PRAKTIKUM PCR, ELEKTROFORESIS AGAROSE DAN SDS-PAGE
(*SDS PolyAcrilamide Gel Elektroforesis*)

Tujuan: i) Menerti dan memahami teknik PCR
ii) Mengerti prinsip dasar elektroforesis
iii) Melatih teknik elektroforesis agarose dengan sampel-sampel DNA yang diperoleh dari buah dan dari jaringan manusia.
iv) Menggunakan teknik SDS-PAGE untuk memisahkan protein-protein darah.

**Kegiatan praktikum ini diadaptasi dari bahan:*

- Bagian Biokimia FKUI, 2000. Pemisahan protein dengan elektroforesis gel poliakrilamid-SDS. *Biokimia Eksperimen Laboratorium* Jakarta: Widya Medika, pp36-44
- Mordacq, J.C. & Ellington R.W. 1994. Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) of blood proteins. *Tested Studies For Laboratory Teaching* 15:*15-44*

Pendahuluan:

Protein-protein atau asam nukleat dapat dipisahkan satu dari yang lain atas dasar pebedaan muatan listrik. Pada hari ini, Anda akan diperlihatkan hasil elektroforesis DNA dengan teknik elektroforesis agarose dan memisahkan protein-protein yang sudah diisolasi dari darah dengan SDS-PAGE.

Elektroforesis agarose dapat digunakan untuk memisahkan asam nukleat (atau fragmennya) yang bermuatan negatif sesuai dengan arus listrik. Pada sistem elektroforesis tersebut, agarose merupakan bahan media yang berfungsi sebagai alas/ medium pemisah yang diletakkan antara anode dan catode alat elektroforesis. Medium pemisah tidak bergerak (fasa stationer). Molekul yang ingin dipisahkan diletakkan pada medium pemisah dan dibawa sesuai dengan muatan listrik oleh karena medium pemisah direndam dengan larutan ionik. Molekul yang besar bergerak lebih lambat dari pada molekul lebih kecil. Gel agarose disiapkan dengan ethidium bromide yang mengikat dengan DNA (*intercalater*) dan diperlihatkan warna oren kalau disinarkan dengan cahaya UV.

Protein-protein dapat dipisahkan berdasarkan berat molekul. SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate – polyacrilamide gel electrophoresis*) adalah teknik elektroforesis yang sering digunakan dalam analisis protein di laboratorium. Sempel protein denaturasi (dipanaskan) dan dicampur dengan SDS (yang merupakan detergen yang anionik) dengan akibat kompleks protein-detergen itu bermuatan negatif dan protein yang lebih besar menpunyai muatan negatif yang lebih besar.. Kompleks protein-detergen itu akan dibawa oleh medan listrik ke arah kutub positif (anoda). Gel akrilamide berfungsi sebagai dasar atau alas atas gerakan sampel protein. Konsentrasi akrilamide menentukan ukuran pori-pori gel dan ukuran pori-pori gel menentukan jarak yang ditempuh oleh kompleks protein-SDS. Jadi berapa faktor harus ditentukan untuk memaksimalkan pemisahan protein-protein melalui teknik SDS-PAGE (antara lain: kadar SDS, konsentrasi gel akrilamide dan ukuran gelnya, kemurnian sampel protein dan jumlah sampel yang diletakkan pada gel; voltage yang digunakan pada alat elektroforesis dan selama medan listrik dihidupkan).

Alat dan bahan yang dibutuhkan pada percobaan PCR

1. Forward Primer : konsentrasi 20 pmol
2. Reverse Primer : konsentrasi 20 pmol
3. dNTP's : konsentrasi akhir adalah 0,1 mM untuk setiap nukleotida (A T,G,C)
4. 10 x Buffer (10 x Konsentrasi) dengan konsentrasi MgCl2 1,5 mM
5. Aquabidest steril
6. Taq Polimerase : 0,125 μL
7. Sample DNA
8. Mineral oil (untuk menghindari penguapan
9. Therma Cycler PCR
10. UV reader

Cara kerja PCR

- Disiapkan larutan untuk beberapa orang sekaligus atau disebut dengan larutan **Mix Solution** (untuk memudahkan pekrjaan dan memperoleh ketepatan volume)
- Perhatikan penyimpanan larutan-larutan diatas, ada yang harus pada temperature -20^{o}C (Primer, dNTP's, Buffer, Taq dan bila perlu larutan DNA), oleh karena itu pada saat bekerja harus diletakan yang berisi es
- Selalu gunakan tabung dan tips yang telah disterilisasi

