 60-70 kDa og bestod av fire identiske subenheter på ca. 16 kDa hver. Kawagishi et al. (1988) fant videre at aminosyresammensettingen til lektinet bestod av en høy andel sure aminosyrer, hydroksyaminosyrer og glysin, samt at andelen karbohydrat var på 11 %. Både aminosyresammensettingen og karbohydratspesifisiteten viste at lektinet var forskjellig fra de andre identifiserte *Agaricus* lektinene (Kawagishi et al. 1988).

Kawagishi et al. (1989) har også påvist et annet glykoprotein i AbM. Dette ble isolert fra en uløselig vannekstraksjon, FIII-2-b, som inneholdt AbM fruktlegemer. Totalkonsentrasjonen av protein i fraksjonen var på 43,3 % og aminosyreanalyse viste at proteinet inneholdt en høy konsentrasjon av sure aminosyrer, samt alanin og leucin. Karbohydratdelen av glykoproteinets bestod av (1-6)- $\beta$ -D-glukopyranan (Kawagishi et al. 1989).

Også et RNA-proteinkompleks, kalt FA-2-b- $\beta$ , er blitt påvist i AbM ved ekstraksjon med varmt vann (Gao et al. 2007; Mizuno et al. 1990). Analyser viste at RNA-protein komplekset bestod av tre komponenter, et RNA molekyl med molekylær vekt på 10 kDa, en proteindelen og en karbohydratdel med hovedsakelig D-ribose. Proteindelen av komplekset var på 15,7 % (Gao et al. 2007).

Agaritin (N-( $\gamma$ -L(+)-glutamyl)-4-hydroxymethylphenylhydrazine) er et naturlig forekommende fenyldiazin derivat som finnes i sopper fra *Agaricus* slekten (Figur 1.9). Stoffet tilhører gruppen av aromatiske diaziner og finnes i både viltvoksende og kultiverte *Agaricus* arter (Roupas et al. 2010). Agaritin har blitt isolert og påvist i AbM (Akiyama et al. 2011).

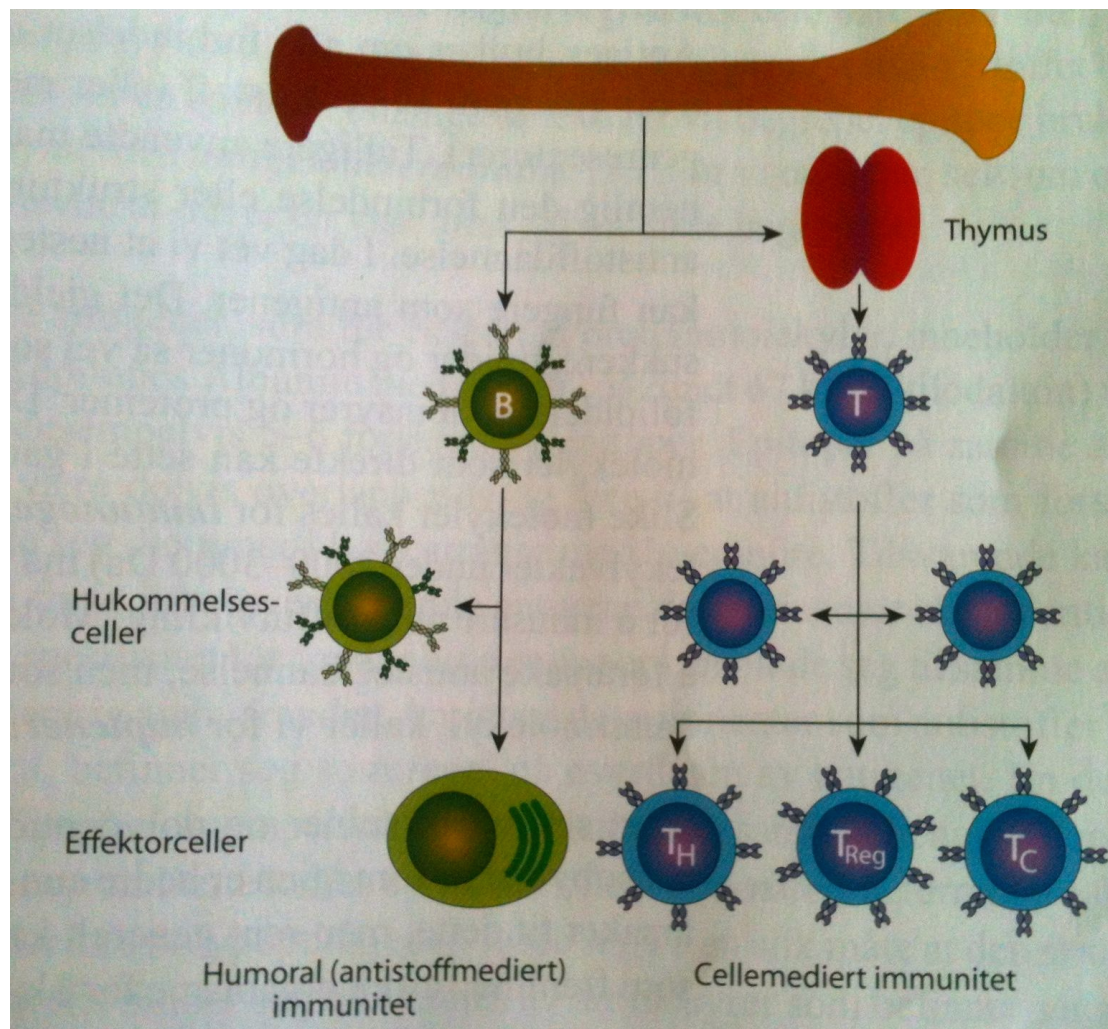


Figur 1.9 Kjemisk struktur av agaritin (Akiyama et al. 2011).

## 1.5 *Agaricus blazei* Murill og helsemessige effekter

### 1.5.1 Immunforsvaret

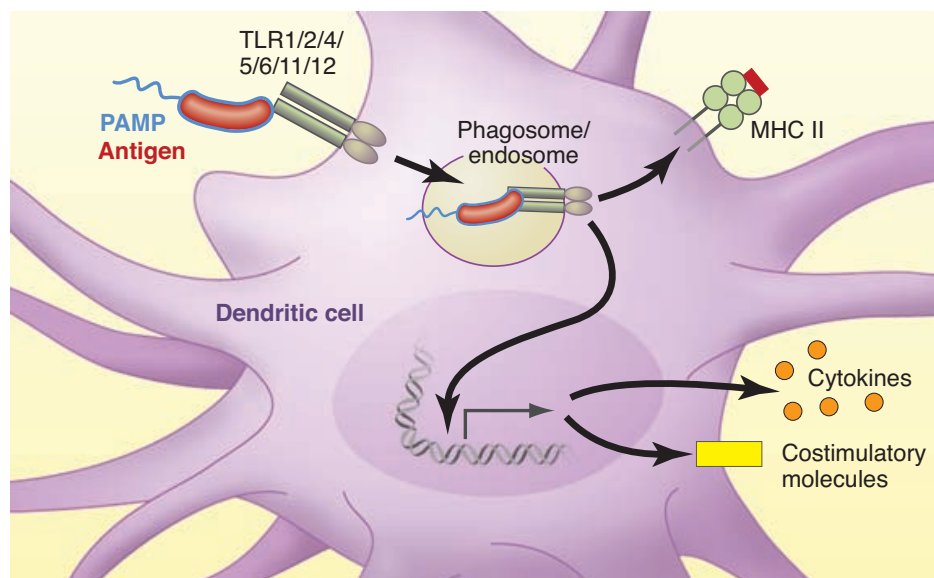
Immunforsvaret består av mange ulike celler og løselige komponenter som alle spiller en viktig rolle for beskyttelse av kroppen. Det består av to hoveddeler, det medfødte, ikke-adaptive immunforsvaret og det ervervede, adaptive. Det medfødte immunforsvaret består av en rekke celler som dendrittiske celler (DC) og naturlige dreper celler (NK, Natural Killer celler). Det inneholder dessuten alle de fagocytterende cellene, som monocytter, makrofager og granulocytter. Videre består det av cytokiner, interleukiner og komplementsystemet. Cytokiner og interleukiner er viktig for signalisering mellom ulike deler av immunforsvaret (Lea 2006).



Figur 1.10 Oversikt over det adaptive immunsystemet, med utvikling av T-og B lymfocytter (Lea 2006).

Det adaptive immunsystemet består av T- lymfocytter og B- lymfocytter (Figur 1.10). De antigen spesifikke T- lymfocyttene er i stand til å kjenne igjen antigener ved at de har spesifikke reseptorer på overflaten. B- lymfocyttene produserer blant annet antistoffer. Disse har en spesifisitet rettet mot antigener som B- lymfocyttene har blitt presentert for fra T- lymfocyttene. Det finnes to typer B- lymfocytter, kalt hukommelsesceller og effektorceller. Av disse to er det effektorcellene som er antistoffproduserende (Lea 2006).

Det medfødte immunforsvaret er avgjørende for aktivering av det ervervede, adaptive immunforsvaret. Dette skjer ved at makrofagene og de dendritiske cellene er såkalte antigenpresenterende celler (APC) for T- lymfocyttene (Figur 1.11). T- lymfocyttene på sin side, er kun i stand til å gjenkjenne og reagere på patogene/fremmede komponenter når disse blir presentert for dem i form av peptidfragmenter bundet til HLA molekyler (HovedvevsforLikelighetsAntigenkomplekser) på overflaten til APC. Det finnes to typer av HLA molekyler og en APC vil enten uttrykke HLA type I eller HLA type II (Ryan et al. 2001). Dette samarbeidet mellom APC og T- lymfocyttene kalles ofte for en immunologisk synapse (Lea 2006).



Figur 1.11 Dendritisk celle som binder og fagocytterer en bakterie, for deretter å presentere den via HLA molekyler (Iwasaki & Medzhitov 2010).

En T-lymfocyt har identiske antigengjenkjennende reseptorer, noe som betyr at den kun gjenkjenner en bestemt struktur. I kontrast, har celler i det medfødte immunforsvaret ulike reseptorer som gjør de i stand til å gjenkjenne et mønster av fremmede strukturer. Disse kalles pattern- recognition reseptors (PRR). To eksempler på slike mønstergjenkjennende reseptorer er toll-lignende reseptorer (TLR) og NOD-reseptorer (Nukleotid OligomeriseringsDomene) (Lea 2006).

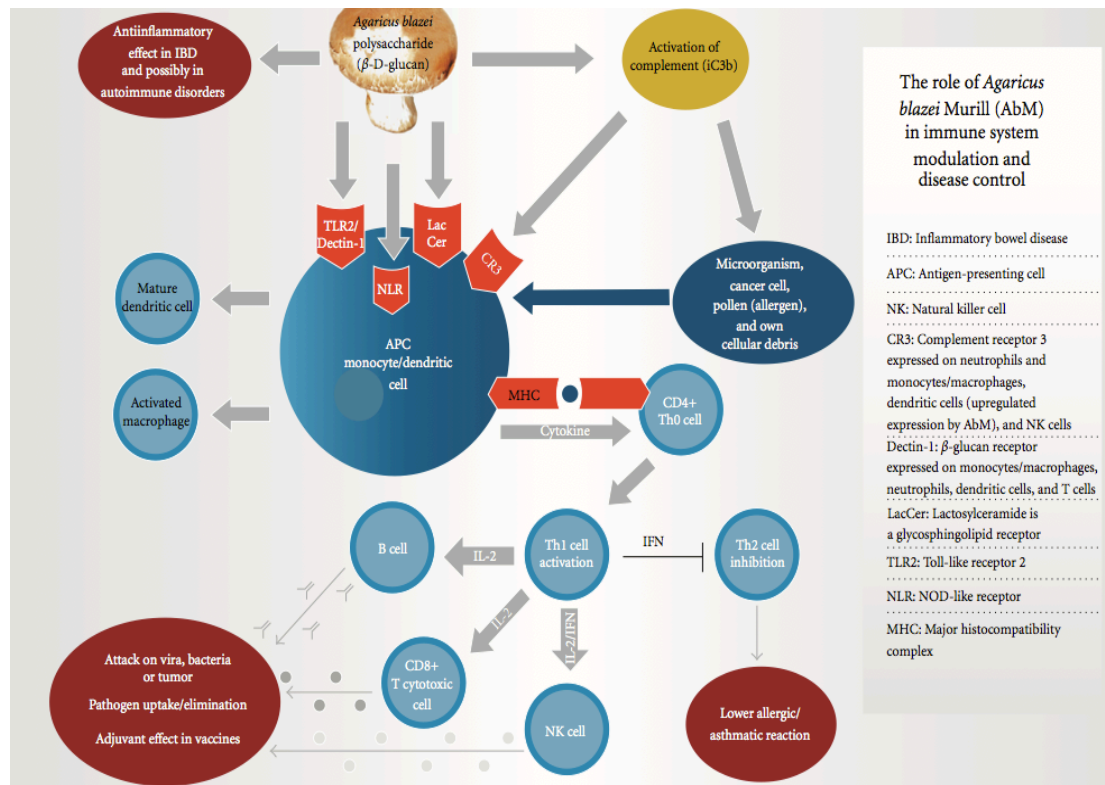
Både B- og T- lymfocytter har spesielle overflatemarkører på cellemembranen, som kalles CD- markører (Cluster of Differentiation). Disse er blant annet med på å aktivere cellene og virker ofte som co-reseptorer ved antigen presentering. CD-markørene finnes også på andre typer immunceller og de varierer i uttrykk etter hvert som cellene utvikler seg (Lea 2006).

To av disse CD- markørene har en spesiell betydning for T- lymfocytene. Disse to kalles CD4 og CD8 markører, og en T- lymfocyt uttrykker som regel kun en av de. Rundt 2/3 har CD4 markøren på celleoverflaten, mens resten har CD8 markøren. Siden disse kun uttrykkes hos T- lymfocytene, spiller de en viktig rolle ved kategorisering av de i underpopulasjoner. De CD4 positive lymfocytene vil etter stimulering fra APC utvikles til T-hjelperceller ( $T_H$ ) og T-regulatoriske celler ( $T_{REG}$ ), mens de CD8 positive lymfocytene vil utvikle seg til T-cytotoksiske celler ( $T_C$ ). T- hjelpercellene differensieres ofte videre i to subpopulasjoner kalt  $T_{H1}$  og  $T_{H2}$  avhengig av hvilke cytokiner de produserer. De to subpopulasjonene har ulike oppgaver i immunresponsen, der  $T_{H1}$  lymfocytene er rettet mot cellulære responsmekanismer, inkludert intracellulært forsvar, mens  $T_{H2}$  lymfocytene er mer rettet mot humorale responsmekanismer som stimulering av B- lymfocytene og antistoff produksjon (Lea 2006).

### *1.5.2 Agaricus blazei Murill- mulige virkningsmekanismer*

Som allerede nevnt, er utallige studier blitt utført for å undersøke biologisk aktive komponenter i AbM og virkningsmekanismene disse kan ha. Mange av studiene har sett på AbMs effekt på immunforsvaret (Figur 1.12) og virkningen den har på kreftceller. De fleste av disse studiene er utført *in vitro* og *in vivo* på forsøksdyr. I de siste årene har det imidlertid også blitt utført flere humane *in vivo* studier, der AbM

har blitt inntatt og man har studert effektene dette har medført (Hetland et al. 2011; Johnson et al. 2009; Johnson et al. 2012). I disse studiene og forsøkene er det både blitt brukt AndoSan™ og andre lignende kommersielle ekstrakter, i tillegg til kun AbM.



Figur 1.12 Oversikt over mulige påvirkningsmekanismer AbM antas å ha på immunforsvaret (Hetland et al. 2011).

En av de foreslåtte virkningsmekanismerne AbM synes å ha er innvirkningen på immunforsvaret, spesielt via stimulering av cellene i det medfødte immunforsvaret. En av mekanismene som ligger til grunn for dette er at AbM uttrykker såkalte pathogen- associated molecular patterns (PAMP). Dette er spesielle signaturmolekyler som uttrykkes hos mange sopparter og bakterier, og finnes både i harmløse sopper som AbM, men også i toksiske sopparter.  $\beta$ -glukanene i celleveggen hos AbM er en type av disse signaturmolekylene. PAMP gjenkjennes av celler i det medfødte immunforsvaret (dendritiske celler, monocytter, makrofager og NK celler) via deres mønstergjenkjennende reseptorer (PRR). Eksempler på noen av disse reseptorene er toll- like reseptor 2 (TLR2), dektin-1 og komplement reseptor 3 (CR3) (Chan et al. 2009; Hetland et al. 2011; Hetland et al. 2013). Binding av PAMP og PRR kan videre

sette i gang en immunrespons, inkludert aktivering av genregulatoriske proteiner som NF- $\kappa$ B (Nukleær Faktor- kappa B) (Alberts 2008; Hetland et al. 2011; Tryggestad et al. 2013).

En studie som nylig er blitt utført *in vitro* på humane embryoniske nyreceller har sett på virkningen AbM (AndoSan™) har på NF- $\kappa$ B. Studien viser til at immunresponsen som kan igangsettes etter binding mellom AbM og TLR er avhengig av hvilken type TLR som er innblandet (Tryggestad et al. 2013). I studien ble det brukt celler som uttrykte TLR2 og TLR4 og resultatene viste at stimulering av TLR2 kunne medføre aktivering av NF- $\kappa$ B, mens stimulering av TLR4 derimot kunne medføre det motsatte, altså reduksjon i aktivering av NF- $\kappa$ B (Tryggestad et al. 2013). Dette indikerer at komponenter i AbM både er i stand til å kunne hemme en immunrespons og derav ha anti-inflammatoriske egenskaper, samtidig som det kan sette i gang en immunrespons og dermed ha pro-inflammatoriske egenskaper.

AbM ekstrakter (inkludert AndoSan™) er også blitt brukt for å påvise en forskjøvet cytokinrespons i immunforsvaret ved IgE- mediert allergi hos mus (Ellertsen & Hetland 2009; Takimoto et al. 2008). Dette innebærer en økt T<sub>H1</sub> respons i forhold til en allergi-induserende T<sub>H2</sub> respons. T<sub>H2</sub> responsen produserer cytokiner som interleukin (IL)-4, IL-10 og IL-13. Alle disse tre cytokinene er medvirkende for IgE produksjon fra B- lymfocytter (Takimoto et al. 2008).

Andre studier som er utført tyder på at AbM også kan ha innvirkning på mekanismer som er involverte i kreft og utvikling av kreft (Mangla et al.). Flere komponenter fra AbM er foreslått å ha antitumor egenskaper, blant disse er en tidligere nevnt glykoproteinfraksjon, FIII-2-b (Kawagishi et al. 1989; Kawagishi et al. 1990; Ohno et al. 2001), lektiner fraksjonert fra AbM ekstrakter (Mizuno 1995) og polysakkarider (Gonzaga et al. 2009; Mizuno et al. 1990). Mekanismene bak AbMs påvirkning på kreftceller er fortsatt uklar, men en foreslått årsak er blant annet at AbM er i stand til å indusere apoptose i kreftceller (Biedron et al. 2012).



Flere *in vitro* studier har undersøkt AbMs innvirkning på apoptose i ulike kreftceller. Jin et al. (2006) fant at AbM fra et vannekstrakt var i stand til å inducere apoptose i humane gastroepitel karsinoma AGS celler. Foreslått årsak til dette var stopp i cellesyklusen ved G2/M-fasen og aktivering av spesielle proteiner (kaspaser) som satte i gang apoptose. Reaksjonen var doseavhengig (Jin et al. 2006). I en annen studie fant Wu et al. (2012) at et polysakkarid (APB-Ia) isolert fra AbM fruktlegemer hemmet cellevekst ved induksjon av apoptose i humane osteosarkoma celler. Osteosarkoma cellene ble i tillegg sammenlignet med friske osteoblastceller, og studien viste ingen tegn til celledød i de friske osteoblastcellene (Wu et al. 2012). Et tidligere nevnt RNA-proteinkompleks har også vist å kunne føre til apoptose i humane HL-60 leukemi celler (Gao et al. 2007).

En annen komponent som også har vist å kunne inducere apoptose hos kreftceller er agaritin. Akiyama et al. (2011) isolerte og identifiserte agaritin fra et varmtvann ekstrakt av AbM og fant at komponenten kunne gi apoptose i U937 leukemi celler. Apoptose ble induert via frigjøring av proteinet cytokrom c fra mitokondriene, som videre medførte aktivering av kaspaser (Akiyama et al. 2011).

Til tross for resultatene til Akiyama et al. (2011) er det motstridene meninger angående agaritin og virkningsmekanismene det har (Roupas et al. 2010). Noen studier viser til at agaritin er toksisk og gir opphav til kreftfremkallende stoffer etter at det har blitt metabolisert (Hajšlová et al. 2002; Koge et al. 2011; Walton et al. 1997). Andre studier viser derimot det motsatte, at agaritin ikke er toksisk og faktisk kan være antikreftfremkallende for mennesker samt ha beskyttende egenskaper for soppene (Akiyama et al. 2011; Roupas et al. 2010; Shephard & Schlatter 1998). En mulig forklaring på dette er at det er forskjell på naturlig forekommende agaritin fra *Agaricus* artene og syntetisk fremstilt agaritin som er blitt brukt i noen av studiene (Roupas et al. 2010).

