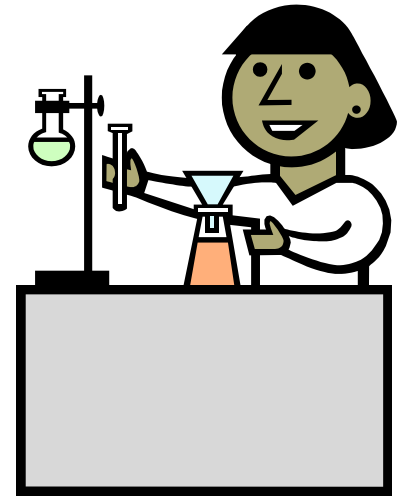


Ketrampilan Dasar Laboratorium

Program Studi Ilmu Biomedik 2011



Kuliah 6: Oktober 19

Jadwal praktikum & kuliah

UTS

Jadwal pertemuan dgn DR Margi

Elektroforesis

**Praktikum 7: Elektroforesis (Agarose
serta SDS-PAGE)**

Jadwal Kuliah dan Praktikum Ketrampilan Dasar Laboratorium

Okt 26/27	**HARI RABU** Elektroforesis: pk 12:30-14:30 kelompok pagi	HARI KAMIS Elektroforesis pk 08:00-11:00 kelompok pagi	Tugas: laporan praktikum (isolasi DNA dan elektroforesis agarose atau isolasi protein dan elektroforesis SDS-PAGE)
	pk 14:30-16:30 kelompok siang	pk 12:00-15:00 kelompok siang	
Nop 3	Persiapan untuk UTS LT pk 10:00-14:00 (kesempatan untuk latihan teknik² praktek)		Proposal untuk metabolisme II diserahkan ke DR Margi
Nop 10	UTS LT pk 8:30 sp/d selesai; pakai jadwal (setiap mhs ikut ujian selama 30 menit)		
Nop 16/17	pk 10:00-12:00 KULIAH 7	Teknik Kultur Sel LT pk 08:00-11:00/ pk 12:00-15:00	Tugas: laporan praktikum

UTS

Pada hari Kamis 10 Nopember
di Laboratorium Terpadu

- 60 menit
- 7-9 soal
- 4-5 mhs masuk sekaligus
- Harus bawa pengaris, pensil, balpen dll
- Bahan/teknik yang diuji dari awal semester sampai praktikum isolasi protein dari darah
- Boleh bawa bahan penuntun
- Jadwal akan diumumkan di Biomedik

Topik² UTS

tgl 10 Nopember 2011

~2 menit	Penggunaan timbangan
~5 menit	Penggunaan pH meter
~10 menit	Buat grafik dari data yg disediakan
~2 menit	Penggunaan pipet
~5 menit	Persiapan pengenceran
~5 menit	Penggunaan alat spektrofotometer
~5 menit	Penggunaan alat sentrifuse
~5 menit	Interpretasi hasil (grafik, gel,dll)
~5 menit	Langkah-langkah dalam teknik isolasi makromolekul