Contoh menyiapkan Mix Solution :

		1 sample	**12 sample**
1.	Forward Primer	0,25 µL	3 µL
2.	Reverse Primer	0,25 µL	3 µL
3.	dNTP's	0,50 µL	6 µL
4.	10 x Buffer	0,25 µL	3 µL
5.	Taq Polimerase	0,125 µL	1,5 µL
6.	Aquabidest (23-1,375)		
		21,625 µL	259,5µL
	Jumlah	23 µL	276 µL

- Siapkan 12 tabung PCR (steril), dipipetkan sebanyak 23 µL Mix Solution masukan ke masing-masing tabung PCR
- Tambahkan 2 µL larutan DNA sampel, vortex
- Jangan lupa mengikutsetakan control negative dalam setiap menjalankan PCR (control negative = tabung PCR hanya berisikan Mix Solution, tanpa penambahan larutan DNA sampel)
- Tambakan lagi sebanyak 50 µL Mineral Oil
- Tabung ditutup rapat dan susun di dalam rak/blok alat Thermal Cycler
- Atur program untuk menjalankan PCR

Cara kerja elektroforsis agarose

Alat dan bahan yang digunakan

7 sampel protein darah dari minggu yg lalu		Tris
sampel DNA sel epitelial	Protein standard SDS-PAGE	DTT
perwarna DNA (crystal violet dalam 20% gliserol)		
sarung tangan	1 N HCl	SDS
tempat buang cairan biologis	pipet otomatik	agar 2%
water bath	biru bromfenol	Na_2HPO_4
mikrosentifus	pipet tetes	gliserol
akuades		EDTA
alat elektroforesis agarose		asam borik
tabung mikrosentrifus (1,5ml)	alat elektroforesis	larutan pewarna
pipet Mohr	power supply	larutan pencuci
Erlenmeyer flask	beaker	spidol
pH meter	Hamilton syringe	penggaris (mm)
etanol absolute, dingin	vorteks	tisu
gel poliakrilamide – SDS 10%	β-merkaptoetanol	agarose
isobutanol	kertas grafik semi-log	water bath

Larutan-larutan yang perlu disiapkan:

1. **1X TBE** - setiap kelompok siapkan 1000mL (resep dibawah ini utk 1000ml)

   10.8 g Tris, 5.5 g asam borik acid, 0.74 g EDTA dimasukkan ke dalam beaker 1000 ml.

   Tambahkan 900mL akuades dan aduk dengan magnetic stirrer sampai larut. Tambahkan akuades sampai volume larutan sama dengan 1 L. Simpan di dalam botol bersih pada temperatur ruangan (bisa disimpan selama beberapa bulan).

2. **0.8% Agarose** - setiap kelompok siapkan agarose secukupnya untuk anggotanya (perlu 40ml/casting tray) – resep di bawah ini utk 125ml.

   ****Hati-hati dengan ethidium bromide – pakailah sarung tangan*****

   1 g agarose dimasukkan ke dalam beaker/flask 250 ml yang bersih. Tambahkan 125 ml larutan 1X TBE buffer solution.. Tutup flask/beaker dengan foil aluminium untuk mengurangi penguapan dan sisakan celah sedikit. Aduk secara gerakan flask. Dipanaskan sampai mendidih dan larutan jernih. Dinginkan sampai ~60˚ dan tambahkan 12µL larutan ethidium bromide/casting tray.

3. **Larutan Dapar Sampel** (50mM Tris-HCl pH 6,8; 10%(v/v) gliserol; 1% (b/v) SDS; 0,01% (b/v) biru bromfenol).
4. **Larutan Dapar Elektroda** (250mM Tris-HCl pH 6,8; 1,8M glisin; 1% (b/v) SDS).
5. **Larutan Pewarna** (0,15% Coomassie Brilliant Blue R-250; 250mL metanol; 50mL asam asetat; akuades sampai 500mL)
6. **Larutan Pencuci** (50mL metanol; 75mL asam asetat; akuades sampai 1000mL)

Bagian A – ELEKTROFORESIS GEL AGAROSE

1. Setiap mhs menyiapkan casting tray masing-masing. Pasang satu "*comb*" (sisir) pada pertengahan "*tray*" (plat cetakan) dan satu sisir lagi pada ujungnya..
2. Tuangkan ~ 40ml 0,8% agarose ke casting tray Anda.