## 1.6 Målet med oppgaven

Hovedmålet med denne oppgaven har vært å undersøke proteiner i AndoSan™ og eventuelt påvise hva slags type proteiner dette er. Oppgaven har vært en fortsettelse av en tidligere masteroppgave utført ved UMB (Karppinen 2012), der karbohydratene i AndoSan™ ble kartlagt.

Delmålene i oppgaven har vært som følger:

- Få bedre kunnskap om hvilke proteiner som finnes i AbM og beslektede sopper
- Benytte ulike metoder for å oppkonsentrere, fraksjonere og identifisere mulige proteiner i AndoSan™
- Undersøke om proteinene i AndoSan™ blir fordøyd i et *in vitro* modellsystem med humane gastrointestinale enzymer.

## 2 Materialer og metoder

I dette avsnittet beskrives de ulike eksperimentelle metodene og analysene som har blitt utført i oppgaven. Mer detaljert informasjon om kjemikalier/reagenser og løsninger finnes i vedlegg 1 og 2.

### 2.1 Preparering av prøver

Både flytende AndoSan™ og frysetørket AndoSan™ ble brukt som utgangspunkt i forsøkene (Figur 2.1). Flytende AndoSan™ ble gitt av ImmunoPharma AS, mens det frysetørkede var fra en tidligere masteroppgave (Karppinen 2012). Dette var også opprinnelig fra flytende AndoSan™, som hadde blitt frysetørret på en Heto Drywinner 6-85. Etter frysetørring ble pulveret oppbevart i fryser (- 18° C). En skjematisk oversikt over metodene for prøvepreparering og proteinanalysene som er blitt utført vises i Figur 2.6 og Figur 2.7.



Figur 2.1 En flaske AndoSan™ ses til venstre og frysetørket AndoSan™ pulver ses til høyre. Det frysetørkede AndoSan™ ble frysetørket på en Heto Drywinner 6-85.

### *2.1.1 Polyclar AT- fjerning av fargede forbindelser*

AndoSan™ og en blanding av frysetørret AndoSan™ oppløst i dH<sub>2</sub>O ble behandlet med Polyclar AT, som et forsøk på å fjerne fenoler og fargestoffer. Polyclar AT består av uløselig polyvinylpyrrolidone (PVP) som er i stand til å binde fenoler ved dannelse av hydrogenbindinger (Glenn et al. 1972; Loomis et al. 1979).

#### Materialer:

Polyclar AT (BDH Chemicals Ctd Poole England)

Magnetisk rører (Ikamat ret)

Sentrifuge (Megafuge 1,0, Heraus)

#### Prosedyre:

1. En blanding av Polyclar AT og dH<sub>2</sub>O (1 gram/30 ml) ble blandet i 1 time med en magnetisk rører, før blandingen ble tilsatt kald AndoSan™ (i et forhold på 1 ml/13,3 ml AndoSan™).
2. Blandingen ble blandet i 10 minutter og satt i kjøleskap i 4 ° C over natten.
3. Blandingen ble sentrifugert ved 4000 x g i 30 minutter. Supernatanten ble brukt videre og bunnfallet fjernet.
4. Det frysetørkede AndoSan™ pulveret ble blandet i dH<sub>2</sub>O (60 mg/ml dH<sub>2</sub>O) før blandingen av Polyclar AT og dH<sub>2</sub>O ble tilsatt i samme forhold som for AndoSan™. Videre behandling var lik som for AndoSan™.

### *2.1.2 Ammoniumsulfat ( $(NH_4)_2SO_4$ presipitering*

En vanlig metode for presipitering av proteiner fra en løsning er bruk av ammoniumsulfat. Denne metoden kalles også for ”utsalting” av proteiner. Den baserer seg på at proteiner i en vannholdig løsning er hydrerte. Ved å tilsette ammoniumsulfat vil en få en konkurranse om vannmolekylene mellom proteiner og salt. Ved høy nok metning av ammoniumsulfat vil vannmolekylene binde seg til saltet og dette medfører at proteinene vil aggregere og felle ut (Englard & Seifter 1990; Polson et al. 2003).

AndoSan™ og frysetørket AndoSan™ blandet i dH<sub>2</sub>O ble tilsatt fast ammoniumsulfat i ulike mengder for presipitasjon av proteiner. 30 %, 50 % og 80 % ammoniumsulfat løsninger ble laget på AndoSan™, mens det på frysetørket AndoSan™ ble laget 30 % og 80 % løsninger. Utregning av mengde ammoniumsulfat som ble tilsatt i de ulike løsningene var basert på en tabell fra *Methods in Enzymology* (Green & Hughes 1955), et nomogram fra Dixon og Webb (1979), samt en ammoniumsulfat kalkulator fra internett (EnCor Biotechnology Inc. 2014). Tabellen fra *Methods in Enzymology* vises i sin helhet i Tabell 2.1.

Tabell 2.1 Ammoniumsulfat presipitasjon. Oversikt over mengde (g) fast ammoniumsulfat som må tilsettes 1 liter av en løsning for å få en ønsket konsentrasjon. Utgangskonsentrasjon på løsningen er vist i de loddrette feltene, mens den endelige konsentrasjonen er vist i de vannrette feltene. Tabellen gjelder ved 25° C (Green & Hughes 1955).

		Final concentration of ammonium sulfate, % saturation																	
		10	20	25	30	33	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	90	100	
Initial concentration of ammonium sulfate, % saturation		Grams solid ammonium sulfate to be added to 1 l. of solution																	
		0	56	114	144	176	196	209	243	277	313	351	390	430	472	516	561	662	767
		10		57	86	118	137	150	183	216	251	288	326	365	406	449	494	592	694
		20			29	59	78	91	123	155	189	225	262	300	340	382	424	520	619
		25				30	49	61	93	125	158	193	230	267	307	348	390	485	583
		30					19	30	62	94	127	162	198	235	273	314	356	449	546
		33						12	43	74	107	142	177	214	252	292	333	426	522
		35							31	63	94	129	164	200	238	278	319	411	506
		40								31	63	97	132	168	205	245	285	375	469
		45									32	65	99	134	171	210	250	339	431
		50										33	66	101	137	176	214	302	392
		55											33	67	103	141	179	264	353
		60												34	69	105	143	227	314
		65													34	70	107	190	275
		70														35	72	153	237
		75															36	115	198
		80																77	157
		90																	79

Materialer:

Ammoniumsulfat (Merck)

Magnet rører (Ikamat ret)

Sentrifuge (Megafuge 1,0, Heraus)

### Prosedyre:

Alle am.sulfat konsentrasjonene ble laget ved romtemperatur, uten pH justering.

1. Ammoniumsulfat ble tilsatt AndoSan™ og frysetørket AndoSan™ blandet i dH<sub>2</sub>O i henhold til tabell, nomogram og am.sulfat kalkulator. Mengde AndoSan™ og frysetørket AndoSan™ blandet i dH<sub>2</sub>O var i utgangspunktet 30 ml.
2. Blandingene ble blandet forsiktig i 1 time med en magnetisk rører.
3. Blandingene ble sentrifugert ved 4000 x g i 30 minutter.
4. Supernatanten ble overført til et nytt rør for videre tillaging av neste am.sulfat konsentrasjon, mens pelleten ble resuspendert i dH<sub>2</sub>O/prøvebuffer ca. 1 x sin egen størrelse. En liten mengde supernatant ble spart fra hver konsentrasjon, før den neste ble laget.

De ulike ekstraktene ble etter am.sulfat presipitasjon oppbevart i kjøleskap i 4 ° C.

### *2.1.3 Dialyse med Amicon Ultra/Microcon sentrifugefiltre*

Sentrifugefiltre ble brukt for å fjerne ammoniumsulfatsalter før videre analysering av ekstraktene. To typer filtre ble brukt, Amicon® Ultra-15K og Microcon-centrifugal filtre devices, avhengig av mengde prøvemateriale. Begge filtre hadde filterstørrelse på 10 kDa, noe som betydde at salter og komponenter med en molekylvekt mindre enn 10 kDa ble filtrert vekk (Millipore 2012; Millipore 2013).

### Materialer:

Amicon® Ultra-15K (15 ml prøve)

Microcon centrifugal filtre devices (0,5 ml prøve)

IEX micromax centrifuge (14000 RCF)

Sentrifuge Megafuge 1,0, Heraeus (4000 x g)

### Prosedyre:

Filtreringen ble utført etter medfølgende prosedyrer fra produsentene.

1. Ekstraktene ble påsatt i filtrene (0,5 ml for Microcon og opptil 15 ml for Amicon) og sentrifugert etter egen tabell som fulgte med fra produsenten.
2. Det gjenværende ekstraktet (konsentratet) som ikke gikk gjennom filteret (Amicon) ble pipettert over til nye rør. Filteret (Microcon) ble snudd i nye rør og sentrifugert på nytt (1000 x g i 3 minutter), slik at konsentratet kunne brukes videre.
3. Ekstraktene ble fryst ned.

Pelletene fra det frysetørrede AndoSan™ som ble blandet direkte i prøvebuffer ble ikke filtrert før SDS-PAGE.

### *2.1.4 Trinnvis filtrering*

Trinnvis filtrering med sentrifugefiltre ble utført på supernatantene fra 30 % og 50 % am.sulfat presipitasjon for å se om det kunne være igjen noen proteiner som ikke hadde blitt felt ut. Det ble brukt tre filtre med ulik MW størrelse (cut off), 10 kDa, 5 kDa og 3 kDa. Det ble startet med det største. Det ble samtidig tatt med frysetørket AndoSan™ (100 mg/ml dH<sub>2</sub>O) i oppsettet. De gjenværende proteinene i supernatantene ble på denne måten separert basert på molekylstørrelse (MW).

### Materialer:

Microcon® Centrifugal filters, Ultracel YM-10

Millipore, Micon, Ultrafree® - MC Centrifugal Filter Devices

Microcon® Centrifugal filters, Ultracel YM-3

IEX micromax centrifuge (14000 RCF)

### Prosedyre:

Filtreringen ble utført etter medfølgende prosedyrer fra produsentene.

1. Ekstraktene ble påsatt i filtrene (0,5 ml) og sentrifugert etter tabell som fulgte med fra produsenten.
2. 10 kDa og 5 kDa filtrene ble sentrifugert i 30 minutter, 3 kDa filteret ble sentrifugert i 1 time.



3. Filtratet fra hvert trinn ble brukt videre.

### *2.1.5 Vann-og-etanol ekstraksjon*

Vann-og-etanol ekstraksjoner (1:2) med frysetørket AndoSan™ blandet i dH<sub>2</sub>O ble laget for å presipitere og konsentrere mulige proteiner. Metoden som ble brukt var basert på et tidligere masteroppgaveforsøk, Karppinen (2012). Proteinekstraksjon ved bruk av organiske forbindelser, som etanol, er en vanlig metode for presipitering av proteiner fra en vannholdig løsning. Den baserer seg på at i løsninger med høy konsentrasjon av etanol vil proteinene bli dehydrerte, starte å aggregere og dermed felles ut (Polson et al. 2003; Zellner et al. 2005).

#### Materialer:

Etanol 96 % (Merck)

Inkubatorskap (Termaks)

Frysetørker (Heto dry winner 685)

Rotavapor (Buchi Rotavapor R-215)

Magnet rører (Ikamat ret)

#### Prosedyre:

1. 15,06 gram frysetørret AndoSan™ ble blandet med 250 ml dH<sub>2</sub>O ved bruk av en magnetisk rører og inkubert i et inkubatorskap ved 40 ° C i 2 timer og 30 minutter. Prøven ble deretter sentrifugert ved 4000 x g i 10 minutter for å fjerne uønskede partikler som mycel og polyfenoler.
2. Fraksjonen ble tilsatt 2:1 96 % (v/v) etanol og satt i kjøleskap i 4 ° C til neste dag.
3. Fraksjonen ble separert ved sentrifugering i 1750 x g i 30 minutter og delt i to. Supernatanten ble kalt etanolløselig vannekstrakt (ethanol soluble water extract), ESW, mens presipitatet ble kalt etanoluløselig vannekstrakt (ethanol insoluble water extract), EIW.
4. Presipitatet (EIW) ble vasket to ganger med 96 % etanol og lufttørket i avtrekkskap.
5. EIW ble deretter løst opp i 100 ml dH<sub>2</sub>O og frysetørret over natten.
6. Supernatanten (ESW) hadde et betydelig større volum enn EIW og ble derfor tørket fritt for etanol på en rotavapor. Videre ble det behandlet på samme måte som EIW og

frysetørret.

7. Begge de tørkede løsninger ble oppbevart i fryser (- 18 ° C) for videre bruk.

#### **2.1.5.1 Videre behandling av etanolløselig vannekstrakt, ESW**

Det ble laget to 10 ml løsninger av frysetørket ESW blandet i dH<sub>2</sub>O (50 mg frysetørret ESW/ml dH<sub>2</sub>O), med og uten bruk av Polyclar AT. Det ble deretter utført 80 % ammoniumsulfat presipitasjon på løsningen med Polyclar AT for å felle ut mulige gjenværende proteiner i ESW.

##### Prosedyre:

1. Løsningen med Polyclar AT, ble laget ved å tilsette 0,75 ml av en blanding av Polyclar AT og dH<sub>2</sub>O før det ble blandet i 10 minutter. Tillaging av Polyclar AT-blandingen og videre behandling var som tidligere.
2. 80 % am.sulfat presipitasjon ble utført. 5,67 gram ammoniumsulfat ble tilsatt, forsiktig blandet i 1 time med en magnetisk rører, før det ble sentrifugert ved 5000 x g i 30 minutter. All behandling skjedde ved romtemperatur.
3. Sentrifugefiltre ble brukt for fjerning av ammoniumsulfatsalter, samme type og samme måte som nevnt tidligere.
5. Ekstraktet ble frysetørret igjen, for konsentrering.

Det ble videre oppbevart i fryser (- 18 ° C).

#### **2.1.5.2 Videre behandling etanoluløselig vannekstrakt, EIW**

Det ble også laget to 10 ml løsninger av EIW blandet i dH<sub>2</sub>O (50 mg frysetørret EIW/ml dH<sub>2</sub>O), med og uten bruk av Polyclar AT. Fremgangsmåte var som for ESW.

## 2.2 Proteinanalyser

### 2.2.1 Måling av proteinkonsentrasjon med NanoDrop (A280)

Måling av proteinkonsentrasjon ble utført med et NanoDrop spektrofotometer (ND-1000), program A280. Dette er en spektrofotometrisk metode som baserer seg på måling av absorbans av ulike prøver ved 214 og 280 nm, og som ut fra dette beregner proteinkonsentrasjonen. Det appliseres 2 µL prøve per måling og deteksjonsgrensen er 0,1-100 mg/ml (Thermo Scientific 2008). Måling av proteinkonsentrasjon med NanoDrop ble forsøkt gjort på alle de preparerte prøvene.

#### Materiale:

NanoDrop spektrofotometer (ND-1000)

NanoDrop dataprogram (v.3.30)

Pipette (Eppendorf)

#### Prosedyre:

dH<sub>2</sub>O ble kjørt som blank først, før prøver ble målt i tripletter på program Protein A280, ved både 280nm og 214nm. Kalkulasjonen av proteinkonsentrasjon ble gjort utfra at A=1,0 tilsvarte 1mg/ml protein.

Fremgangsmåten fulgte egen prosedyre fra NanoDrop (Thermo Scientific 2008).

### 2.2.2 Analysering av proteinprofiler med SDS-PAGE

Natriumdodecyl sulfat polyakrylamid gelelektroforese (SDS-PAGE) er en metode der proteiner og andre makromolekyler blir separert ved elektroforese i en polyakrylamidgel. Før elektroforesen blir prøvene tilsatt natriumdodecyl sulfat (SDS), som er en anionisk detergent som bidrar til å denaturere proteinene og gi dem en netto negativ ladning, slik at de videre kan bli separert på bakgrunn av sin molekylvekt. I tillegg til SDS er det også vanlig å tilsette et annet reduserende stoff, som sammen med koking av prøvene ved 95 ° C, bidrar til enda mer denaturering ved at disulfidbindinger brytes. Dette stoffet er ofte dithiothreitol (DDT) eller 2-mercaptoetanol (Jensen 2012). I noen tilfeller kan det også tilsettes urea til prøvene for å få en bedre denaturering av proteinene. Urea er et kaotropisk stoff og virker ved å bryte disulfidbindinger og hydrofobe interaksjoner, både i et protein og mellom

proteiner (Luche et al. 2003).

Etter prøvepreparering appliseres prøvene på en polyakrylamidgel som plasseres i et kammer med bufferløsning. Når elektrisk spenning tilføres vil de denaturerte proteinene migrere med ulik hastighet mot katoden og danne bånd i gelen (Jensen 2012). Disse båndene synliggjøres ved å farge gelen med Coomassie Brilliant Blue (CBB) eller sølvfarging. Tettheten i polyakrylamidgelen kan varieres ved å tilsette ulik mengde polyakrylamid eller bruke ferdigkjøpte geler med ulik prosent polyakrylamid. En høy prosent polyakrylamid vil gi ett tett nettverk i gelen. Dette vil være avgjørende for hvor langt og fort de denaturerte proteinene vil vandre i gelen. Det vil også ha betydning for hvilke proteiner som kan påvises.

Flere ulike prosedyrer og geler ble kjørt for å få proteinprofiler på de ulike prøvene. Ferdig preparerte geler fra to produsenter ble brukt, Bio-Rad og Amersham/GE Healthcare. For geler fra Bio-Rad ble en protokoll basert på Laemmli/Schragger brukt, mens det på geler fra Amersham/GE Healthcare ble brukt en medfølgende protokoll fra produsenten. En standard med seks kjente proteiner ble inkludert i alle gelene. To prøvebuffer ble brukt, 2 x prøvebuffer og 5 x prøvebuffer med 8M Urea. Prøvene ble blandet med prøvebufferne i ulike forhold, og noen av pelletene fra am.sulfat presipitasjonen ble blandet direkte i disse (i forhold 1:1). Noe av det frysetørrede AndoSan™ ble også blandet direkte i 5 x prøvebuffer inkludert 8M Urea.

Bio-Rad geler ble brukt for å få proteinprofiler på prøver med AndoSan™ inkludert alle am.sulfat fraksjoner (pellet og supernatant) og fraksjoner med frysetørket Andosan™. Amersham/GE Healthcare geler ble brukt for å få proteinprofil på am.sulfat fraksjoner fra frysetørket AndoSan™ blandet i dH<sub>2</sub>O.

## Materialer:

### Ferdig preparerte geler:

- 12 % polyakrylamid separerende gel (Mini-PROTEAN TGX, Bio-Rad Laboratories Ltd, Hemel Hempstead, Herts, UK)
- any Kd polyakrylamid separerende gel (Mini-PROTEAN TGX, Bio-Rad Laboratories Ltd, Hemel Hempstead, Herts, UK)
- Gradient gel, 8 – 16 % (Amersham/GE Healthcare)
  
- Bio-Rad Mini-PROTEAN® 3 Cell system (Bio-Rad Laboratories Ltd.)
- Amersham ECL Gel Box (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Sweden)
- Standard, Molecular Mass Marker (Amersham LMW Calibration Kit, 17-0446-01, GE Healthcare, Little Chalfont, Bucks, UK)
- 2 x prøvebuffer (0,125M tris-HCl pH 6,8, 4 % SDS, 20 % glyserol, 2 % DDT, bromfenolblå)
- 5 x prøvebuffer inkludert 8M urea (0,313M tris-HCl, 10 % SDS, 50 % glyserol, 5 % DDT, bromfenolblå, 0,48 g urea/ml)
- 10 x running buffer (1 x 0,025M tris, 0,192M glysin, 0,1 % SDS, pH 8,3)
- IEX micromax centrifuge (14000 RCF)

## Prosedyre:

Prøvene ble først fortynnet med prøvebuffer (i forhold 1:2, 1:1 og 1:4), kokt ved 95 ° C i fem minutter, sentrifugert (1000 x g) i 30 sekunder og avkjølt på is.

### **2.2.2.1 Bio-Rad geler (12 %, any Kd)**

1. De ferdiglagde gelene ble tatt ut fra kjøleskapet og vasket med dH<sub>2</sub>O før de ble plassert i gel-kammeret og 1 x running buffer ble tilsatt.
2. 10 µL og 18 µL prøvemateriale ble applisert på gelen med en pipette. 10 µL standard ble samtidig applisert.
3. Gelen ble kjørt ved konstant spenning 200 V i 40 minutter.