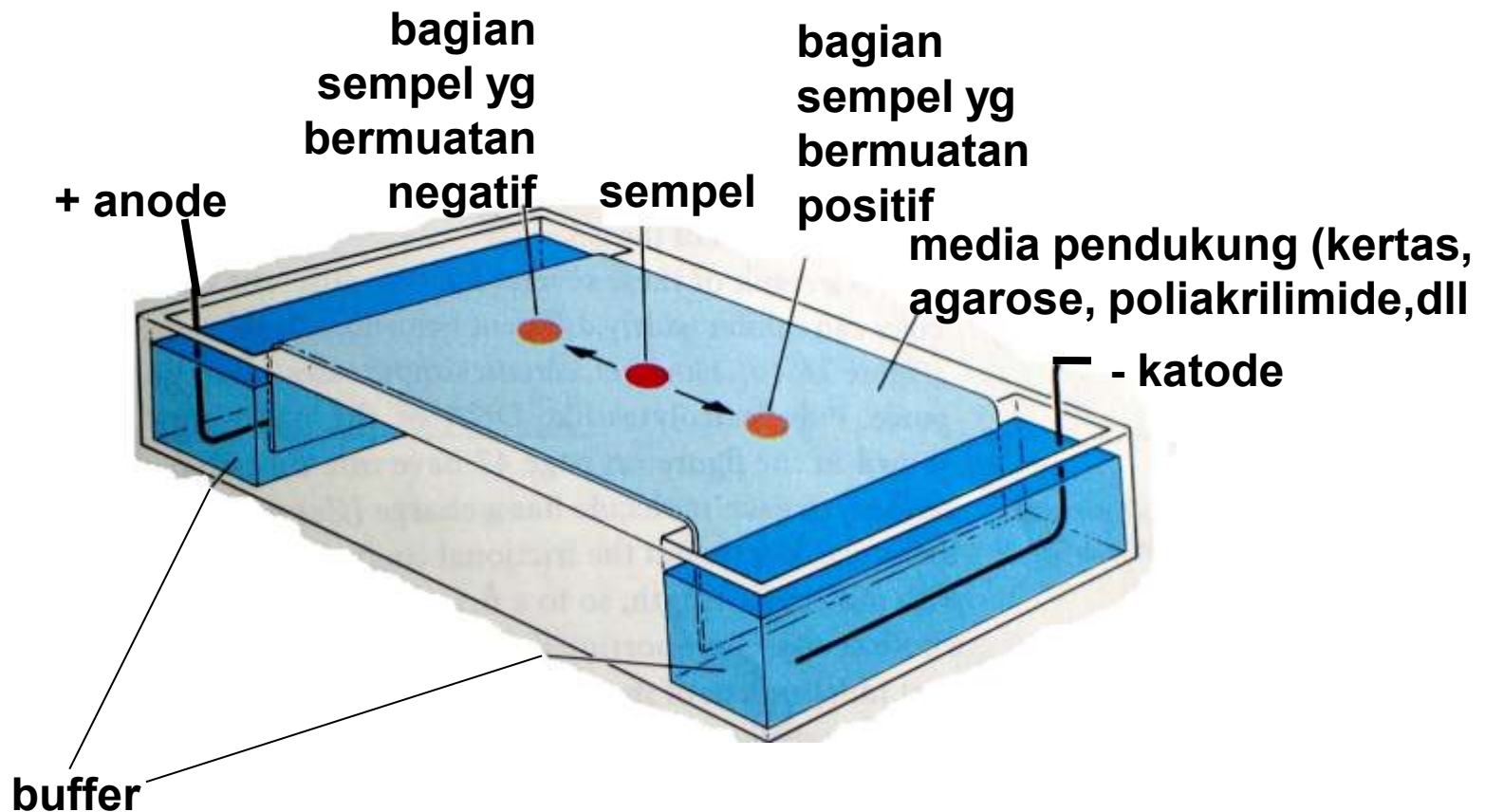
Jadwal Pertemuan

di Ruang Biomedik

- merupakan kesempatan untuk membahas laporan, proposal metabolisme serta hal yang lain yang berkaitan dengan BM 506
- 30 menit
- sebaiknya 2 orang sekaligus
- tolonglah mengisi formulir

Teori Dasar Pemisahan Makromolekul melalui Teknik Elektroforesis

pemisahan yg berdasar atas gerakan molekul² protein atau asam nukleat yg berbeda berat dan muatan daya listrik



Teori Dasar Pemisahan Makromolekul melalui Teknik Elektroforesis

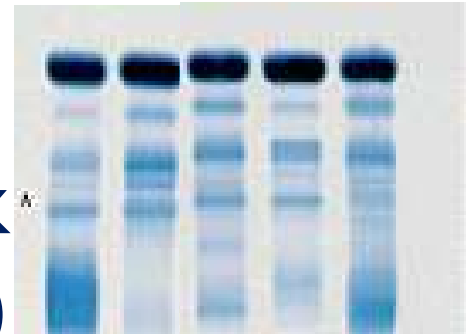
° **Elektroforesis Agarose**

(terutama dipakai untuk asam nukleat)



Elektroforesis SDS-PAGE

(terutama dipakai untuk protein)



Kenapakah agarose digunakan untuk asam nukleat dan SDS-PAGE digunakan untuk protein?