Cara kerja alat elektroforesis:

1. Bila gel sudah beku, lepaskan comb secara hati-hati.
2. Letakkan gel di dalam elektroforesis tank yang sudah berisi larutan 1X TBE. Perhatikan cara meletakkannya. Elektroforesis tank dapat disii dengan 3 casting gel.
3. Tambahkan larutan 1X TBE secukupnya sampai gel-gel terbenam seluruhnya.
4. Untuk mewarnai DNA buah, tambahkan 100µl perwarna DNA (crystal violet dalam 20% gliserol) pada DNA yang disimpan dari minggu yang lalu di tabung mikrosentrifus
5. Gunakan mikropipet untuk menghisap 20µL sampel DNA buah dan secara hati-hati masukkan ke dalam "*well"*/sumur tertentu. Pada saat memasukkannya, pastikan ujung dari tip sudah sedikit masuk pada lubang well gel elektroforesis. Catat posisi dan urutan sampel grup Anda pada halaman hasil praktikum ini.
6. Untuk mewarnai DNA manusia, campur 10µl DNA dari sel epitelial dengan 10µl perwarna DNA di atas parafilm dan langsung masukan semuanya (20µl) ke sumur gel. Kemudian, dengan parafilm baru lagi, campur 10µl DNA dari sel darah dengan 10µl perwarna DNA di atas parafilm dan langsung masukan semuanya (20µl) ke sumur gel. Catat posisi dan urutan sampel grup Anda pada halaman hasil praktikum ini.
7. Nyalakan mesin elektroforesis selama 30 menit dengan tegangan 90V. Sampel-sampelnya akan mulai bergerak ke katode, (DNA bermuatan negatif)
8. Matikan mesin elektroforesis secara sempurna.
9. Dengan sangat hati-hati keluarkan gel dan letakan pada tray yang disediakan. Gambarkan pada halaman hasil praktikum ini hasil yang diperoleh.
10. Pindahkan ke alat "UV reader" supaya hasilnya lebih jelas lagi. Foto hasilnya.

SDS PAGE

Persiapan Gel

1. Bersihkan plat kaca dengan akuades dan etanol (70%)
2. Susun lempeng kaca serta *spacer*. Celah antara lempeng dengan *spacer* ditutup dengan agar 2% secukupnya.
3. Untuk menyiapkan gel poliakrilimide-SDS 10%, ikutilah tabel yang di bawah. Siapkan gel pemisah dulu.

****Pakai sarung tangan dan hati-hati dengan bahan yang berisi akrilamide****

****Janganlah menambah ammonium persulfat serta TEMED sebelum Anda siap menuangkan campuran akrilamide ke dalam plat kaca yang sudah disiapkan oleh karena bahan tersebut berfungsi sebagaik katalyst polimerisasi akrilamide****

bahan	**gel pemisah** ***perlu ~20ml/gel*** **(tabung reaksi 1)**	**gel penumpuk** ***perlu ~5ml/gel*** **(tabung reaksi 2)**
akrilamide 30%/bisakrilamide 0,8%	10 mL	3,05 mL
1,5M Tris-HCl pH=8,6	6,8 mL	---
1,5M Tris-HCl pH=6,8	---	2,0mL
akuades	10,2mL	4,65mL
SDS 10%	300µL	85µL
amonium persulfat 10%	200µL	75µL
TEMED	20µL	7,5µL

4. Tuang campuran gel pemisah ke dalam ruang antara lempeng kaca, Sisakan kira-kira 2,5 cm dari tepi atas lempeng kaca untuk gel penumpuk. Teteskan isobutanol untuk menyingkirkan udara pada bagian atas gel dan agar batas antar gel dapat terbentuk dengan baik. Biarkan gel pemisah berpolimerisasi selama kurang lebih 30 menit. Siapkan gel penumpuk.
5. Setelah gel pemisah berpolimerisasi, tuangkan campuran gel penumpuk di atasnya. Sisipkan sisir plastik (pembentuk sumur sampel). Biarkan hingga gel penumpuk berpolimerisasi.
6. Setelah gel penumpuk berpolimerisasi, lepas sisir dari bagian atas dan klem serta *spacer* bagian bawah.
7. Letakkan lempeng kaca yang berisi gel secara vertikal pada alat electroforesis dan kemudian klem. Isi tempat dapar dengan dapar elektroda. Singkir gelembung udara pada bagian bawah gel.