### **2.2.2.2 Amersham/GE Healthcare geler ( 8-16 % gradient gel)**

1. Gelen ble tatt ut fra kjøleskapet og vasket med dH<sub>2</sub>O før den ble plassert i et tilhørende kammer.
2. To ganger 90 ml 1 x runningbuffer ble tilsatt.
3. Gelen ble pre-kjørt i 10 minutter ved 160V, før brønn-kammen ble fjernet og 6 ml 1 x runningbuffer ble tilsatt over brønnene.
4. 10 µL og 18 µL av hver prøve ble applisert i brønnene inkludert 10 µL standard.
5. Gelen ble kjørt ved konstant spenning 160 V i 60 minutter.

### **2.2.2.3 Proteinfarging av geler med Coomassie Brilliant Blue**

#### Materialer:

Fikseringsløsning (20 % metanol)

Fargeløsning (0,1 % Coomassie R-250, 40 % metanol, 10 % eddiksyre)

Avfargingsløsning (10 % eddiksyre, 10 % metanol)

Preserveringsløsning (10 % glyserol, 10 % metanol)

dH<sub>2</sub>O

Risteinkubator (Biosan OS10, Orbital Shaker)

Vannbad (AQUAline AL18)

#### Prosedyre:

1. Gelen ble vasket med dH<sub>2</sub>O og lagt i en plastikkboks før fikseringsløsning ble tilsatt. Gelen ble satt på risteinkubator i 10 minutter.
2. Gelen ble farget med Coomassie Brilliant Blue fargeløsning i 15 minutter på risteinkubator.
3. Avfargingsløsningen ble fjernet og ny tilsatt. Dette ble gjentatt 3 x 15 minutter.
4. Preserveringsløsning ble tilsatt og gelen ble oppbevart i en plastikkboks med preserveringsløsning i romtemperatur.

Alle løsningene ble varmet opp til 60 ° C før de ble tilsatt gelen.

#### **2.2.2.4 Proteinfarging av geler med sølvnitrat**

Noen av gelene ble sølvfarget etter farging med Coomassie Blue og noen ble farget direkte med sølvfarging. Å farge med sølvnitrat er en alternativ fargemetode for polyakrylamid geler og er mer sensitivt enn Coomassie Blue. Sølvionene vil bindes til proteinene for deretter å bli redusert slik at man får et bilde av båndene i gelen. Sølvfarging har en deteksjonsgrense helt ned til 1-10 ng protein og metoden som ble brukt i denne oppgaven var kompatibel med masse spektrometriske analyser (dvs. Shevchenko protokollen) (Chevallet et al. 2006; Shevchenko et al. 1996).

##### Materialer:

Fikseringsløsning (50 % metanol, 5 % eddiksyre)

50 % etanol

0,02 % natriumtiosulfat pentahydrat

0,1 % sølvnitrat

Fremkallingsvæske (2 % natriumkarbonat, 0,04 % formaldehyd)

5 % eddiksyre

10 % eddiksyre

MilliQ vann (18,2 MΩ, Milli-Q Direct, Millipore Corporation)

Risteinkubator (Biosan OS10, Orbital Shaker)

##### Prosedyre:

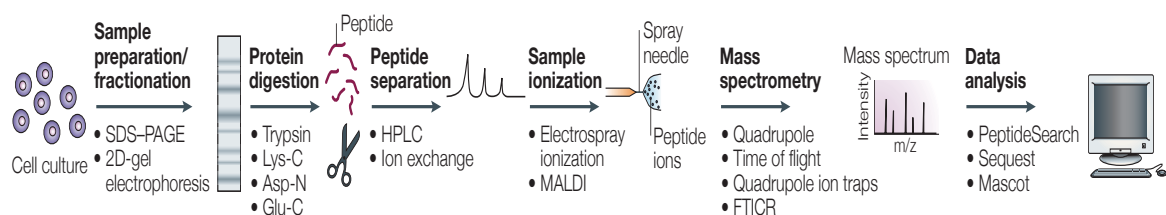
1. Gelen ble fiksert i fikseringsløsning i 20 minutter på risteinkubator.
2. Gelen ble vasket med 50 % etanol i 10 minutter.
3. Gelen ble vasket med MilliQ vann i minimum 2 timer eller over natten.
4. Gelen ble sensibilisert i 0,02 % natriumtiosulfat pentahydrat i 1 minutt.
5. Gelen ble vasket i 3 ganger 1 minutt med MilliQ vann.
6. 0,1 % sølvnitrat ble tilsatt gelen, og den ble satt på risteinkubator i 20 minutter.
7. Gelen ble vasket i 2 ganger 1 minutt med MilliQ vann.
8. Fremkallingsvæske ble tilsatt og gelen ble fremkalt i 3-5 minutter.
9. Fremkalling ble stoppet ved tilsetning av 5 % eddiksyre. Gelen ble oppbevart i 5 % eddiksyre i 1 time, på risteinkubator.
10. Gelen ble vasket i 3 ganger 10 minutt med MilliQ vann.
11. Gelen ble tilslutt tilsatt 1 % eddiksyre og ble oppbevart i en plastikk boks i

romtemperatur (Shevchenko et al. 1996).

Alle løsninger ble laget rett før de ble brukt.

### 2.2.3 Identifisering av proteiner og peptider, væskechromatografi- massespektrometri (LC-MS)

LC-MS (væskechromatografi- massespektrometri) er en sensitiv metode som kan brukes for å identifisere peptider og proteiner. Metoden kombinerer bruk av væskechromatografi og massespektrometri (Figur 2.2). I første del av analysen, blir peptidene fra prøven applisert på en HPLC (High Performance Liquid Chromatography) kolonne (den stasjonære kolonnen). Deretter vil en løsning bestående av organiske komponenter med økende konsentrasjon tilsettes (den mobile kolonnen). Tilsetting av den mobile kolonnen vil medføre at peptidene blir eluert fra HPLC- kolonnen basert på deres hydrofobiske egenskaper. Analyseinstrumentet vil måle tiden det tar fra prøven blir injisert på kolonnen og til den forlater den, dette kalles retensjonstiden (Rt). Når peptidene fra prøven forlater kolonnen blir de detektert og det blir produsert et elektrisk signal. Dette blir plottet mot tiden de har brukt gjennom kolonnen slik at man får et kromatogram (Allwood & Goodacre 2010; Burtis et al. 2008; Steen & Mann 2004).



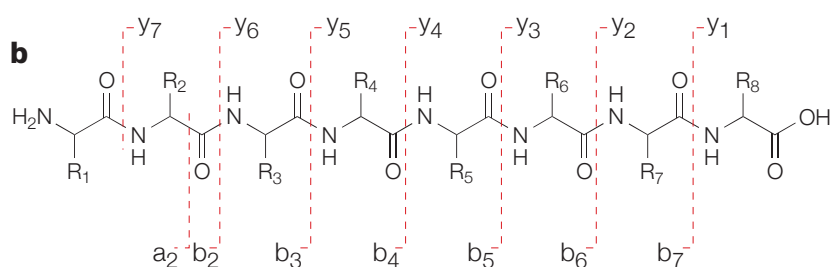
Figur 2.2 En generell oversikt over de ulike trinnene fra prøvepreparering til LC-MS og data analyse (Steen & Mann 2004).

I LC-MS instrumentet vil HPLC- kolonnen være direkte koblet til et massespektrometer, som utgjør neste trinn i analysen (Steen & Mann 2004).

Peptidene vil nå først bli ionisert (dvs. få ladning) før de blir detektert på nytt ved hjelp av massespektrometeret, denne gangen basert på deres masse/ladning (m/z) ratio (Burtis et al. 2008; Katajamaa & Orešič 2005; Smith et al. 2013). Deteksjonen vil gi



et masse-spektrum som gir en oversikt over signalintensiteten av ionene ved hver verdi på en m/z-skala (oppgitt i Da per ladning). Signalintensiteten i massespektrumet vil være proporsjonalt til mengden ioner som detekteres. Videre vil massespektrometeret innhente informasjon om primærstrukturen til peptidene (tandem MS). Dette gjøres ved at peptidene isoleres og peptidbindingene brytes slik at det dannes fragmenterte ioner (Steen & Mann 2004). Peptidbindingene brytes ved amid-enden i peptidet og ”de fragmenterte ionene som oppstår etter dette kalles b-ioner når ladningen er beholdt ved amino-terminal fragmentet og y-ioner når ladningen er beholdt ved karboksyl-terminal fragmentet” (Steen & Mann 2004) (Figur 2.3). Det finnes flere metoder både for ionisering og masseanalyse av peptider i en LC-MS analyse. I denne oppgaven er det blitt brukt nanoelektrospray som ioniseringsmetode og quadropole/orbitrap hybrid som masse analyserer.

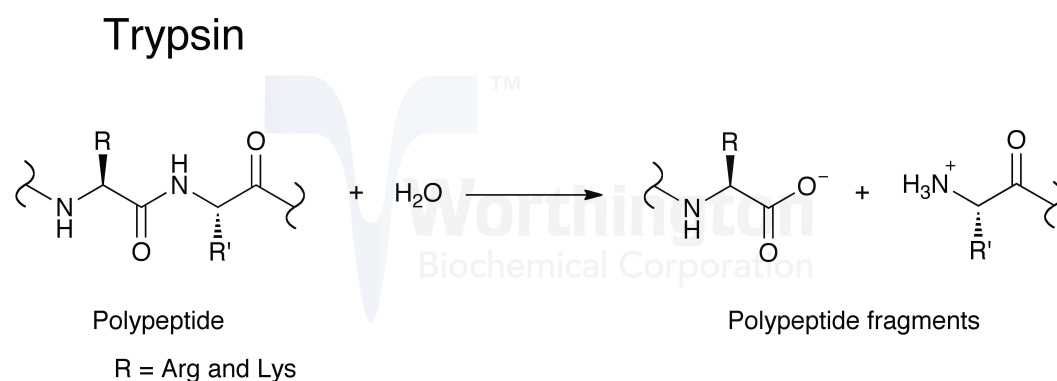


**Figur 2.3** Fragmentering av et peptid. Ionene som dannes etter fragmenteringen kalles b-ioner når ladningen er beholdt ved amino-terminal av fragmentet og y-ioner når ladningen er beholdt ved karboksyl-terminalen (Steen & Mann 2004).

### 2.2.3.1 Protein ekstraksjon fra geler ved "in gel digestion"

Flere preparerende trinn må utføres før en prøve er klar for LC-MS analyse. Første del av dette var å ekstrahere ut proteiner fra en SDS-PAGE gel. Bånd fra SDS-PAGE gelene ble klippet ut med en steril skalpell og kuttet opp i små biter på ca. 1 mm størrelse. Bånd fragmentene ble deretter lagt i sterile 200 µL PCR- rør. Videre forbehandling av prøvene, selve LC-MS analysen og databasesøk ble utført av Morten Skaugen ved protein engineering and proteomics gruppen, NMBU Ås. Kort fortalt inkluderte videre prøvepreparering at prøvene ble redusert, alkylert og behandlet med trypsin (Promega) for in-gel fordøyning. Trypsin er en serinprotease som klippet opp polypeptidene i C-terminal ende av arginin (Arg) og lysin (Lys), bortsett fra når disse var etterfulgt av et prolin (Pro) eller når Arg eller Lys var N-bundet til asparginsyre

(Asp) (Hustoft et al. 2012). Ved å bruke trypsin ble dermed lengre polypeptidkjeder kuttet opp i mindre peptider (Figur 2.4).



**Figur 2.4** En polypeptidkjede som blir kuttet opp av enzymet trypsin (Worthington Biochemical Corporation 2014).

De trypsinerte peptidene ble deretter ekstrahert fra gel biten og rensert før de ble applisert på LC-MS maskinen (Q Exactive Orbitrap LC-MS/MS System, Thermo Scientific). Protokollen som ble brukt for prøveprepareringen var en modifisert versjon av Shevchenko et al. (2007).

### 2.2.3.2 LC-MS analyse

#### Materialer:

Q Exactive Orbitrap LC-MS/MS System, Thermo Scientific

Ladeløsning/loading solution (0,05 % TFA, 2 % ACN i H<sub>2</sub>O)

Mobil kolonne/løsning B (80 % ACN, 0,1 % maursyre)

For-kolonne, TRAP (Acclaim pepMap100, C18, 5 µm, 100 Å, 300 µm i.d x5 mm)

Analytisk kolonne (Acclaim pepMap RSLC, C18, 2 µm, 100 Å, 75 µm i.d x50 cm nanoViper)

### Prosedyre:

1. Peptidene ble først separert ved bruk av væskechromatografi. Prøvene (med peptider) ble løst i en ladeløsning og applisert på en for-kolonne (TRAP).
2. Peptidene ble deretter spylt tilbake inn på en 50 cm x 75 µm analytisk kolonne.
3. En 45 minutters gradient fra 4-40 % med den mobile kolonnen (løsning B) ble brukt for å separere peptidene med en flow hastighet på 300ml/minutt.
4. De separerte peptidene ble videre ionisert i et ioniseringskammer med nanoelektrospray og analysert på massespektrometeret (Q-Exactive Mass Spectrometre). Det ble først utført full skanning (300-1600 m/z) ved  $R = 70\,000$ , etterfulgt av opp til 5 MS<sup>2</sup> skanning ved  $R = 35\,000$ . NCE setting (Normalized Collision Energy) var satt til 28. Single, ladde forløpere (precursors) ble ekskludert for tandem MS. Det samme gjaldt forløpere med z- verdi (ladning) under 5. Dynamisk eksklusjon var 30 sekunder.

### **2.2.3.3 Mascot protein databasesøk**

Resultatene fra LC-MS analyseringen ble brukt til å søke etter kjente peptider og proteiner i proteindatabasen NCBI nr 20131127 ved bruk av en "in-house" Mascot (v.2.4) server. Raw filer fra LC-MS analysen ble konvertert til mgf. format ved bruk av en msconvert-modul til Proteowizard. Databasesøkets taksonomi omfattet "other fungi" og *Agaricus bisporous*. De andre søkeparameterne som ble brukt er vist i Tabell 2.2.

Mascot programmet er et dataprogram som bruker en algoritme for å søke gjennom databaser av kjente peptider, for å finne treff mellom disse og prøvenes ukjente. Mascot programmet er basert på statistiske beregninger og treff vil resultere i scoreverdier. Scoreverdiene er basert på en kalkulert mulighet, P, for at treffet mellom prøvene og databasesekvensene er en tilfeldig hendelse. Den rapporterte scoren er dermed den negative logaritmen av denne kalkulerte muligheten, P, multiplisert med 10 ( $-10\log(P)$ ). Mascot programmet lager også en liste med mulige proteiner som prøvenes peptidsekvenser kan tilhøre. Også her genereres det scoreverdier, protein scores. Disse er basert på scorene fra hver prøve av de gjeldene peptidsekvensene. Jo

høyere score, jo større sannsynlighet for rett treff (Matrix Science 2013; Perkins et al. 1999; Steen & Mann 2004).

For Mascot søkene i denne oppgaven var signifikant terskel satt til 0,05, noe som betydde at programmet antok at 1 av 20 treff ville være falsk positive.

**Tabell 2.2** Søkeparametere brukt i Mascot databasesøk.

Type søk	MS/MS Ione søk
Enzym	Trypsin
Variable modifikasjoner	Karbamidometylering cystin, oksidasjon metionin
Masse verdi	Monoisotopisk
Protein masse	Ubegrenset
Peptid masse toleranse	± 10/20 ppm
Fragment masse toleranse	± 0,02 Da
Max missede kuttinger	2
Instrument type	Standard
Nummer av queries	8,996

#### *2.2.4 In vitro fordøyelse av AndoSan™ med humane fordøyelsesenzymmer*

*In vitro* fordøyelse med humane fordøyelsesenzymmer ble brukt for å simulere den humane fordøyelsen og undersøke nedbryting av proteiner og evt. andre komponenter.

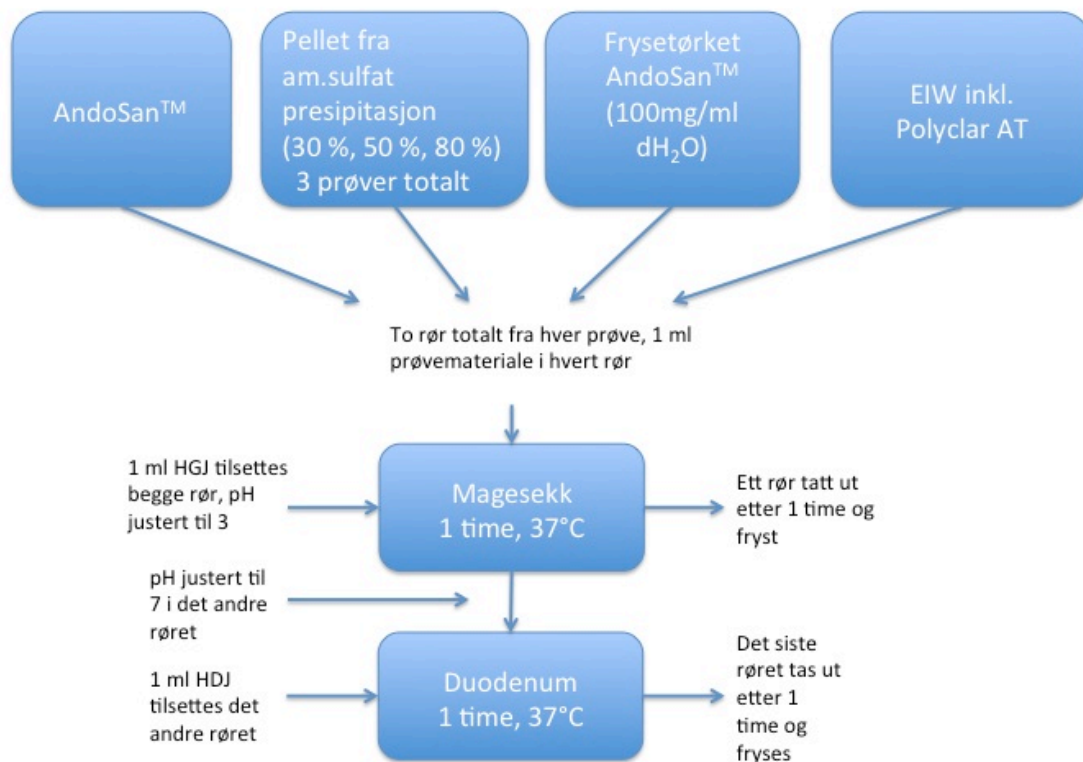
Den humane fordøyelsen er en sammensatt prosess, som skjer i flere trinn og involverer både mekaniske, kjemiske og fysiologiske metoder. Fordøyelsen starter i munn med tygging og sekresjon av amylaser (pH 7) og fortsetter deretter i magesekken med gastriske enzymer som i hovedsak er pepsin (optimum pH 1,8-3,5) og noe gastrisk lipase (optimum pH 5). Videre føres maten til tolvfingertarmen (duodenum) og fordøyes med enzymer hovedsakelig fra bukspyttkjertelen og brushborder enzymer (pH 6,5-8). I tolvfingertarmen vil også gallesyrer innvirke på

fordøyelsen av fett og proteiner (Devle et al. 2014; Guerra et al. 2012; Whitcomb & Lowe 2007).

I dette forsøket ble det brukt humane fordøyelsesenzymer fra gastrisk (HGJ) og duodenal juice (HDJ), aspirert fra 6 friske personer i henhold til en prosedyre fra Holm et al. (1988). Enzymaktivitetene i HGJ (pepsin) og HDJ (totalproteolytisk) ble målt på forhånd med ulike enzym assays, utført av Irene Comi. Fordøyelsen og oppsettet som ble brukt var basert på en metode av Devle et al. (2014). Det ble valgt ut ulike prøver til fordøyelse og disse var basert på protein båndene fra SDS-PAGE analyseringen (Tabell 2.3). En skjematisk oversikt over *in vitro* fordøyelsesforløpet er vist i Figur 2.5.

**Tabell 2.3** Oversikt over prøver som ble fordøyd *in vitro*.

Prøver til fordøying:
AndoSan™
AndoSan™ 30 % pellet fra ammoniumsulfat presipitering
AndoSan™ 50 % pellet fra ammoniumsulfat presipitering
AndoSan™ 80 % pellet fra ammoniumsulfat presipitering
100mg frysetørket AndoSan™/ml dH <sub>2</sub> O
EIW + Polyclar AT



Figur 2.5 Skjematisk oversikt over oppsettet i *in vitro* fordøyelsen. Det ble startet med to rør fra hver prøve, som begge ble fordøyd med HGJ i en time (pH 3). Det ene røret ble deretter tatt ut og fryst og HDJ ble tilsatt det andre røret og fordøyd videre i en time (pH 7).

#### Materialer:

HGJ- human mage juice (26,6 U/ml)

HDJ- human duodenal juice (13,8 U/ml)

HCL 1M og 2M, for justering av pH

NaOH 2M, for justering av pH

pH- meter (827 pHlab, Metrohm)

Vannbad, 37 grader (Julabo)

Magnetisk rører (RCT basic, Ika laborotechnik)

Rør (Nunc 50 ml)

Is

### Metode:

1. Human mage juice ble tilsatt prøvene (i forhold 1:1) i 37 graders vannbad med magnetisk rører. Det ble brukt to rør pr prøve. pH ble justert til 3.
2. Prøvene ble blandet i en time, fra pH var justert.
3. Ett av rørene ble tatt ut (HGJ 60 min) fra hver prøve etter en time og ble satt på is og senere fryst.
4. pH ble justert til 7 i det andre røret hos hver prøve og 1 ml duodenal juice ble tilsatt.
6. Prøvene ble blandet på nytt og inkubert i en time.
7. Rørene ble tatt ut (HDJ 60 min), satt på is og fryst.

De fordøyde prøvene ble fryst ned og oppbevart i - 20° C.

#### ***2.2.4.1 SDS-PAGE inkludert proteinfarging med CBB og sølvnitrat***

Videre analysering av de fordøyde prøvene inkluderte SDS-PAGE og LC-MS analyse for å se om proteinene hadde blitt brutt ned av fordøyelsesenzymene. Prøvene ble analysert på Bio-Rad any kD geler og farget med CBB etterfulgt av 0,1 % sølvnitrat. Prøvene ble blandet med 2 x prøvebuffer i forhold 1:2. Ufordøyde prøver (0.prøver) ble tatt med for alle prøvene som referanse, i tillegg til at HGJ og HDJ ble tatt med. 10 µL av alle prøver ble applisert på gelen. Materialer og metode var det samme som tidligere.

#### ***2.2.4.2 Avsalting og oppkonsentrering av fordøyde prøver med C18 kolonne***

Prøvene ble etter fordøyning filtrert med et filter med porestørrelse på 3 kDa, før de ble avsaltet og konsentrert på en C18 kolonne. Filtringen ble gjort for å fjerne partikler og fargestoffer. Ved å bruke en C18 kolonne kan man skille ut peptidene fra en prøve ved at disse bindes til C18 kolonnematerialet. Samtidig vil andre uønskede partikler bli vasket bort. En løsning bestående av 30 % 0,1 % TFA og 70 % ACN ble brukt til eluering av de bundne peptidene fra kolonnen.

### Materialer:

Microcon® Centrifugal filters, Ultracel YM-3

C18 kolonne (3M Empore C18 extraction disks, 3M Bio- analytical Technologies, St Paul, MN)

Eppendorf GELoader micropipette tips (Hamburg, Germany)

Sterile Eppendorf PCR rør 200 µL

BD Plastpak sprøyte 20 ml

Sentrifuge (IEW Micromax sentrifuge)

Metanol (100 %)

0,1 % TFA

Elueringsløsning (30 % 0,1 % TFA, 70 % ACN)

MilliQ H<sub>2</sub>O

### Metode:

1. De fordøyde prøvene ble filtrert med Microcon® Centrifugal filters, Ultracel YM-3 etter en prosedyre som fulgte med fra produsenten. Filtrene hadde på forhånd blitt primet med 400 µL MilliQ H<sub>2</sub>O sentrifugert ved 1400 rpm i 35 minutter. Filtratet ble brukt videre.
2. En C18 kolonne ble utstoppet fra en større C18 disk og trykt ned i en Eppendorf GELoader micropipettetipp.
3. En sprøyte (med luft) ble brukt til å presse alle løsninger gjennom C18 kolonnen.
4. 10 µL metanol (100 %) ble tilsatt i kolonnen og presset gjennom. En liten del metanol ble igjen over kolonnen for å hindre at den ble uttørket.
5. 20 µL 0,1 % TFA ble tilsatt og presset gjennom kolonnen x 2.
6. 20 µL prøvemateriale ble tilsatt og presset gjennom kolonnen.
7. 10 µL 0,1 % TFA ble tilsatt og presset gjennom kolonnen x 2.
8. 3 µL elueringsløsning (30 % 0,1 % TFA i 70 % ACN) ble til slutt tilsatt og presset gjennom kolonnen.

Prøvene ble eluert i sterile Eppendorf-rør og analysert på LC-MS. LC-MS analysen inkludert databasesøk ble utført av Morten Skaugen.

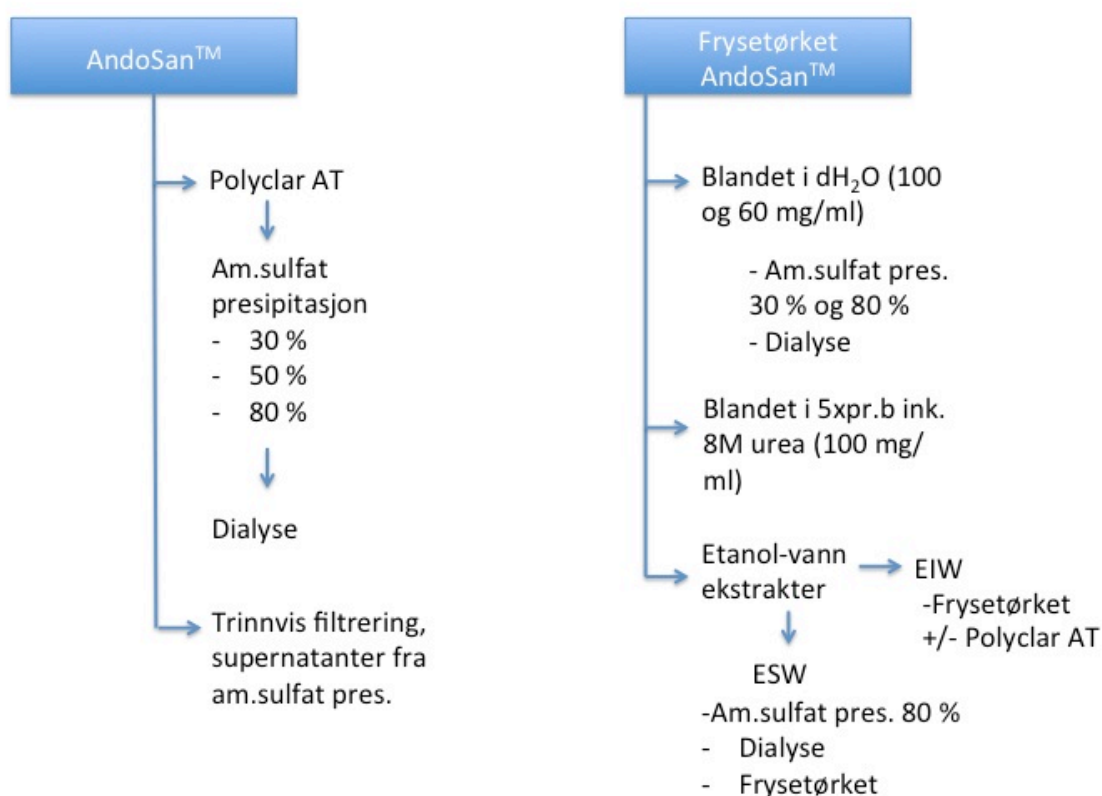


### 2.2.4.3 LC-MS analyse av fordøyde prøver

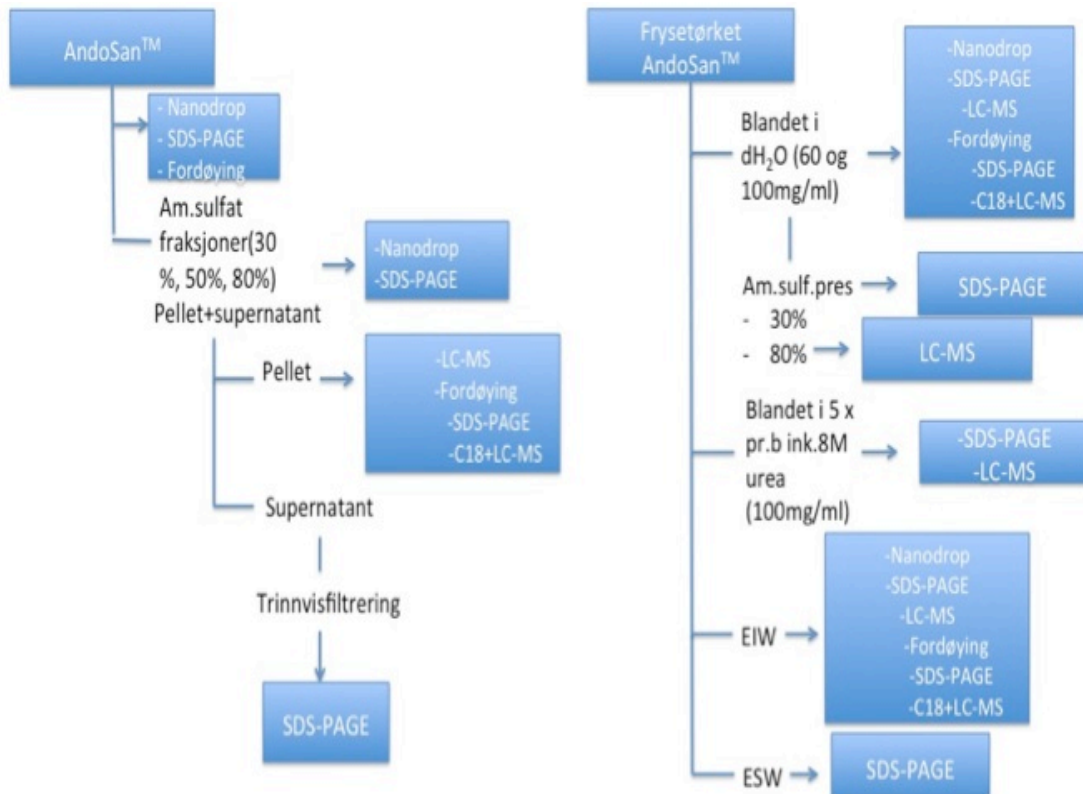
De fordøyde prøvene ble etter avsalting og oppkonsentrering analysert direkte på LC-MS for identifisering av proteiner samt for å se om de tilstedeværende proteinene hadde blitt brutt ned. I motsetning til de forrige LC-MS analysene der trypsin ble brukt til fragmentering av polypeptider, ble det nå gått ut i fra at enzymene i de humane fordøyelsesjuicene hadde fordøyd og fragmentert opp polypeptidene i prøvene. Fragmenteringen var dermed uspesifikk. Resten av LC-MS analyseringen var som tidligere og inkluderte Mascot databasesøk.

### 2.2.5 Flytskjema for oppkonsentrering og fraksjonering, samt proteinanalyser på AndoSan™ og frysetørket AndoSan™

Flytskjema for oppkonsentrering og fraksjonering, samt proteinanalyser er vist i Figur 2.6 og 2.7. Resultat- og diskusjonsdelen vil følge dette oppsettet.



Figur 2.6 Oversikt over metodene som ble utført på AndoSan™ og frysetørket AndoSan™ for oppkonsentrering og fraksjonering av proteiner.



Figur 2.7 Oversikt over proteinanalyser som ble utført på de ulike preparerte prøvene.

### 3 Resultater

#### 3.1 Proteinkonsentrasjon i AndoSan™ og ulike fraksjoner

Proteinkonsentrasjonen i AndoSan™ og de ulike am.sulfat fraksjonene ble målt med Nanodrop (ND-1000). Resultatene fra proteinkonsentrasjonsmålingene av AndoSan™ og pelletter og supernatanter fra de ulike ammoniumsulfat fraksjonene (30 %, 50 % og 80 %) er vist i Tabell 3.1. Resultatene viste at det ikke var noen betydelig forskjell i proteinkonsentrasjon ved bruk av Polyclar AT på AndoSan™. Det vil si at behandling med Polyclar AT ikke innvirket på proteinkonsentrasjonen. For de ulike am.sulfat fraksjonene viste resultatene at proteinkonsentrasjonen var noe lavere i de ulike supernatantene, samtidig som den økte i pelletene med økende mengden am.sulfat (fra 30 % til 50 %) som ble tilsatt. Resultatene viste også at det ikke var noen betydelig forskjell i proteinkonsentrasjon ved måling av absorbans ved 280nm og 214nm. Flere av fraksjonene var for mørke til å kunne måles med denne metoden (Tab 3.1).

**Tabell 3.1. Proteinkonsentrasjon (mg/ml) i AndoSan™ og de ulike am.sulfat fraksjonene. Verdiene er gjennomsnitt av 3 målinger.**

Prøve:	Proteinkonsentrasjon (mg/ml) ved A280 nm	Proteinkonsentrasjon (mg/ml) ved A214 nm
AndoSan™	12,44	13,69
AndoSan™ med Polyclar AT	12,71	11,61
30 % Am.sulfat presipitasjon		
Supernatant	9,34	9,37
Pellet	11,40	10,42
50 % Am.sulfat presipitasjon		
Supernatant	7,94	7,97
Pellet	13,65	13,48
80 % Am.sulfat presipitasjon		
Supernatant	10,95	-
Pellet	-	-

- indikerer at prøvene var for mørke eller for blakket til å kunne måles.

Trinnvis filtrering ved bruk av filtre med ulik porestørrelse (MW cut-off) ble utført på AndoSan™ supernatantene fra 30 % og 50 % am.sulfat presipitasjon, samt frysetørket AndoSan™ for å undersøke om det kunne være proteiner igjen i disse fraksjonene etter am.sulfat presipiteringen. Resultatene fra målingene av proteinkonsentrasjon i filtrater med MW cut-off på 3, 5 og 10 kDa fra 30 % og 50 % am.sulfat supernatant fraksjonerer er vist i Tabell 3.2. Disse viste at det var lite protein igjen i supernatantene etter am.sulfat presipiteringen. Proteinkonsentrasjonen sank jevnt ved bruk av de ulike filtrene og det var ingen betydelig forskjell i proteinkonsentrasjonen ved måling av absorbans ved 280nm og 214nm. Dette viser at mesteparten av proteinene i supernatanten var lavmolekylære og hadde en molekylvekt < 10 kDa. Den videre fraksjoneringen viser at ca. halvparten av proteinene hadde MW < 3 kDa. Disse prøvene var forholdsvis klare og inneholdt minimalt med fargede komponenter.

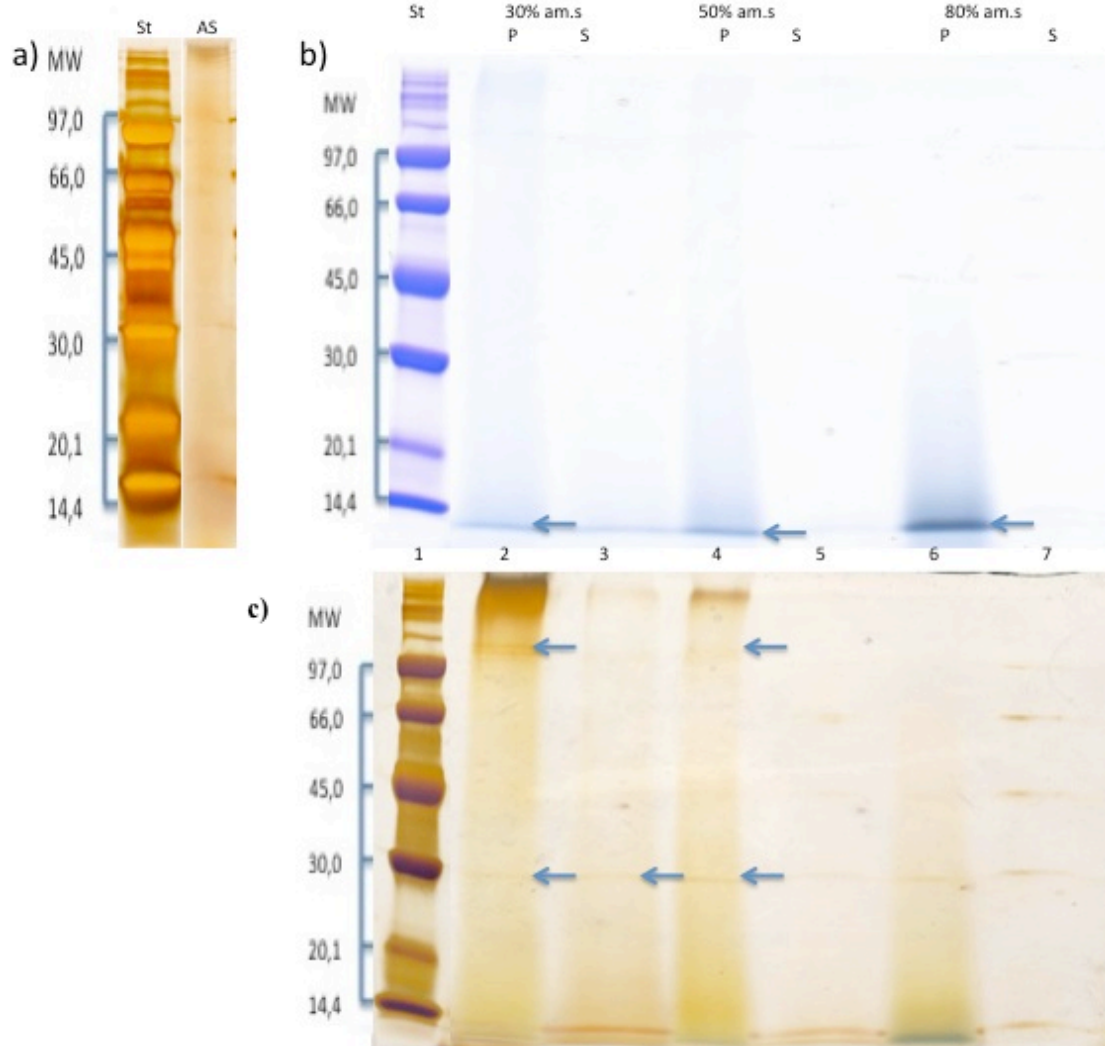
**Tabell 3.2 Proteinkonsentrasjon (mg/ml) av filtrater med MW cut off på 10, 5 og 3 kDa, AndoSan™ supernatanter fra 30 % og 50 % am.sulfat presipitering. Verdiene er gjennomsnitt av 3 målinger.**

Prøve:	Proteinkonsentrasjon (mg/ml) ved A280 nm	Proteinkonsentrasjon (mg/ml) ved A214 nm
AndoSan™ 30 % am.sulfat presipitasjon supernatant MW cut-off		
10 kDa	7,89	6,48
5 kDa	5,87	5,76
3 kDa	4,58	4,91
AndoSan™ 50 % am.sulfat presipitasjon supernatant MW cut-off		
10 kDa	4,87	4,91
5 kDa	4,40	4,53
3 kDa	3,42	3,31

### 3.2 Proteinprofiler av AndoSan™ og ulike fraksjoner

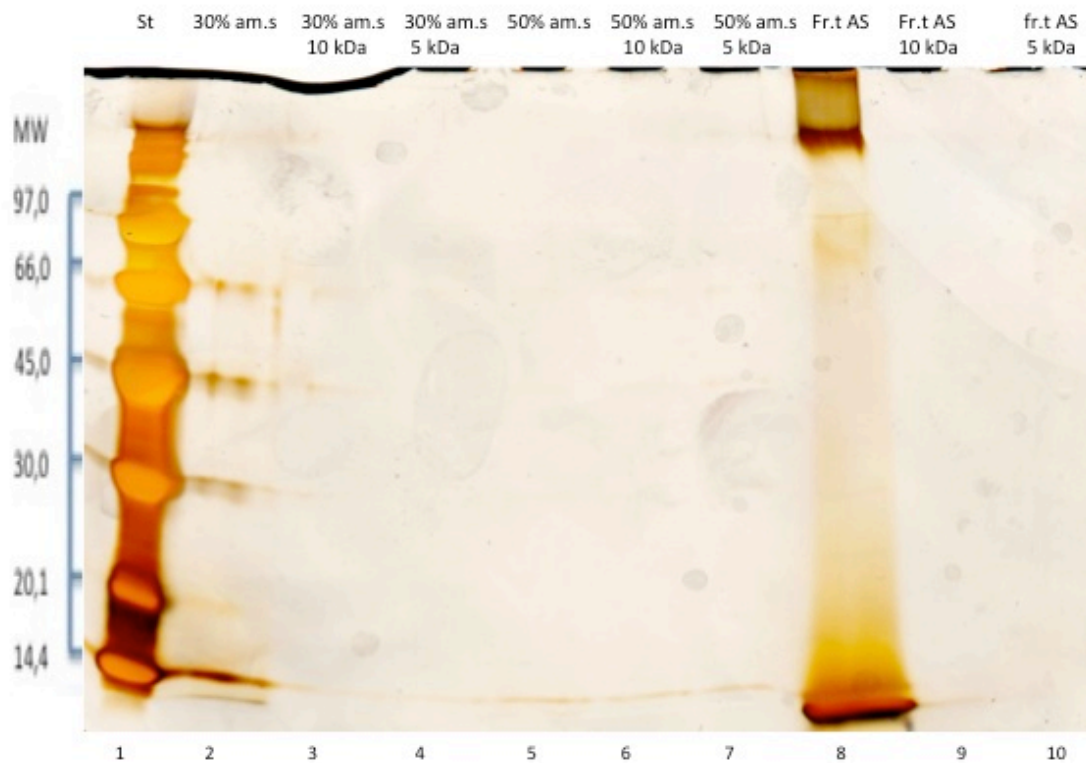
Proteinprofilene til de ulike fraksjonene fra AndoSan™ og frysetørket AndoSan™ ble analysert med SDS-PAGE inkludert farging av proteinbånd. Ulike typer geler ble utprøvd for å få best separering av proteinene, og de som ble utprøvd var fra Bio-Rad (12 % og any kD) og Amersham/GE Healthcare (gradient gel, 8-16 %). De fleste fraksjoner ble separert på Bio-Rad gelene, mens kun fraksjoner fra frysetørket AndoSan™ ble analysert på Amersham/GE Healthcare gelen. Farging av proteinbånd ble gjort med CBB og/eller 0,1 % sølvnitrat. Fargingen med 0,1 % sølvnitrat ble gjort for å få frem flere proteinbånd, da metoden var mer sensitiv enn farging med CBB. Der ikke annet er nevnt, er prøvene blitt blandet med 2 x prøvebuffer i forhold 1:2 og 10 µL er blitt applisert på gelene. Det ble også prøvd ut to typer prøvebuffer, for å bedre separeringen av proteinene.