Bagian B: Persiapan sampel-sampel protein (sampel-sampel protein akan disiapkan petugas lab)

1) Pakailah sarung tangan dan teknik keselamatan di laboratorium yang benar.
2) Tentukan waterbath pada temperatur 100°C.
3) Siapkan 7 tabung mikrocentrifus dan tandai dengan “plasma”, “M”, “S”, “G_S”, “G_P”, “E_S”, “E_P”. Keluarkan 7 sampel protein darah kalian (yaitu plasma, M, S, G_S, G_P, E_S, E_P) dari kulkas.
4) ****Kerjakan langkah ini di fumehood****. Tambah 450 µL buffer sampel dan 25µL β-merkaptoetanol ke setiap tabung mikrosentrifus yang sudah ditandai. Transfer 50 µL sampel protein plasma, M, S, G_S, G_P, E_S, E_P ke tabung mikrosentrifus masing-masing.
5) Tutup dan vorteks pelan-pelan supaya endapannya dicampur rata dengan buffer.
6) Masukan semua tabung mikrosentrifus ke dalam waterbath yang mendidih. Biarkan 5 menit.
7) Tentukan bahwa tabung mikrosentrifus berkeseimbangan dan masukkan ke dalam alat mikrosentrifus. Putar selama 3 menit pada kecepatan 14.000 rpm.

Bagian C: Loading and running the gel

1. Masukkan 10μL sampel protein (yaitu plasma, M, 2S, G_S2, G_P, E_S2, E_P) ke dalam sumur masing-masing dengan pipet otomatik atau dengan Hamilton syringe. Pada sumur yang terakhir masukkan 10μL protein petanda. Catat nomor sumur dan isinya.
2. Hubungkan alat elektroforesis dengan *power supply*. Jalankan elektroforesis selama 4 jam atau lebih (voltage yang ditentukan pada alat elektroforesis tergantung waktu yang ada untuk menjalankannya).

Bagian D: Pewarnaan Gel

1. Setelah watku untuk menjalalan pemisahan protein selesai, matikan *power supply* dan lepaskan semua kabel dari alat elektroforesis.
2. Pakai sarang tangan. Buka klem. Angkat *spacer* pada kedua sisi lempeng kaca, kemudian pisahkan satu lempeng kaca dari gel. Potong gel pada batas antara gel penumpuk dan gel pemisah. Tandai salah satu ujung gel (catat petanda yang Anda buat supaya ingat).
3. Dengan hati-hati angkat gel dan rendam dalam larutan pewarna selama 30-60 menit.
4. Pindahkan ke tempat larutan pencuci. Ganti larutan pencuci beberapa kali hingga warna latar belakang memudar dan pita-pita protein jelas terlihat.
5. Bandingkan mobilitas semua protein sampel dengan protein petanda untuk menentukan berat molekulnya. Untuk menentukan berat molekul protein sampel, ukur jarak pita-pita protein sampel serta pita-pita protein petanda dari batas atas gel pemisah. Masukkan hasil pada tabel di halaman hasil pratktikum ini.

Laporan Isolasi DNA dan Elektroforesis Agarose <u>atau</u> Isolasi Protein serta SDS-PAGE:

Buat laporan praktikum, dan isi tujuannya, dengan kata-kata sendiri.

Buat 2 grafik (semi-log) dari data yang disediakan (satu utk elektroforesis protein dan satu utk elektroforesis fragmen asam nukleat)

Terangkan hasil yang Anda dapat serta kesimpulannya.

Berikanlah saran atas praktikum ini dan usulan supaya untuk praktikum selanjutnya lebih baik lagi.

Jawahblah pertanyaan berikut untuk laporan Isolasi DNA/elektroforesis agarose:

1. Apakah ada perbedaan antara hasil yang diperoleh dari setiap macam buah? Antara hasil DNA buah dan DNA manusia? Sebutkan dua atau tiga alasan untuk perbedaan tsb.
2. Bandingkan cara kerja untuk mengisolisasi DNA dari buah dan DNA dari sel epitelial. Sebutkan langkah-langkah yang sama dan langkah-langkah yang berbeda.
3. Apakah yang terjadi antara DNA dan etanol yang menyebabkan asam nukleat naik dari eluant buah?

Yang khusus untuk laporan Isolasi Protein/ SDS-PAGE

1. Foto hasil gel dan masukkan foto tersebut dalam laporan Anda. Berikan beberapa komentar atas apa yang terlihat pada foto gel.
2. Buat kurva standar protein petanda pada kertas grafik semilog dengan sumbu x (linear) adalah jarak (mm atau cm) pita-pita protein petanda dari batas atas gel pemisah dan sumbu y (semi-log) adalah berat molekul protein-protein petanda.
3. Dengan menggunakan kurva standar protein petanda, tentukan berat molekul pada pita-pita yang dilihat pada protein sampel plasma, M, 2S, G_S2, G_P, E_S2, dan E_P.