Proteinprofilen til AndoSan™ og pelleter og supernatanter fra de ulike am.sulfat fraksjonene (30 %, 50 % og 80 %) fra AndoSan™ analysert på en 12 % Bio-Rad gel er vist i Figur 3.1. Resultatene viste ingen tydelige proteinbånd i AndoSan™ (Fig.3.1 a), mens flere proteinbånd ble påvist i am.sulfat fraksjonene (Fig.3.1b). Farging med CBB resulterte i færre synlige bånd enn farging med 0,1 % sølvnitrat, og disse proteinbåndene ble kun påvist i pelletene fra am.sulfat fraksjonene. Etter farging med 0,1 % sølvnitrat ble flere proteinbånd detektert både i pelleter og supernatanter, og proteinene hadde ulik MW. Blant annet ble et proteinbånd detektert ved 30 kDa i pelleter fra 30 %, 50 % og 80 % am.sulfat presipitasjon og i supernatant fra 30 % am.sulfat presipitasjon. To andre proteinbånd ble detektert like over 97 kDa i pellet fra 30 % og 50 % am.sulfat presipitasjon. De synlige båndene i 80% supernatant er ikke originale proteinbånd men stammer fra standarden i brønn 8.



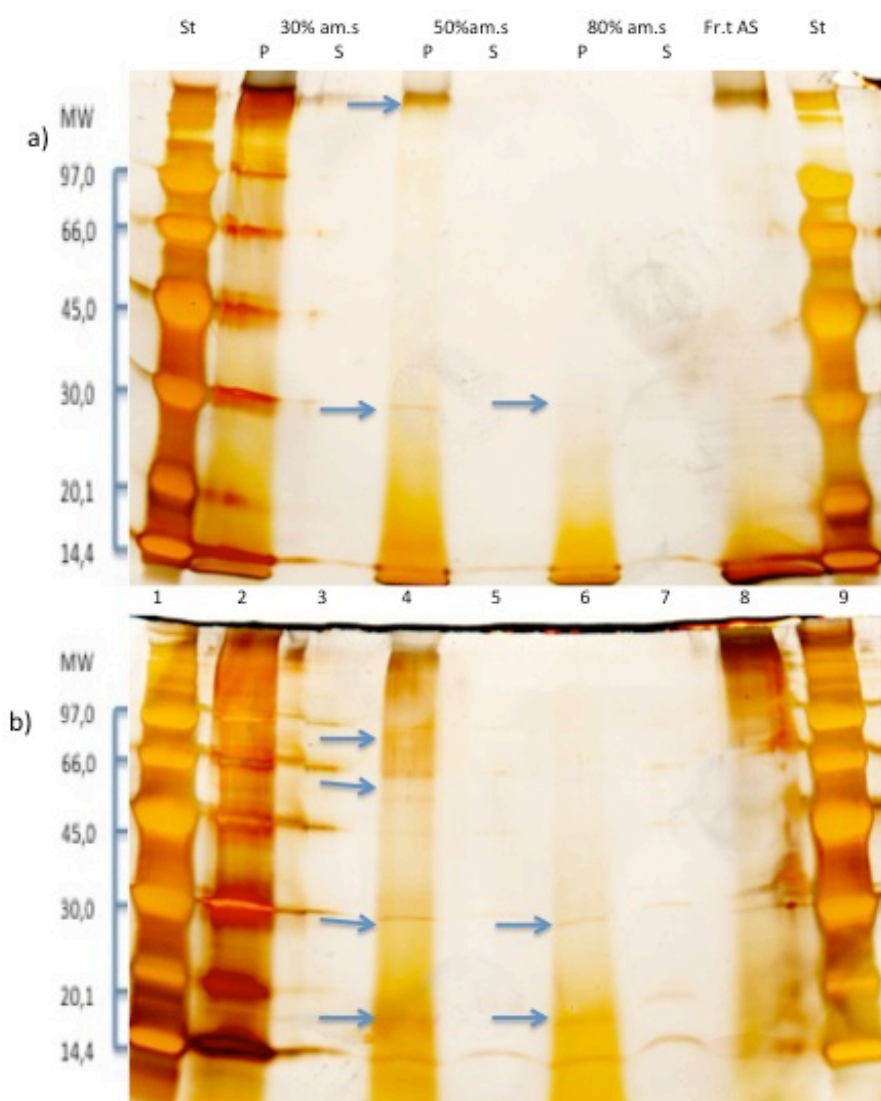
**Figur 3.1** Proteinprofil av AndoSan™ og de ulike am.sulfat fraksjonene separert i en Bio-Rad 12% gel. a) Proteinbånd i AndoSan™ (AS). b) Proteinbånd i 30 %, 50 % og 80 % am.sulfat fraksjoner pellet (P) og supernatant (S), detektert med CBB. c) Proteinbånd i 30 %, 50 % og 80 % am.sulfat fraksjoner pellet (P) og supernatant (S), detektert med sølvfarging. Molekylvekt (MW) for proteinene i standarden er vist til venstre i alle gelene (oppgitt i kDa). Pilene indikerer tydelige proteinbånd.

Proteinprofilen til filtratene etter den trinnvise filtreringen på supernatantene fra 30 % og 50 % am.sulfat presipitering fra AndoSan™, samt frysetørket AndoSan™ er vist i Figur 3.2 (se også avsnitt 3.1). Resultatene viste at det ikke var noen proteinbånd i de filtrerte fraksjonene, verken i filtratene fra MW < 10kDa eller fra MW < 5kDa.



Figur 3.2 Proteinprofil av filtrater (5 og 10 kDa) fra AndoSan™ 30 % og 50 % am.sulfat supernatant fraksjoner (am.s) og frysetørket AndoSan™ (Fr.t AS) separert på en Bio-Rad 12% gel. Proteinbåndene er farget med 0,1 % sølvnitrat.

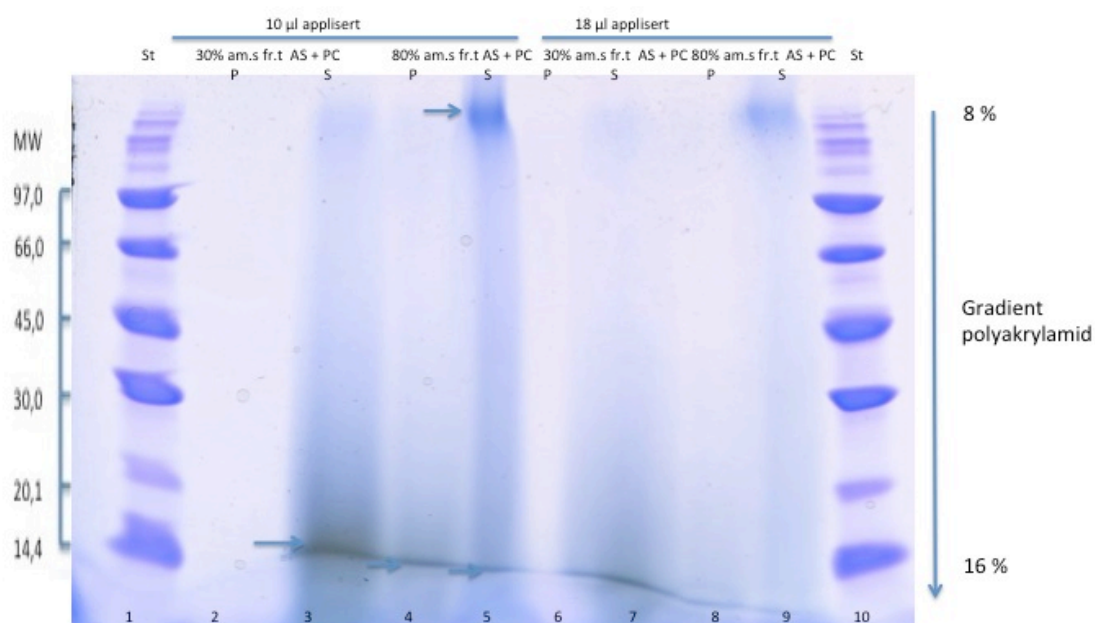
Proteinprofilen til pellet og supernatant fra de ulike am.sulfat fraksjonene (30 %, 50 % og 80 %) fra AndoSan™, samt frysetørket AndoSan™ blandet i vann separert på Bio-Rad geler (12 % og any kD) er vist i Figur 3.3. Resultatene viste flere tydelige proteinbånd i pelletter fra 50 % og 80 % am.sulfat fraksjoner, blant annet ved 30 kDa (Fig.3.3 a og b). I any kD gelen ble det detektert flere bånd i de nevnte pelletene både ved 21 kDa, 30 kDa, 66 kDa, og litt under 97 kDa. De synlige båndene i 30% pellet/supernatant (brønn 2 og 3) er ikke originale proteinbånd men carry-over fra standarden i brønn 1.



**Figur 3.3** Proteinprofil 30 %, 50 % og 80 % am.sulfat fraksjoner pellet (P) og supernatant (S) fra AndoSan™ og frysetørket AndoSan™ (fr.t AS). Prøvene er separert på: a) 12% Bio-Rad gel, b) any kD Bio-Rad gel. Proteinbåndene er farget med 0,1 % sølvnitrat.

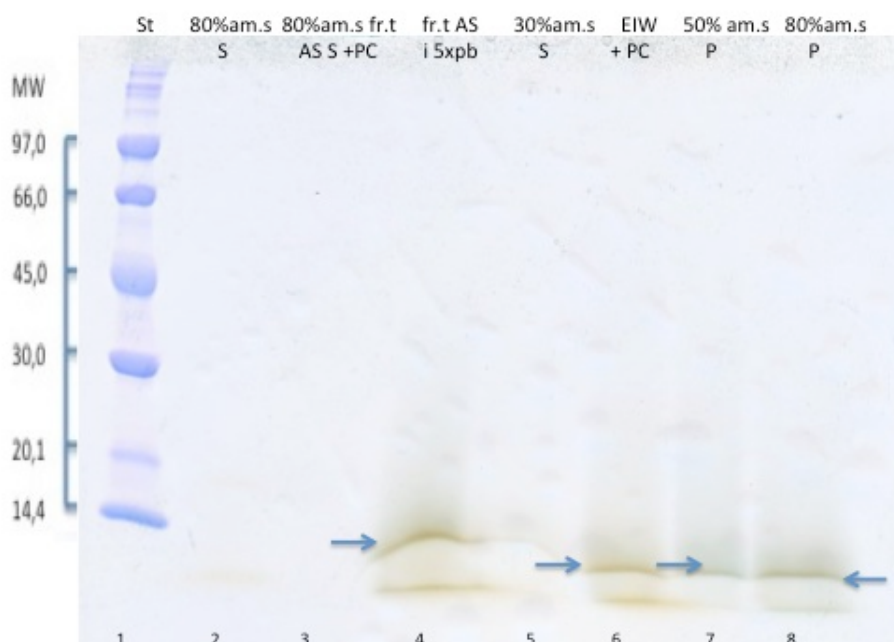


Proteinprofilen til pellet og supernatant fra 30 % og 80 % am.sulfat fraksjoner med frysetørket AndoSan™ analysert på en Amersham/GE Healthcare gradient gel (8-16%) er vist i Figur 3.4. Alle fraksjonene innehold Polyclar AT (PC) i denne gelen og to forskjellige mengder (10ul, 18ul) ble applisert. Resultatene viste 3 lavmolekylære proteinbånd (MW 14,4 kDa) i hhv. prøver fra supernatanter fra 30 % og 80 % am.sulfat presipitering og pellet fra 80 % am.sulfat presipitering. Et høymolekylært proteinbånd med molekylvekt over 97 kDa ble detektert i supernatant fra 80 % am.sulfat presipitering.



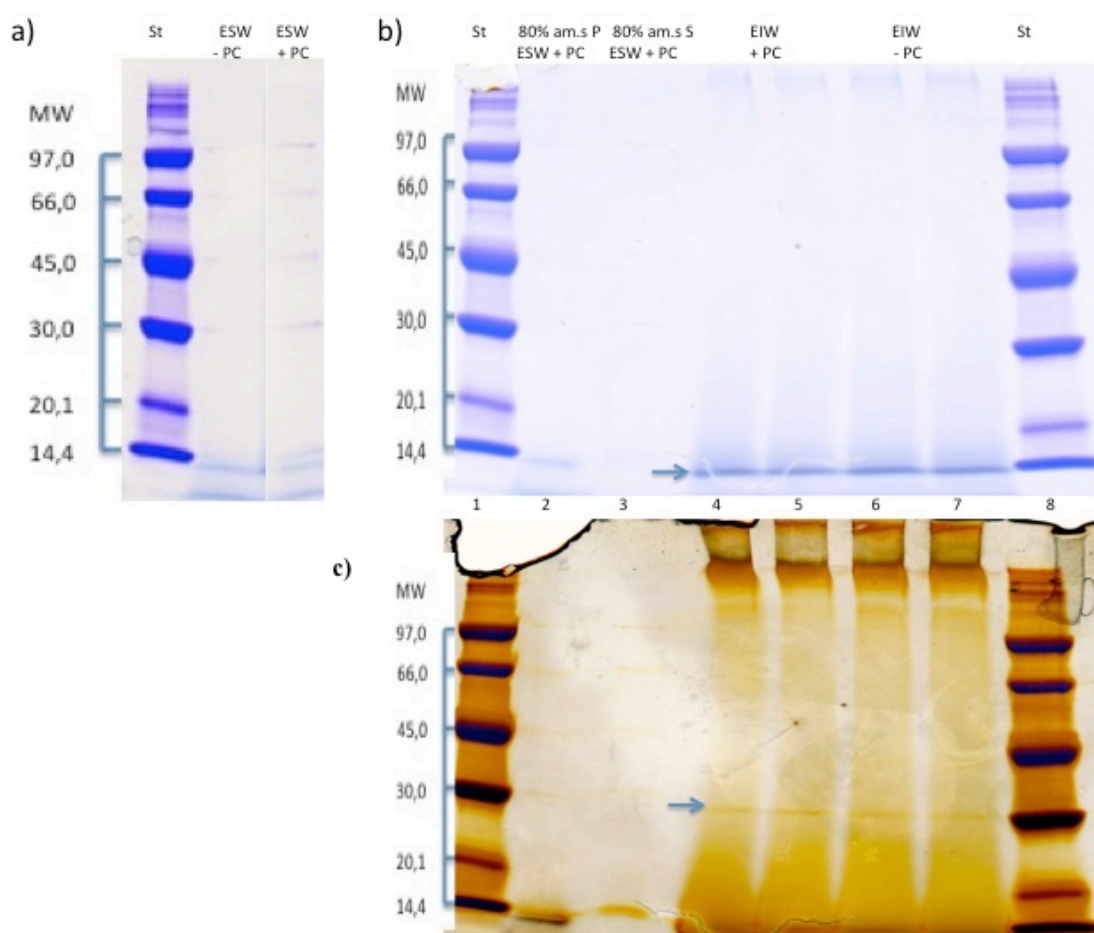
**Figur 3.4** Proteinprofil 30 % og 80 % am.sulfat fraksjoner pellet (P) og supernatant (S) fra frysetørket AndoSan™ (am.s fr.t AS). Alle fraksjonene inneholder Polyclar AT (+PC). Prøvene er separert på en Amersham/GE Healthcare gradient gel med økende prosent polyakrylamid (8-16%), og farget med CBB.

Proteinprofilen til supernatanter fra 30 % og 80 % am.sulfat fraksjoner fra AndoSan™, pelleter fra 50 % og 80 % am.sulfat fraksjoner fra AndoSan™, frysetørket AndoSan™ blandet direkte i 5 x prøvebuffer inkl.8M urea, supernatant fra 80 % am.sulfat fraksjoner med frysetørket AndoSan™ og EIW er vist i Figur 3.5. Disse prøvene er blandet i 5 x prøvebuffer inkludert 8M urea og analysert på en Bio-Rad 12 % gel. Resultatene viste lavmolekylære proteinbånd med Mw < 14.4 kDa i pelleter fra 50 % og 80 % am.sulfat presipitasjoner fra AndoSan™, frysetørket AndoSan™ blandet direkte i 5 x prøvebuffer inkl.8M urea og EIW. I de resterende prøvene ble det ikke detektert proteinbånd.



**Figur 3.5** Proteinprofil for am.sulfat fraksjoner med AndoSan™ pellet (P) og supernatant (S) og frysetørket AndoSan™ blandet direkte i 5 x prøvebuffer inkl. 8M urea (fr.t AS i 5xpb), samt EIW inkl Polyclar AT (+ PC) separert på en Bio-Rad 12 % gel. Prøvene er blandet i 5 x prøvebuffer inkl. 8M urea og proteinbåndene er farget med CBB.

Proteinprofilen til vann-og-etanol fraksjonene fra frysetørket AndoSan™, etanolloselig vannekstrakt (ESW) og etanoluloeselig vannekstrakt (EIW) med og uten Polyclar AT, analysert på en Bio-Rad 12 % gel er vist i Figur 3.6. Resultatene viste ingen høymolekylære proteinbånd i ESW, verken med eller uten bruk av Polyclar AT, kun 2 svake bånd med  $M_w < 14.4$  kDa. De andre båndene som er svakt synlige i ESW fraksjonene er carry-over fra standarden i brønn 1 (Fig.3.6 a). For pellet og supernatant fra 80 % am.sulfat fraksjoner fra ESW, ble det ikke påvist noen proteinbånd (Fig.3.6 b). I EIW fraksjonen ble det imidlertid detektert proteinbånd. Disse var lavmolekylære og kunne ses i områder under 14,4 kDa ved CBB farging (Fig.3.6 b) og et bånd kunne ses ved 30 kDa etter farging med 0,1 % sølvnitrat (Fig.3.6 c). Det var ingen forskjell i proteinbåndene med/uten behandling med Polyclar AT (Fig.3.6).



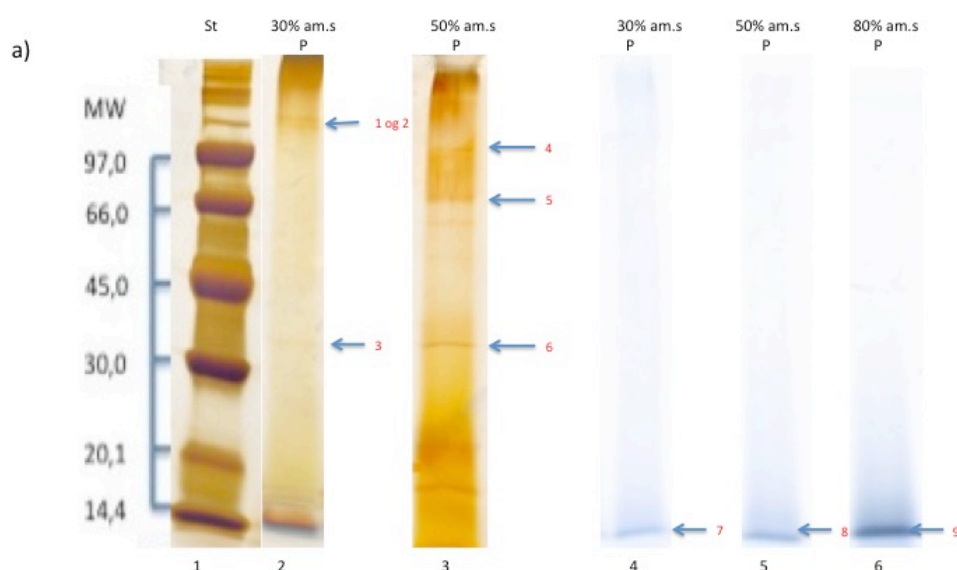
**Figur 3.6** Proteinprofil vann-og-etanol ekstraksjoner fra frysetørket AndoSan™, etanolloselig vannekstrakt (ESW) og etanoluloeselig vannekstrakt (EIW) separert på Bio-Rad 12% geler. a) Proteinprofil, ESW med og uten Polyclar AT (PC), farget med CBB. b) Proteinprofil 80 % am.sulfat fraksjoner pellet (P) og supernatant (S) fra ESW med Polyclar AT, samt EIW med og uten Polyclar AT, farget med CBB. c) samme som b, men farget med 0,1 % sølvnitrat.

### 3.3 Identifisering av proteiner i ulike AndoSan™ fraksjoner.

Identifisering av proteiner i AndoSan™ og de ulike fraksjonene ble gjort ved å klippe ut proteinbånd fra både CBB- og sølvfargede geler, etterfulgt av ”in-gel” trypsinering og LC-MS og Mascot databasesøk.

Fra AndoSan™ ble det identifiserte proteiner i pelletter fra 30 % og 50 % og 80 % am.sulfat fraksjoner (Figur 3.7 a, b). Fra proteinbånd 1 (MW ca. 97 kDa) fra 30 % am.sulfat presipitering ble det identifisert et aktin likt protein, mens det fra proteinbånd 3 (30 kDa) fra samme prøve ble det identifisert et histon H4. Fra proteinbånd 6 (MW ca. 30 kDa) fra 50 % am.sulfat presipitering ble det identifisert et aktin. I tillegg ble det fra proteinbånd 7 fra 30 % am.sulfat presipitering identifisert endo-xylanase, glykosid hydrolase familie 10 protein og beta tubulin. Fra proteinbånd 8 fra 50 % am.sulfat presipitering ble det identifisert endo-xylanase og glykosid hydrolase familie 10 protein, mens det fra proteinbånd 9 fra 30 % am.sulfat presipitering ble identifisert kun endo-xylanase. Alle de tre sistnevnte proteinbåndene hadde en MW på 14,4 kDa.

I proteinbånd 2 (rundt 97 kDa) fra 30 % am.sulfat presipitering og proteinbånd 4 (ved 97 kDa) og 5 (ved 66 kDa) fra 50 % am.sulfat presipitering ble det også treff på aktin, men score-verdien på disse lå under den signifikante grensen.



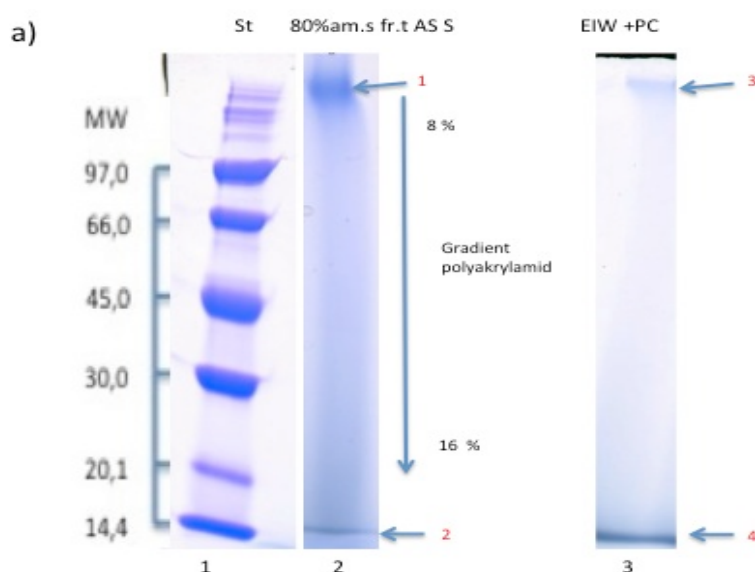
b)

Bånd fra gel	Proteintreff i Mascot Søk mot "Other fungi" og <i>A.bisporus</i>	Tilhørende art (Ved søk mot "other fungi")	Accession nummer	Score
1	Aktin-lik protein	<i>Beauveria bassiana</i>	gi400601874	143
2 <sup>1</sup>	Aktin		gi113307	94
3	Histon H4		gi50400217	142
4 <sup>1</sup>	Aktin		gi113307	60
5 <sup>1</sup>	Aktin		gi113307	74
6	Aktin		gi113307	80
7	Glykosid hydrolase fam. 10	<i>Myceliophthora thermophila</i>	gi367032838	344
	Beta tubulin	<i>Apiosordaria verruculosa</i> ATCC 42464	gi59894447	294
	Endo-xylanase	<i>Chrysosporium lucknowense</i>	gi345505465	154
8	Endo-xylanase	<i>Chrysosporium lucknowense</i>	gi345505465	338
	Glykosid hydrolase fam. 10	<i>Myceliophthora thermophila</i> ATCC 42464	gi367032838	215
9	Endo-xylanase	<i>Chrysosporium lucknowense</i>	gi345505465	702

Figur 3.7 Identifiserte proteiner i pellet fra 30 % og 50 % am.sulfat fraksjoner fra AndoSan™. a) Proteinbånd som ble brukt til identifisering, separert ved SDS-PAGE og farget med 0,1 % sølvnitrat og CBB b) Identifiserte proteiner i proteinbåndene ved LC-MS analyse.

<sup>1</sup>Treff med scoreverdi under signifikant grense (gråmerket)

Fra frysetørket AndoSan™ ble det identifiserte proteiner i supernatant fra 80 % am.sulfat presipitasjon og etanoluløselig vannekstrakt, EIW (Figur 3.8 a,b). Fra proteinbånd 1 (>97 kDa) og 2 (rundt 14,4 kDa) fra 80 % am.sulfat presipitasjon ble det identifisert endo-xylanase, mens det i proteinbånd 3 (>97 kDa) og 4 (<14.4 kDa) fra EIW, ble identifisert henholdsvis histon H4 og endo-xylanase og kun endo-xylanase.



b)

Bånd fra gel	Proteintreff i Mascot Søk mot "Other fungi"	Tilhørende art	Accession nummer	Score
1	Endo-xylanase	<i>Chrysosporium lucknowense</i>	gi345505465	300
2	Endo-xylanase	<i>Chrysosporium lucknowense</i>	gi345505465	124
3	Histon H4		gi50400217	231
	Endo-xylanase	<i>Chrysosporium lucknowense</i>	gi345505465	215
4	Endo-xylanase	<i>Chrysosporium lucknowense</i>	gi345505465	669

Figur 3.8 Identifiserte proteiner i supernatant fra 80 % am.sulfat presipitasjon med frysetørket AndoSan™ og vann-og-etanol ekstrakt, EIW. a) Proteinbånd som ble brukt til identifisering, separert ved SDS-PAGE og farget med CBB. b) Identifiserte proteiner i proteinbåndene ved LC-MS.

En oversikt over alle de identifiserte proteinene fra fraksjoner med AndoSan™ og frysetørket AndoSan™ er vist i Tabell 3.3. Resultatene viste klart grupperinger av ulike proteiner ved at noen av proteinene kun ble felt ut i visse am.sulfat fraksjoner fra AndoSan™. For eksempel ble aktin kun identifisert i pellet fra 30 % og 50 % am.sulfat, og ikke i 80 %. Endo-xylanase derimot, ble identifisert i alle fraksjonene både med AndoSan™ og frysetørket AndoSan™. Det ble også treff på aktin i flere fraksjoner der score verdien lå under den signifikante grensen.

Tabell 3.3 Proteiner identifisert ved LC-MS analyse i de ulike AndoSan™-og frysetørkede AndoSan™ fraksjonene

Bånd fra gel	Protein ID	Mw		Fraksjon							
		SDS-PAGE (kDa)	Teoretisk (kDa)	AndoSan™						Frysetørket AndoSan™	
				30 %Am. sulf.pres S <sup>2</sup>	P	50%Am. sulf.pres S <sup>2</sup>	P	80% Am. sulf.pres S <sup>2</sup>	P	80% Am.sulf. pres S	EIW
1	Aktin-lik protein	< 97	82,3		X						
2 <sup>1</sup>	Aktin	< 97	42		(X)						
3	Histon H4	30	11		X						
4 <sup>1</sup>	Aktin	97	42				(X)				
5 <sup>1</sup>	Aktin	66	42				(X)				
6	Aktin	30	42				X				
7	Beta tubulin	14,4			X						
	Endo-xylanase	14,4	41		X						
	Glykosid hydrolase fam. 10	14,4			X						
8	Endo-xylanase	14,4	41				X				
	Glykosid hydrolase fam. 10	14,4					X				
9	Endo-xylanase	14,4	41					X			
1	Endo-xylanase	< 97	41						X		
2	Endo-xylanase	14,4	41						X		
3	Endo-xylanase	< 97	41								X
	Histon H4	< 97	11								X
4	Endo-xylanase	14,4	41								X

<sup>1</sup> Indikerer proteiner med lavere score verdi enn det som var signifikant grense (blå skrift)

<sup>2</sup> Gråmerket felt indikerer fraksjoner som ikke ble analysert ved LC-MS (supernatanter)

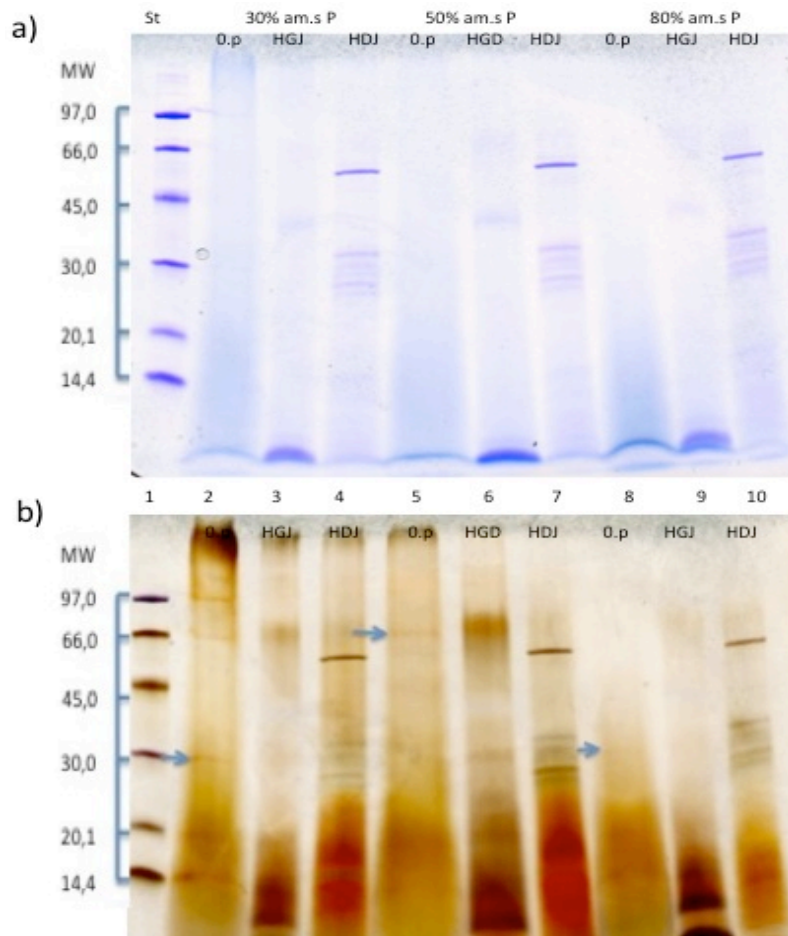


### 3.4 *In vitro* fordøyelse av AndoSan™ med humane fordøyelsesenzymer

*In vitro* fordøyelse med humane fordøyelsesenzymer, mage- (HGJ) og duodenal (HDJ) juice, ble utført for å simulere den humane fordøyelsen og undersøke nedbryting av proteiner i fraksjoner fra AndoSan™ og frysetørket AndoSan™. De fordøyde ekstraktene ble videre analysert med SDS-PAGE inkludert farging av proteinbånd med CBB og 0,1 % sølvnitrat og LC-MS analysering inkludert Mascot database søk. Det ble tatt med ufordøyde prøver (0.prøver) for hver fraksjon.

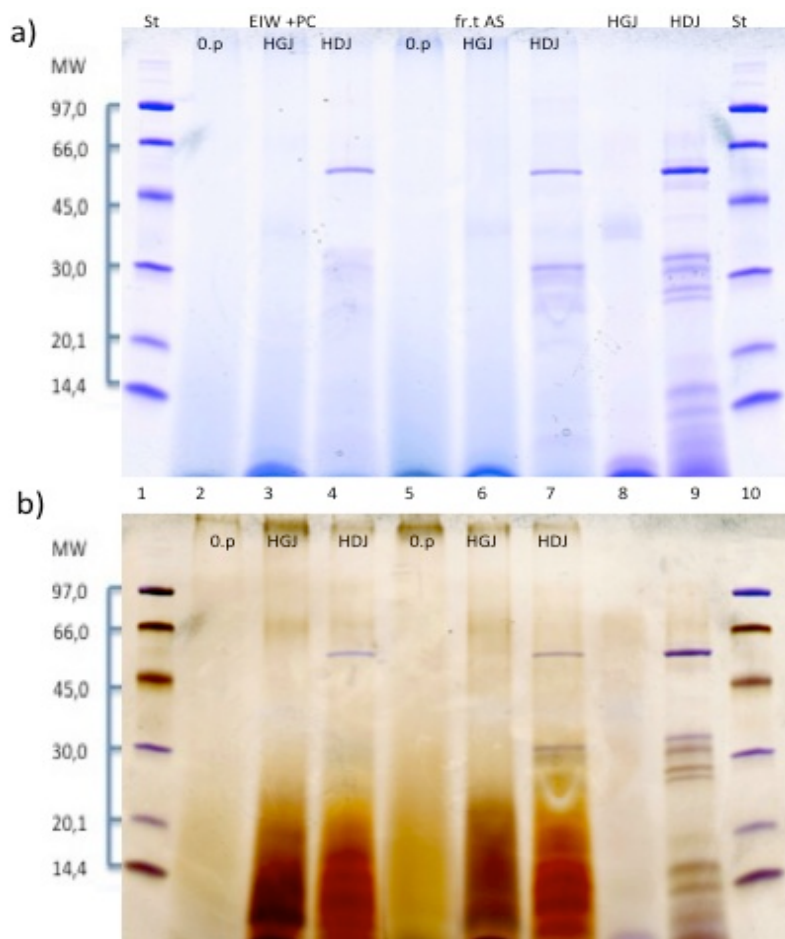
#### 3.4.1 Proteinprofil av AndoSan™ og frysetørket AndoSan™-fraksjoner fordøyd *in vitro* med humane fordøyelsesenzymer

Proteinprofilen til pelletene fra alle am.sulfat fraksjonene fra AndoSan™ etter *in vitro* fordøyelse med humane fordøyelsesenzymer er vist i Figur 3.9. Resultatene viste at proteinbåndene ikke lenger kunne detekteres etter at fraksjonene hadde blitt fordøyd (Fig.3.9 b). De opprinnelige proteinene (vist med piler) synes å være fordøyd allerede etter magetrinnet med HGJ.



Figur 3.9 Proteinprofil av pelletter fra de ulike am.sulfat fraksjonene fordøyd med human mage juice (HGJ) og human duodenal juice (HDJ). 0.prøver er tatt med for alle fraksjonene. Proteinbåndene er separert på en Bio-Rad any kD gel og farget med: a) CBB, og b) CBB + 0,1 % sølvnitrat. Pilene indikerer proteinbånd i opprinnelig prøve før fordøyelse.

Proteinprofilen til frysetørket AndoSan™ og etanoluløselig vannekstrakt fra frysetørket Andosan™, EIW etter *in vitro* fordøyelse er vist i Figur 3.10. Resultatene viste ingen tydelige proteinbånd i de ufordøyde prøvene (0.p prøvene) i denne gelen for verken frysetørket AndoSan™ eller EIW. De synlige proteinbåndene i gelen her (Fig.3.10) stammer hovedsakelig fra fordøyelsesjuicene, HGJ og HDJ.



Figur 3.10 Proteinprofil av frysetørket AndoSan™ og etanoluløselig vannekstrakt, EIW. I brønn 8 og 9 vises proteinprofilen til human mage juice (HGJ) og human duodenal juice (HDJ). 0.prøver er tatt med for alle fraksjonene. Proteinbåndene er separert på en Bio-Rad any kD gel og farget med: a) CBB og b) CBB + 0,1 % sølvnitrat.

### 3.4.2 Identifisering av peptider fra AndoSan™ og frysetørket AndoSan™ etter *in vitro* fordøyelse med humane fordøyelsesenzymer

Fra AndoSan™ ble det identifisert peptider etter *in vitro* fordøyelse med HGJ i pelleter fra 30 % og 80 % am.sulfat presipitering og fra frysetørket AndoSan™ i EIW (Tabell 3.4). Resultatene viste at det ble identifisert 1 peptidsekvens i pellet fra 30 % am.sulfat presipitering og EIW og 2 peptidsekvenser i pellet fra 80 % am.sulfat presipitering. Peptidsekvensene hadde en lengde på 11-15 aminosyrer og alle tilhørte proteinet aktin. Det ble ikke identifisert peptider i pellet fra 50 % am.sulfat presipitering og frysetørket AndoSan™. Det ble heller ikke identifisert peptider etter fordøyelse med HDJ.

**Tabell 3.4 Identifiserte peptider i AndoSan™ etter 30 % og 80 % am.sulfat presipitering og EIW fra frysetørket AndoSan™ etter *in vitro* fordøyelse med HGJ. Alle de identifiserte peptidene tilhørte proteinet aktin.**

Prøve	Identifiserte aminosyresekvenser fra peptider etter fordøyelse Søk mot <i>A. bisporus</i>		Peptidets aminosyre nr. i opprinnelige protein	Opprinnelig protein
	HGJ	HDJ		
AndoSan™ 30 % pellet fra am.sulfat pres.	DSGDGVTHTVPIYEG	-	154-168	Aktin
AndoSan™ 50 % pellet fra am.sulfat pres.	-	-		
AndoSan™ 80 % pellet fra am.sulfat pres.	LRVAPEEHPVL LTEAPLNPKANRE	-	94-104 105-117	Aktin
Frysetørket AndoSan™ blandet i vann (100mg/ml)	-	-		
EIW fra frysetørket AndoSan™	DSGDGVTHTVPIYEG	-	154-168	Aktin

- Ingen treff

## 4 Diskusjon

Målet med denne oppgaven har vært å undersøke proteiner i AndoSan™ og eventuelt påvise hva slags type proteiner dette er. Den eksperimentelle delen har inkludert ulike metoder for oppkonsentrering, fraksjonering og identifisering av mulige proteiner, samt *in vitro* fordøyelse med humane enzymer. AndoSan™ og frysetørket AndoSan™ har blitt brukt som utgangspunkt i alle metoder. Ut fra oppgitt innhold av komponenter i AndoSan™ består en stor del av ekstraktet av karbohydrater (89,4 g/100 g ts) og noe proteiner/glykoproteiner (2,6 g/100g ts). Studier har vist at begge disse trolig bidrar til den biologiske effekten ekstraktet har vist seg å ha (Biedron et al. 2012; Hetland et al. 2011). Når det gjelder proteindelen er i midlertid denne mindre studert enn det karbohydratdelen er, og mange spørsmål angående proteinenes betydning i AndoSan™ og AbM er fortsatt ubesvarte.

### 4.1 Proteinkonsentrasjon i AndoSan™ og ulike fraksjoner

Spektrometrisk analyse med Nanodrop (ND-1000) ble gjort på AndoSan™ og pelleter og supernatanter fra am.sulfat fraksjonene (30 %, 50 % og 80 %), samt de filtrerte supernatantene fra 30 % og 50 % am.sulfat presipitering for måling av proteinkonsentrasjon. Målingene av proteinkonsentrasjon indikerte at det fantes proteiner både i AndoSan™ og i supernatantene og pelletene fra am.sulfat presipiteringen. Mengden protein i pelletene fra am.sulfat presipiteringen økte med konsentrasjonen av mengde ammoniumsulfat tilsatt (30 % og 50 %). Dette tydet på at ved høyere konsentrasjon am.sulfat ble en høyere andel proteiner felt ut.

Mengde tørrstoff i AndoSan™ er oppgitt å være 4,5 mg/ml (Karppinen 2012) og 100 g tørrstoff er oppgitt å inneholde 2,6 g protein (Førland et al. 2011). Den målte proteinkonsentrasjon i AndoSan™ og i am.sulfat fraksjonene (Tab. 3.1) stemmer imidlertid ikke overens med dette. Det er heller ikke samsvar mellom målt proteinkonsentrasjonen i AndoSan™ og proteinkonsentrasjonen målt i am.sulfat fraksjonene. Dette gjør at det er vanskelig å trekke noen konklusjoner ut fra målingene. Spesielt gjelder dette proteinkonsentrasjonen i am.sulfat fraksjonene, da man ikke vet hvilke proteiner som i utgangspunktet fantes i AndoSan™ og som kan ha blitt presipitert ut ved de ulike am.sulfat konsentrasjonene.

Både AndoSan™ og alle ekstraktene var mer eller mindre brune i fargen og dette innvirket på proteinkonsentrasjonsmålingen. Spesielt gjaldt dette de prøvene som var mest konsentrerte. Pellet og delvis supernatant fra 80 % am.sulfat presipitering var for mørke til å analyseres. Det samme gjald for frysetørket AndoSan™, EIW og ESW. Hvilke komponenter som forårsaker denne fargen er ikke kjent, men det har tidligere blitt påvist innhold av polyfenoler både i AbM og AbM- baserte ekstrakter (Wei & Van Griensven 2008). I tillegg til å være farget, inneholdt ekstraktene et vannløselig, brunt stoff som gjorde prøvene uklare. Det er usikkert om dette stoffet var det samme som ga ekstraktene farge eller om det kunne stamme fra mycelet fra soppene i AndoSan™.

I et forsøk på å fjerne fargestoffene og polyfenolene ble Polyclar AT tilsatt AndoSan™ og de ulike am.sulfat ekstraktene. Proteinkonsentrasjonen i AndoSan™ ble målt både med og uten tilsetning av Polyclar AT. Resultatene viste ingen betydelig forskjell i proteinkonsentrasjon med og uten bruk. Fargemessig ble alle ekstraktene med Polyclar AT noe lysere selv om de fortsatt var brune. Behandlingen med Polyclar AT ble utført ved 4 ° C og pH ble ikke justert. Dette kan ha hatt innvirkning på hvor godt PVP i Polyclar AT bandt seg til polyfenolene, samt hvilke typer polyfenoler som ble bundet.

Resultatene fra målingen av proteinkonsentrasjon i AndoSan™ supernatant filtratene med MW cut-off på 3, 5 og 10 kDa viste lave verdier. Dette indikerte at det var lite proteiner igjen i supernatantene fra am.sulfat presipiteringen og at proteinene hadde blitt felt ut i pelletene.

AndoSan™ og alle ekstraktene som ble målt inneholdt en blanding av ukjente proteiner. Dette, sammen med brunfargen til ekstraktene, førte til at måling av proteinkonsentrasjon med denne metoden var høyst usikker. Fenoler absorberer UV-lys med maksimum absorbanse rundt 220nm og 280nm (Naczki & Shahidi 2004). Mange proteiner, spesielt de med innhold av aromatiske aminosyrer, absorberer UV lys ved samme bølgelengde. Hvis fargen på ekstraktene skyldtes fenoler, vil dette mest sannsynlig ha hatt innvirkning på målingene.

#### 4.2 Proteinprofil og identifisering av proteiner i AndoSan™ og ulike fraksjoner

Proteinprofilen til proteinene i AndoSan™ og de ulike fraksjonene ble analysert med SDS-PAGE inkl. farging av proteinbånd. Geler med ulik mengde polyakrylamid ble benyttet siden mengde og størrelse på proteinene var ukjent. Gelene som ble brukt var fra Bio-Rad (12 % og any kD) og Amersham/GE Healthcare (8-16 %) og proteinbåndene ble farget med CBB og/eller 0,1 % sølvnitrat. Identifisering av proteiner i de ulike fraksjonene ble videre utført ved at de mest fremtredende proteinbåndene fra SDS-PAGE gelene ble klippet ut og trypsinert før LC-MS analyse og Mascot databasesøk ble utført.

Generelt sett ble flere proteinbånd påvist etter separering i Bio-Rad any kD gelene sammenlignet med 12 % gelene og Amersham/GE healthcare (8-16 %) gelen. Any kD gelen inneholdt en jevn, ukjent konsentrasjon polyakrylamid og hadde en deteksjonsgrense på 10-200 kDa, mens 12 % gelen hadde en deteksjonsgrense på 20-120 kDa (Bio-Rad Laboratories Inc u.d). Samtidig resulterte fargingen med CBB i få bånd. Dette kan tyde på at proteinkonsentrasjonen i AndoSan™ og de ulike ekstraktene var for lav til at bånd kunne detekteres med CBB, da denne metoden har en deteksjonsgrense på 50-100 ng (Shevchenko et al. 1996). Farging med 0,1 % sølvnitrat resulterte derimot i flere bånd og proteinene hadde ulik MW. Dette var som forventet da man ved sølvfarging kan påvise proteiner med konsentrasjon helt ned til 1-10 ng (Shevchenko et al. 1996). Utprøving av de to ulike prøvebufferene viste ingen forskjell i deteksjon av proteinbånd.

I den opprinnelige AndoSan™ løsningen ble det ikke detektert proteinbånd, verken med CBB eller sølvfarging. I de ulike am.sulfat konsentrasjonene fra AndoSan™ derimot ble det detektert proteinbånd, spesielt i pelletene. Etter farging med CBB ble det detektert proteinbånd med en MW på < 14,4 kDa i alle pelletene fra am.sulfat presipiteringen. Proteinbåndene var minst fremtredende i pellet fra 30 % am.sulfat presipitasjon og ble gradvis sterkere etter presipitasjon med 50 % og 80 % am.sulfat. Dette indikerte at flere proteiner ble presipitert fra AndoSan™ ved bruk av 80 % am.sulfat sammenlignet med 30 % konsentrasjon.

Et proteinbånd med MW på 30 kDa ble detektert i alle pelletene og i supernatant fra 30 % am.sulfat presipitering, samtidig som to tydelige proteinbånd med en MW på litt over 97 kDa ble detektert i pellet fra både 30 % og 50 % am.sulfat presipitasjon. Også to bånd med MW på ca. 66 og 21 kDa ble påvist i pellet fra 50 % am.sulfat presipitasjon. Få proteinband ble detektert i supernatantene fra am.sulfat presipiteringen. Dette stemte overens med proteinkonsentrasjonen og proteinprofilen til AndoSan™ filtratene etter filtrering med ulik MW cut-off (Tab.3.2 og Fig.3.2).

Identifiseringen av proteiner i de nevnte proteinbåndene viste at endo-xylanase, glykosid hydrolase familie 10 og beta tubulin ble identifisert i proteinbåndene med MW på 14,4 kDa, mens aktin, aktin-lik protein og histon H4 ble identifisert i båndene med MW på 30, 66 og rundt 97 kDa.

I fraksjonene med frysetørket AndoSan™ ble det detektert flere lavmolekylære proteinbånd med MW < 14,4 kDa, flere bånd med MW på 30 kDa og noen høymolekylære bånd med MW på over 97 kDa. Fra vann-og etanolekstraksjonen ble det kun detektert proteinbånd i etanoluløselig ekstrakt (EIW). Identifiseringen av proteiner i disse proteinbåndene viste at endo-xylanase befant seg i båndene med MW på 14,4 kDa samtidig som histon H4 i tillegg ble identifisert i båndet fra EIW med MW på over 97 kDa.

Resultatene fra identifiseringen viste tydelig at noen av proteinene kun ble påvist i visse am.sulfat fraksjoner fra AndoSan™, mens andre fantes i mange av fraksjonene, både der AndoSan™ og frysetørket AndoSan™ var brukt (Tabell 3.3). Eksempelvis ble aktin og aktin-lik protein kun identifisert i pelletene fra 30 % og 50 % am.sulfat fraksjoner, mens endo-xylanase ble identifisert i alle fraksjonene. Det ble også identifisert ulike proteiner i proteinbåndene med MW på 30 kDa, som ble detektert gjentagende ganger i ulike fraksjoner. Dette indikerer at AndoSan™ kan inneholde flere proteiner med MW på ca. 30 kDa. Et tilsvarende proteinbånd har blitt påvist tidligere fra et AbM ekstrakt (Jeurink et al. 2008). Om dette proteinbåndet inneholder de samme proteinene som er blitt identifisert i denne oppgaven er imidlertid usikkert, da en annen ekstraksjonsmetode ble brukt i studien til Jeurink et al. (2008).



Ingen av proteinene som ble nevnt innledningsvis har blitt identifisert i oppgaven (avsnitt 1.4.3). Dette inkluderer lektin, som tidligere har blitt påvist i AbM ekstrakter (Kawagishi et al. 1988) og laccase, et protein med MW på 66 kDa som tidligere er identifisert fra AbM (Ullrich et al. 2005). Proteinene som er blitt identifisert fra de ulike AndoSan™ fraksjonene er imidlertid konserverte proteiner som også er blitt påvist i sopp.

Aktin er et protein med en MW på ca. 42 kDa som finnes i cytoplasma til alle eukaryote celler, inkludert sopp. Det er involvert i flere viktige prosesser i soppceller, blant annet bevegelse av organeller, celledeling og struktur (Goodson & Hawse 2002; Walker & Garrill 2006). Aktin-likte protein tilhører aktin familien og finnes i nukleus hos eukaryote celler. Det er assosiert med kromatin modellering og transkripsjon, samt DNA reparering (Goodson & Hawse 2002). Beta-tubulin er et annet protein som finnes i alle eukaryote celler og utgjør tubulofilamentene i en celle, sammen med alfa-tubulin. Tubulofilamentene har mange av de samme oppgavene som aktin (Hollomon et al. 1998). Histon H4 er en del av et såkalt kjernehiston, som består av flere subenheter (H2A/H2B, H3 og H4). Funksjonene til histonene er å pakke DNA i nukleosomer i kjernen og det er i den forbindelse også med på gen regulering. Histon H4 har en MW på 11 kDa (Thatcher & Gorovsky 1994). Glykosid hydrolase fam.10 og endo-xylanase er enzymer involvert i hydrolyse av glykosidbindinger i polysakkarider. Av xylanasene er det blitt identifisert mange typer og disse varierer i molekylvekt avhengig av hvilken soppart de tilhører (Ng 2004). Siden xylanase ble påvist i proteinbånd med MW på både 97 og < 14.4 kDa kan det kanskje stamme fra ulike typer sopp, for eksempel de tre soppene i AndoSan™.

I et Mascot databasesøk blir det søkt gjennom databaser med kjente genomer og i dette tilfellet ble taksonomien satt til ”other fungi” og *Agaricus bisporus*. Som nevnt innledningsvis inneholder AndoSan™ tre sopper, 80 % AbM, 15 % *Hericiium erinaceum* og 3 % *Grifola frondosa* (Hetland et al. 2011). Siden ingen av disse har kjent genom det usikkert hvilken av disse tre soppene de identifiserte proteinene kan tilhøre. AndoSan™ inneholder imidlertid mest AbM (80 %) så det er grunn til å anta at flere av de identifiserte proteinene stammer fra denne.

Alle proteinene ble identifisert basert på peptid-treff mellom peptider fra de ulike AndoSan™ fraksjonene og kjente peptider i en database. Ut fra dette genererte Mascot programmet såkalte scoreverdier, både for peptid-treffene og for de foreslåtte proteinene. Jo høyere scoreverdi, jo større sannsynlighet for rett treff (Steen & Mann 2004). Peptidene som lå til grunn for protein identifiseringen hadde lav "sequence coverage" med de kjente peptidene i databasen. Dette betydde at prøvenes peptider passet overens med en relativ liten del av den kjente peptid sekvensen. Prøver fra sølvfargede bånd hadde lavere "sequence coverage" enn det CBB fargede bånd hadde, noe som igjen kan ha sammenheng med proteinkonsentrasjonen i de ulike proteinbåndene. Det var også dårlig samsvar mellom proteinenes teoretiske MW og plassering av proteinbåndene i de ulike SDS-PAGE gelene. For de proteinene som hadde større teoretisk MW enn det plassering i gelen tilsvarte, kan det tenkes at fragmenter/peptider av proteinet kan ha blitt detektert på SDS-PAGE gelen. Dette kan forklare hvorfor molekylvekten ikke stemmer overens. For proteiner med mindre teoretisk MW enn det plasseringen i gelen tilsvarte derimot, er det vanskeligere å finne en forklaring og dette gjør identifiseringen usikker. Både peptid- og protein-scorene lå imidlertid godt over den signifikante verdien som var satt for alle proteinene som ble identifisert og de nevnte proteinene var de med høyest score-verdi.

#### **4.3 *In vitro* fordøyelse av AndoSan™ med humane fordøyelsesenzymer**

*In vitro* fordøying med humane fordøyelsesenzymer ble utført på AndoSan™ fraksjonene som hadde det høyeste innholdet av proteiner basert på SDS-PAGE analysen. Dette betydde at AndoSan™ og pelletene fra am.sulfat presipitering, samt frysetørket AndoSan™ og EIW ble fordøyd. Endringer i proteinprofil i de fordøyde fraksjonene sammenlignet med de ufordøyde ble analysert med SDS-PAGE, og peptider dannet etter fordøyelsen med mage- (HGJ) og duodenal (HDJ) juice ble identifisert med LC-MS og Mascot databasesøk.

Proteinprofilene til de fordøyde prøvene viste at proteinene i pelletene fra de ulike am.sulfat fraksjonene ble nedbrutt etter fordøyelse, både etter fordøying med HGJ og HDJ. I AndoSan™, frysetørket AndoSan™ og EIW ble det derimot ikke detektert noen proteinbånd i de ufordøyde prøvene i disse gelene (3.10). Derimot ble det observert proteinbånd fra EIW (30 kDa) på andre geler (Fig. 3.6) og ut fra disse tydet

det på at proteinbåndene ble nedbrutt etter fordøyning med HGJ og HDJ. Siden disse proteinbåndene (30 kDa) har fremkommet i tidligere geler indikerer dette at det er lite protein i denne fraksjonene og mulig årsak til at båndene ikke ble detektert er at det ble brukt kortere fremkallingstid ved sølvfargingen da de fordøyde fraksjonene inneholdt mange fordøyelsesenzymene og gelene dermed lett kunne bli overfarget. Disse fordøyelsesenzymene kunne ses tydelig i begge SDS-PAGE gelene.

Ved fordøyelse vil proteiner bli brutt ned til peptider og deretter aminosyrer, og i magesekken starter dette med pepsin og gastrisk lipase. Pepsin med pH optimum på 1,5-2, bryter peptidbånd ved hydrolyse og spesielt peptider som inneholder fenylalanin, tyrosin og leucin (Devle et al. 2014; Whitcomb & Lowe 2007). Videre fordøyelse av proteiner skjer i duodenum med enzymer fra bukspyttkjertelen og brush-border enzymer. Disse har pH optimum rundt 6,5-8. Siden det har blitt brukt humane fordøyelses enzymer tappet fra friske mennesker i dette forsøket vil sammensetning og pH variere i både HGJ og HDJ (Ulleberg et al. 2011). Dette kan ha hatt innvirkning på fordøyelsen av proteiner i AndoSan™ fraksjonene. pH ble imidlertid justert til 3 og 7, for henholdsvis HGJ og HDJ i forsøket.

Resultatene viste at det ble identifisert peptider etter fordøyelse med HGJ i pelletene fra 30 % og 80 % am.sulfat presipitering fra AndoSan™ og EIW. Peptidene tilhørte proteinet aktin og hadde en lengde på 11-15 aminosyrer. Ved LC-MS analysen kunne man kun påvise peptider med lengde over 4 aminosyrer (0.5kDa til 3.5kDa). Ved fordøyelse i duodenum vil peptidene etter hvert bli nedbrutt til mono-peptider og dette kan forklare hvorfor det ikke ble identifisert peptider etter fordøyning med HDJ (Whitcomb & Lowe 2007).

#### **4.4 Videre arbeid**

Proteinene i AndoSan™ og de ulike fraksjonene krever videre analyse, spesielt en bedre måling av proteinkonsentrasjon. Endring av pH og temperatur, ved bruk av Polyclar AT for fjerning av fargestoffer og for utfelling av proteiner med ammoniumsulfat kan med fordel prøves ut for å få et mer sikkert mål på proteinmengden i utgangsmaterialet og etter de ulike fraksjoneringene. Få peptider ble identifisert etter fordøyelse. Her kan en aminosyreanalyse si noe om hvor mye av

proteinene som var blitt nedbrutt til aminosyrer, basert på en sikrere proteinbestemmelse. Ulempen ved metoden som er benyttet her er det lave proteininnholdet og fargestoffene i AndoSan™. Om de identifiserte proteinene og peptidene kan være av betydning med tanke på AndoSan™ og virkningsmekanismer rettet mot immunforsvaret og kreft, er usikkert. For å kunne si noe mer om dette må de identifiserte proteinene og peptidene testes mer spesifikt. For eksempel hadde det vært interessant å undersøke om peptidene som ble identifisert etter *in vitro* fordøyingen, har noen effekt på kreftceller.

## 5 Konklusjon

Målet med denne oppgaven var å undersøke proteindelen av det medisinske soppekstraktet AndoSan™. Dette har blitt gjort ved fraksjonering, oppkonsentrering og uttesting av ulike proteinanalyser. Proteinanalysene inkluderte måling av proteinkonsentrasjon, proteinprofiler, identifisering av proteiner og *in vitro* fordøyelse med humane fordøyelsesenzymer.

Arbeidet resulterte i at det ble påvist proteiner i mange av de ulike fraksjonene, både der AndoSan™ og frysetørret AndoSan™ var brukt som utgangspunkt. Proteinene ble påvist både som proteinbånd i ulike SDS geler og identifisert ved LC-MS. Proteinbåndene hadde ulik molekylvekt og mange ble påvist ved 14,4 kDa, 30 kDa og 97 kDa. Det ble identifiserte flere proteiner i disse båndene, blant annet aktin, histon H4 og endo-xylanase. Etter *in vitro* fordøyelse ble det kun identifisert noen få peptider med sekvenser fra aktin etter fordøyelse med human mage juice (HGJ). Ingen peptider ble funnet etter fordøyelse med duodenal juice (HDJ) og mest sannsynlig er disse for små (< 05 kDa) til å bli identifisert ved LC-MS.

Selv om det ble påvist proteiner og peptider i AndoSan™ tydet analysene på at proteinkonsentrasjonen var lav. Samtidig hadde flere av resultatene store usikkerhetsmomenter. Spesielt gjaldt dette resultatene fra målingen av proteinkonsentrasjon og resultatene fra identifiseringen av proteiner og peptider ved LC-MS og Mascot databasesøk. Videre analysering er derfor nødvendig for å kunne si noe mer sikkert angående proteindelen i AndoSan™.

## Referanser

- Akiyama, H., Endo, M., Matsui, T., Katsuda, I., Emi, N., Kawamoto, Y., Koike, T. & Beppu, H. (2011). Agaritine from *Agaricus blazei* Murrill induces apoptosis in the leukemic cell line U937. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1810 (5): 519-525.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2008). *Molecular biology of the cell*. 5. utg. New York: Garland Science. 952-953 s.
- Allwood, J. W. & Goodacre, R. (2010). An introduction to liquid chromatography–mass spectrometry instrumentation applied in plant metabolomic analyses. *Phytochemical Analysis*, 21 (1): 33-47.
- Ball, D. W., Hill, J. W. & Scott, R. J. (2011). *The Basics of General, Organic, and Biological Chemistry*, v. 1.0.
- Basic molecular scheme of fungal beta glucan triple helix of beta glucan with anticancer effect*. (u.d). Tilgjengelig fra: <http://immunomedic.com/category/about-beta-glucan/> (lest 04.05.2014).
- Biedron, R., Tangen, J., Maresz, K. & Hetland, G. (2012). *Agaricus blazei* Murill-immunomodulatory properties and health benefits. *scientific world*, 1: 2.
- Bio-Rad Laboratories Inc. (u.d). *Mini-PROTEAN Precast Gels, Instruction Manual and Application Guide*. Tilgjengelig fra: <http://classes.soe.ucsc.edu/bme220l/Spring11/Reading/biorad-precasterSDSpag.pdf> (lest 04.05.2014).
- Bloch, K. E. (1983). Sterol, Structure and Membrane Functio. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 14 (1): 47-92.
- Burtis, C. A., Ashwood, E. R. & Bruns, D. E. (2008). *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*. 6. utg.: Saunders Elsevier. 112-113 s.
- Carrizo, M. E., Capaldi, S., Perduca, M., Irazoqui, F.J., Nores, G.A., Monaco, H.L. (2004). *Image of PDB 1Y2T Crystal structure of the common edible mushroom (Agaricus bisporus) lectin*. Tilgjengelig fra: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1Y2T> (lest 04.05.2014).
- Chan, G., Chan, W. K. & Sze, D. (2009). The effects of beta-glucan on human immune and cancer cells. *J Hematol Oncol*, 2: 25.
- Chevallet, M., Luche, S. & Rabilloud, T. (2006). Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nature protocols*, 1 (4): 1852-1858.
- Devle, H., Ulleberg, E. K., Naess-Andresen, C. F., Rukke, E.-O., Vegarud, G. & Ekeberg, D. (2014). Reciprocal interacting effects of proteins and lipids during ex vivo digestion of bovine milk. *International Dairy Journal*, 36 (1): 6-13.
- Dixon, M. & Webb, E. C. (1979). *Enzymes*. 3 utg. New York: Academic Press.
- Dupont, S., Lemetais, G., Ferreira, T., Cayot, P., Gervais, P. & Beney, L. (2012). ERGOSTEROL BIOSYNTHESIS: A FUNGAL PATHWAY FOR LIFE ON LAND? *Evolution*, 66 (9): 2961-2968.
- Ellertsen, L. K. & Hetland, G. (2009). An extract of the medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murill can protect against allergy. *Clinical and Molecular Allergy*, 7 (6): 1-10.
- EnCor Biotechnology Inc. (2014). *Ammonium Sulfate Calculator*. Tilgjengelig fra: <http://www.encorbio.com/protocols/AM-SO4.htm> (lest 07.05.2014).
- Englard, S. & Seifter, S. (1990). [22] Precipitation techniques. I: Murray, P. D. (red.) b. Volume 182 *Methods in Enzymology*, s. 285-300: Academic Press.

- Firenzuoli, F., Gori, L. & Lombardo, G. (2008). The medicinal mushroom *Agaricus blazei murrill*: review of literature and pharmaco-toxicological problems. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 5 (1): 3-15.
- Foss, A. (u.d). *Soppens bygning*. Tilgjengelig fra: <http://www.miljolare.no/tema/planterogdyr/artikler/sopp/soppensbygning.php> (lest 04.05.2014).
- Fujimiya, Y., Suzuki, Y., Oshiman, K.-i., Kobori, H., Moriguchi, K., Nakashima, H., Matumoto, Y., Takahara, S., Ebina, T. & Katakura, R. (1998). Selective tumoricidal effect of soluble proteoglycan extracted from the basidiomycete, *Agaricus blazei* Murill, mediated via natural killer cell activation and apoptosis. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 46 (3): 147-159.
- Førland, D. T., Johnson, E., Tryggestad, A. M. A., Lyberg, T. & Hetland, G. (2010). An extract based on the medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murill stimulates monocyte-derived dendritic cells to cytokine and chemokine production in vitro. *Cytokine*, 49 (3): 245-250.
- Førland, D. T., Johnson, E., Sætre, L., Lyberg, T., Lygren, I. & Hetland, G. (2011). Effect of an Extract Based on the Medicinal Mushroom *Agaricus blazei* Murill on Expression of Cytokines and Calprotectin in Patients with Ulcerative Colitis and Crohn's disease. *Scandinavian Journal of Immunology*, 73 (1): 66-75.
- Gao, L., Sun, Y., Chen, C., Xi, Y., Wang, J. & Wang, Z. (2007). Primary mechanism of apoptosis induction in a leukemia cell line by fraction FA-2-b-ss prepared from the mushroom *Agaricus blazei* Murill. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 40 (11): 1545-1555.
- Glenn, J. L., Kuo, C. C., Durley, R. C. & Pharis, R. P. (1972). Use of insoluble polyvinylpyrrolidone for purification of plant extracts and chromatography of plant hormones. *Phytochemistry*, 11 (1): 345-351.
- Gonzaga, M. L. C., Bezerra, D. P., Alves, A. P. N. N., de Alencar, N. M. N., de Oliveira Mesquita, R., Lima, M. W., de Aguiar Soares, S., Pessoa, C., de Moraes, M. O. & Costa-Lotufo, L. V. (2009). In vivo growth-inhibition of Sarcoma 180 by an  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-glucan- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-glucan-protein complex polysaccharide obtained from *Agaricus blazei* Murill. *Journal of natural medicines*, 63 (1): 32-40.
- Goodson, H. V. & Hawse, W. F. (2002). Molecular evolution of the actin family. *Journal of cell science*, 115 (13): 2619-2622.
- Green, A. A. & Hughes, W. L. (1955). [10] Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic solvents. I: b. Volume 1 *Methods in Enzymology*, s. 67-90: Academic Press.
- Guerra, A., Etienne-Mesmin, L., Livrelli, V., Denis, S., Blanquet-Diot, S. & Alric, M. (2012). Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends in Biotechnology*, 30 (11): 591-600.
- Hajšlová, J., Hájková, L., Schulzová, V., Frandsen, H., Gry, J. & Andersson, H. C. (2002). Stability of agaritine - a natural toxicant of *Agaricus* mushrooms. *Food Additives & Contaminants*, 19 (11): 1028-1033.
- Hetland, G., Johnson, E., Lyberg, T., Bernardshaw, S., Tryggestad, A. M. A. & Grinde, B. (2008). Effects of the Medicinal Mushroom *Agaricus blazei* Murill on Immunity, Infection and Cancer. *Scandinavian Journal of Immunology*, 68 (4): 363-370.
- Hetland, G., Johnson, E., Lyberg, T. & Kvalheim, G. (2011). The mushroom *Agaricus blazei* Murill elicits medicinal effects on tumor, infection, allergy, and

- inflammation through its modulation of innate immunity and amelioration of Th1/Th2 imbalance and inflammation. *Advances in pharmacological sciences*, 2011: 157015.
- Hetland, G., Johnson, E., Eide, D., Grinde, B., Samuelsen, A. & Wiker, H. (2013). Antimicrobial effects of  $\beta$ -glucans and pectin and of the *Agaricus blazei*-based mushroom extract, AndoSan™. Examples of mouse models for pneumococcal-, fecal bacterial-, and mycobacterial infections.
- Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P. M., Lücking, R., et al. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, 111 (5): 509-547.
- Hirotsani, M., Kaneko, A., Asada, Y. & Yoshikawa, T. (2000). Biosynthesis of blazeispirol A, an unprecedented skeleton from the cultured mycelia of the fungus *Agaricus blazei*. *Tetrahedron Letters*, 41 (32): 6101-6104.
- Hirotsani, M., Sai, K., Hirotsani, S. & Yoshikawa, T. (2002). Blazeispirols B, C, E and F, des-A-ergostane-type compounds, from the cultured mycelia of the fungus *Agaricus blazei*. *Phytochemistry*, 59 (5): 571-577.
- Hollomon, D. W., Butters, J. A., Barker, H. & Hall, L. (1998). Fungal  $\beta$ -tubulin, expressed as a fusion protein, binds benzimidazole and phenylcarbamate fungicides. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 42 (9): 2171-2173.
- Holm, H., Hanssen, L. E., Krogdahl, A. & Florholmen, J. (1988). High and low inhibitor soybean meals affect human duodenal proteinase activity differently: in vivo comparison with bovine serum albumin. *The Journal of nutrition*, 118 (4): 515.
- Hustoft, H. K., Malerod, H., Wilson, S. R., Reubsæet, L., Lundanes, E. & Greibrokk, T. (2012). *A Critical Review of Trypsin Digestion for LC-MS Based Proteomics*. Rijeka, Croatia: Integrative Proteomics. Tilgjengelig fra: <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/29629.pdf> (lest 12.05.2014).
- Itoh, H., Ito, H. & Hibasami, H. (2008). Blazein of a new steroid isolated from *Agaricus blazei* Murrill (himematsutake) induces cell death and morphological change indicative of apoptotic chromatin condensation in human lung cancer LU99 and stomach cancer KATO III cells. *Oncology reports*, 20 (6): 1359-1361.
- Iwasaki, A. & Medzhitov, R. (2010). Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science*, 327 (5963): 291-295.
- Jasinghe, V. J. & Perera, C. O. (2005). Distribution of ergosterol in different tissues of mushrooms and its effect on the conversion of ergosterol to vitamin D<sub>2</sub> by UV irradiation. *Food chemistry*, 92 (3): 541-546.
- Jensen, E. C. (2012). The Basics of Western Blotting. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, 295 (3): 369-371.
- Jeurink, P. V., Noguera, C. L., Savelkoul, H. F. & Wichers, H. J. (2008). Immunomodulatory capacity of fungal proteins on the cytokine production of human peripheral blood mononuclear cells. *International immunopharmacology*, 8 (8): 1124-1133.
- Jin, C.-Y., Choi, Y. H., Moon, D.-O., Park, C., Park, Y.-M., Jeong, S.-C., Heo, M.-S., Lee, T.-H., Lee, J.-D. & Kim, G.-Y. (2006). Induction of G2/M arrest and apoptosis in human gastric epithelial AGS cells by aqueous extract of *Agaricus blazei*. *Oncology reports*, 16 (6): 1349-1355.
- Johnson, E., Førland, D. T., Sætre, L., Bernardshaw, S. V., Lyberg, T. & Hetland, G. (2009). Effect of an Extract Based on the Medicinal Mushroom *Agaricus*

- blazei Murill on Release of Cytokines, Chemokines and Leukocyte Growth Factors in Human Blood Ex Vivo and In Vivo. *Scandinavian Journal of Immunology*, 69 (3): 242-250.
- Johnson, E., Førland, D. T., Hetland, G., Sætre, L., Olstad, O. K. & Lyberg, T. (2012). Effect of AndoSan™ on expression of adhesion molecules and production of reactive oxygen species in human monocytes and granulocytes in vivo. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 47 (8-9): 984-992.
- Karppinen, P. K. (2012). *Search for biologically active compounds in AndoSan™, a medicinal mushroom extract*. Ås: Universitetet for miljø og biovitenskap Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap. 93 s.
- Katajamaa, M. & Orešič, M. (2005). Processing methods for differential analysis of LC/MS profile data. *BMC bioinformatics*, 6 (1): 179.
- Kawagishi, H., Nomura, A., Yumen, T., Mizuno, T., Hagiwara, T. & Nakamura, T. (1988). Isolation and properties of a lectin from the fruiting bodies of *Agaricus blazei*. *Carbohydrate Research*, 183 (1): 150-154.
- Kawagishi, H., Inagaki, R., Kanao, T., Mizuno, T., Shimura, K., Ito, H., Hagiwara, T. & Nakamura, T. (1989). Fractionation and antitumor activity of the water-insoluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. *Carbohydrate Research*, 186 (2): 267-273.
- Kawagishi, H., Kanao, T., Inagaki, R., Mizuno, T., Shimura, K., Ito, H., Hagiwara, T. & Nakamura, T. (1990). Formolysis of a potent antitumor (1→6)-β-D-glucan-protein complex from *Agaricus blazei* fruiting bodies and antitumor activity of the resulting products. *Carbohydrate Polymers*, 12 (4): 393-403.
- Koge, T., Komatsu, W. & Sorimachi, K. (2011). Heat stability of agaritine in water extracts from *Agaricus blazei* and other edible fungi, and removal of agaritine by ethanol fractionation. *Food Chemistry*, 126 (3): 1172-1177.
- Kornfeld, R. & Kornfeld, S. (1976). Comparative aspects of glycoprotein structure. *Annual review of biochemistry*, 45 (1): 217-238.
- Lea, T. (2006). *Immunologi og immunologiske teknikker*. 3. utg. Bergen: Fagbokforlaget. 22-33, 51-54, 59-66, 125-126, 133, 147-148 s.
- Loomis, W. D., Lile, J. D., Sandstrom, R. P. & Burbott, A. J. (1979). Adsorbent polystyrene as an aid in plant enzyme isolation. *Phytochemistry*, 18 (6): 1049-1054.
- Luche, S., Santoni, V. & Rabilloud, T. (2003). Evaluation of nonionic and zwitterionic detergents as membrane protein solubilizers in two-dimensional electrophoresis. *PROTEOMICS*, 3 (3): 249-253.
- Mangla, M., Suresh, C. & Shachi, S. (2012). Health Benefits of Medicinal Mushroom *Agaricus subrufescens*.
- Matrix Science. (2013). *MS/MS Results Interpretation*. Tilgjengelig fra: [http://www.matrixscience.com/help/interpretation\\_help.html](http://www.matrixscience.com/help/interpretation_help.html) (lest 04.05.2014).
- Miles, P. G. & Chang, S.-T. (2004). *Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact*: CRC press.
- Millipore. (2012). *Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Devices, User Guide*. Tilgjengelig fra: [http://www.millipore.com/userguides/files/centrifugal/\\$file/PR03520TR\\_Rev\\_A\\_English.pdf](http://www.millipore.com/userguides/files/centrifugal/$file/PR03520TR_Rev_A_English.pdf) (lest 04.05.2014).
- Millipore. (2013). *Microcon Centrifugal Filter Devices, User Guide*. Tilgjengelig fra: <http://www.millipore.com/userguides.nsf/a73664f9f981af8c852569b9005b4ee>



- e/3fceb0b16e745f785257a40006cd815/\$FILE/PR04305.pdf (lest 04.05.2014).
- Mizuno, T., Hagiwara, T., Nakamura, T., Ito, H., Shimura, K., Sumiya, T. & Asakura, A. (1990). Antitumor Activity and Some Properties of Water-soluble Polysaccharides from "Himematsutake," the Fruiting Body of *Agaricus blazei* Murill (Biological Chemistry). *Agricultural and Biological Chemistry*, 54 (11): 2889-2896.
- Mizuno, T. (1995). Kawariharatake, *Agaricus blazei* Murill: Medicinal and dietary effects. *Food Reviews International*, 11 (1): 167-172.
- Naczek, M. & Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054 (1): 95-111.
- Ng, T. (2004). Peptides and proteins from fungi. *Peptides*, 25 (6): 1055-1073.
- Ohno, N., Furukawa, M., Miura, N. N., Adachi, Y., Motoi, M. & Yadomae, T. (2001). Antitumor  $\beta$ -glucan from the cultured fruit body of *Agaricus blazei*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 24 (7): 820-828.
- Perkins, D. N., Pappin, D. J. C., Creasy, D. M. & Cottrell, J. S. (1999). Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *ELECTROPHORESIS*, 20 (18): 3551-3567.
- Polson, C., Sarkar, P., Incledon, B., Raguvaran, V. & Grant, R. (2003). Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 785 (2): 263-275.
- Roupas, P., Keogh, J., Noakes, M., Margetts, C. & Taylor, P. (2010). Mushrooms and agaritine: A mini-review. *Journal of Functional Foods*, 2 (2): 91-98.
- Ryan, E. J., Daly, L. M. & Mills, K. H. G. (2001). Immunomodulators and delivery systems for vaccination by mucosal routes. *Trends in Biotechnology*, 19 (8): 293-304.
- Shephard, S. & Schlatter, C. (1998). Covalent Binding of Agaritine to DNA In Vivo. *Food and chemical toxicology*, 36 (11): 971-974.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. & Mann, M. (1996). Mass Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver-Stained Polyacrylamide Gels. *Analytical Chemistry*, 68 (5): 850-858.
- Shevchenko, A., Henrik Tomas, J. H., sbreve, Olsen, J. V. & Mann, M. (2007). In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature protocols*, 1 (6): 2856-2860.
- Smith, R., Ventura, D. & Prince, J. T. (2013). LC-MS alignment in theory and practice: a comprehensive algorithmic review. *Briefings in Bioinformatics*.
- Steen, H. & Mann, M. (2004). The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5 (9): 699-711.
- Stevens, F. (u.d). *Agaricus subrufescens*. Tilgjengelig fra: [http://www.mykoweb.com/CAF/species/Agaricus\\_subrufescens.html](http://www.mykoweb.com/CAF/species/Agaricus_subrufescens.html) (lest 04.05.2014).
- Takimoto, H., Kato, H., Kaneko, M. & Kumazawa, Y. (2008). Amelioration of skewed Th1/Th2 balance in tumor-bearing and asthma-induced mice by oral administration of *Agaricus blazei* extracts. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, 30 (4): 747-760.
- Tangen, J.-M., Tryggestad, A. & Hetland, G. (2014). Stimulation of human monocyte cells by the medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murill induces expression of cell surface markers associated with activation and antigen presentation. *Applied Scientific Reports*, 1 (1): 1.

- Thatcher, T. H. & Gorovsky, M. A. (1994). Phylogenetic analysis of the core histones H2A, H2B, H3, and H4. *Nucleic acids research*, 22 (2): 174-179.
- Thermo Scientific. (2008). *NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.7 User's Manual*. Tilgjengelig fra: <http://www.nanodrop.com/library/nd-1000-v3.7-users-manual-8.5x11.pdf> (lest 04.05.2014).
- Tryggestad, A. M. A., Espevik, T., Ryan, L. & Hetland, G. (2013). The medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murill promotes NF- $\kappa$  B activation via stimulation of TLR2 and inhibits its activation via TLR4. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Sciences*, 4 (2).
- Ulleberg, E. K., Comi, I., Holm, H., Herud, E. B., Jacobsen, M. & Vegarud, G. E. (2011). Human gastrointestinal juices intended for use in in vitro digestion models. *Food digestion*, 2 (1-3): 52-61.
- Ullrich, R., Dung, N. L. & Hofrichter, M. (2005). Laccase from the medicinal mushroom *Agaricus blazei*: production, purification and characterization. *Applied microbiology and biotechnology*, 67 (3): 357-363.
- Walker, S. K. & Garrill, A. (2006). Actin microfilaments in fungi. *Mycologist*, 20 (1): 26-31.
- Walton, K., Coombs, M., Catterall, F., Walker, R. & Ioannides, C. (1997). Bioactivation of the mushroom hydrazine, agaritine, to intermediates that bind covalently to proteins and induce mutations in the Ames test. *Carcinogenesis*, 18 (8): 1603-1608.
- Wang, H., Ng, T. B. & Ooi, V. E. (1998). Lectins from mushrooms. *Mycological Research*, 102 (08): 897-906.
- Weete, J. D., Abril, M. & Blackwell, M. (2010). Phylogenetic distribution of fungal sterols. *PLoS One*, 5 (5): e10899.
- Wei, S. & Van Griensven, L. J. (2008). Pro-and Antioxidative Properties of Medicinal Mushroom Extracts. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 10 (4): 315-324.
- Whitcomb, D. C. & Lowe, M. E. (2007). Human pancreatic digestive enzymes. *Digestive diseases and sciences*, 52 (1): 1-17.
- Wong, J. H., Ng, T., Cheung, R. C., Ye, X., Wang, H., Lam, S., Lin, P., Chan, Y., Fang, E. F. & Ngai, P. H. (2010). Proteins with antifungal properties and other medicinal applications from plants and mushrooms. *Applied microbiology and biotechnology*, 87 (4): 1221-1235.
- Worthington Biochemical Corporation. (2014). *Trypsin*. Tilgjengelig fra: <http://www.worthington-biochem.com/try/images/reaction.jpg> (lest 08.05.2014).
- Wu, B., Cui, J., Zhang, C. & Li, Z. (2012). A polysaccharide from *Agaricus blazei* inhibits proliferation and promotes apoptosis of osteosarcoma cells. *International journal of biological macromolecules*, 50 (4): 1116-1120.
- Xu, X., Yan, H., Chen, J. & Zhang, X. (2011). Bioactive proteins from mushrooms. *Biotechnology advances*, 29 (6): 667-674.
- Yeagle, P. L. (2010). *The structure of biological membranes*: CRC press.
- Zellner, M., Winkler, W., Hayden, H., Diestinger, M., Eliassen, M., Gesslbauer, B., Miller, I., Chang, M., Kungl, A. & Roth, E. (2005). Quantitative validation of different protein precipitation methods in proteome analysis of blood platelets. *Electrophoresis*, 26 (12): 2481-2489.

## Vedlegg 1

### Kjemikalier

<b>Navn:</b>	<b>Leverandør:</b>
Ammonium sulfat(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Merck
Polyclar AT (polyvinylpyrrolidone insoluble)	BDH Chemicals Ctd Poole England
Etanol 96%	VWR
Metanol 100%	Merck
Sølvnitrat	Merck
Natriumkarbonat	Merck
Eddiksyre	Merck
Natrium thiosulfatpentahydrat	Sigma A.
Formaldehyd	Merck
MilliQ H <sub>2</sub> O	MilliQ
Trifluoroeddiksyre (TFA)	Sigma A.
Aceton nitril (ACN)	Sigma A.
Tris-base	Sigma A.
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Sigma A
Glycine	Sigma A.
Glyserol	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Sigma A.
Bromfenolblå	Bio-Rad
Coomassie R-250	Bio-Rad
Saltsyre (HCl)	Merck
NaOH	Merck
Urea	Sigma A.

## Vedlegg 2

### Løsninger

#### **SDS-PAGE:**

#### **Innhold:**

**5x prøvebuffer med 8M Urea pH 6,8**

0,313 M Tris-HCl, pH 6,8  
10 % (v/v) SDS  
50 % (v/v) glyserol  
5 % DTT  
Bromfenolblå  
8M urea (0,48 g/ml)  
dH<sub>2</sub>O

#### **Sølvfarging:**

**Fikseringsløsning**

50 % (v/v) metanol  
5 % (v/v) eddik syre  
MilliQ H<sub>2</sub>O

**50 % Etanolvask**

50 % (v/v) etanol  
MilliQ H<sub>2</sub>O

**Hypoløsning**

0,02 % Sodium thiosulfatpentahydrat  
MilliQ H<sub>2</sub>O

**0,1 % sølvnitrat løsning**

0,1 % sølvnitrat  
MilliQ H<sub>2</sub>O

**Fremkallingsløsning**

0,2 % Natrium karbonat  
0,04 % (v/v) Formaldehyd  
MilliQ H<sub>2</sub>O

**Stoppløsning**

5 % (v/v) Eddiksyre

MilliQ H<sub>2</sub>O**Oppbevaringsløsning**

1 % (v/v) Eddiksyre

MilliQ H<sub>2</sub>O**C18 kolonner****0,1 % TFA**

0,1 % (v/v) TFA

MilliQ H<sub>2</sub>O**Elueringsløsning**

30 %-0,1 % TFA

70 % ACN

MilliQ H<sub>2</sub>O



Norges miljø- og  
biovitenskapelige  
universitet

Postboks 5003  
NO-1432 Ås  
67 23 00 00  
[www.nmbu.no](http://www.nmbu.no)