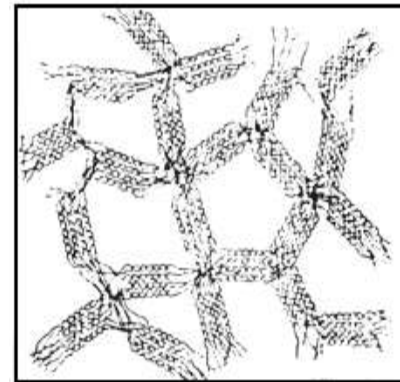
Perbedaan elektroforesis agarose dan SDS-PAGE

Ukuran por-por bagi gel agarose agak besar.

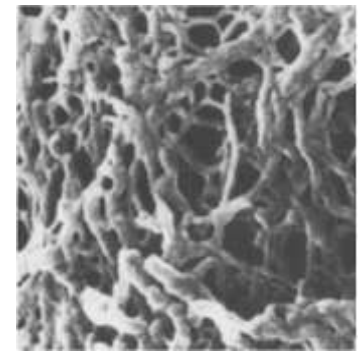
Protein merupakan makromolekul kecil (dibanding dengan molekul asam nukleat) jadi tidak terhambat lewat gel agarose.

Akibat tidak dipisahkan dengan jelas.

Gel poliakrilimide mempunyai por-por jauh lebih kecil. Selain protein, gel poliakrilamide bisa digunakan untuk memisahkan fragmen-fragmen asam nukleat yang kecil (~ 10 bp ke atas dengan resolusi sekecil 1 bp)



A schematic representation of the agarose gel network



Scanning electron micrograph of agarose gel ($1 \times 1 \mu\text{m}$)



Perbedaan elektroforesis agarose dan SDS-PAGE

Agarose cocok untuk memisahkan molekul berdasar muatan negatif – tidak semua protein bermuatan negatif.

Dengan teknik SDS-PAGE protein-protein dapat dipisahkan berdasar ukurannya oleh karena semua protein dinaturasi dan SDS, yang merupakan anion (bermuatan negatif) mengikat dengan protein

Akibatnya: protein-SDS kompleks bermuatan negatif dan protein yang lebih besar lebih banyak SDS $\Rightarrow$ lebih negatif $\Rightarrow$ lebih cepat jalan melewati gelnya.

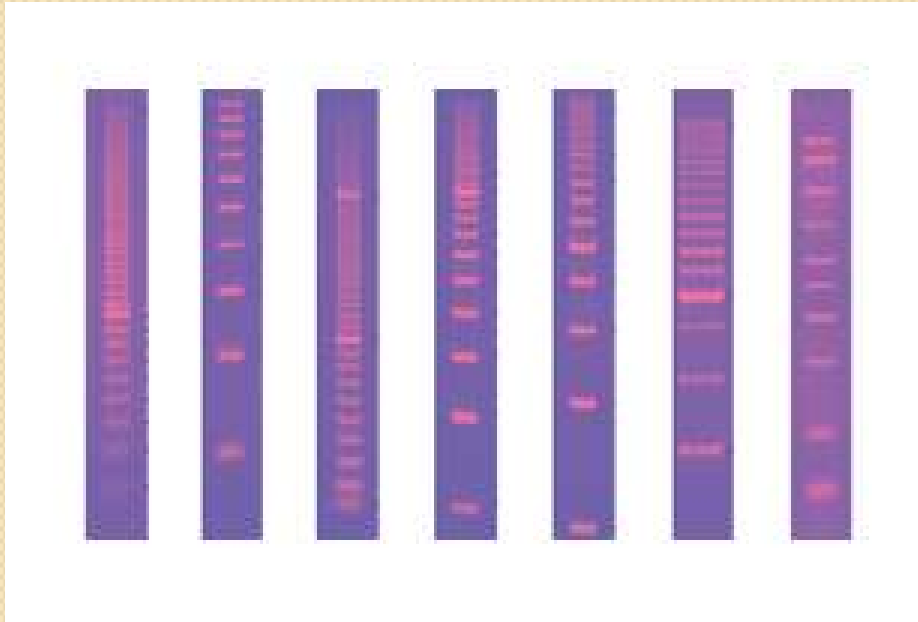
Perbedaan elektroforesis agarose dan SDS-PAGE

Protein-protein bisa berinteraksi satu dengan yang lain (atau dengan molekul yang lain, seperti DNA) dan teknik elektroforesis agarose tidak cocok untuk memisahkan kompleks tersebut.

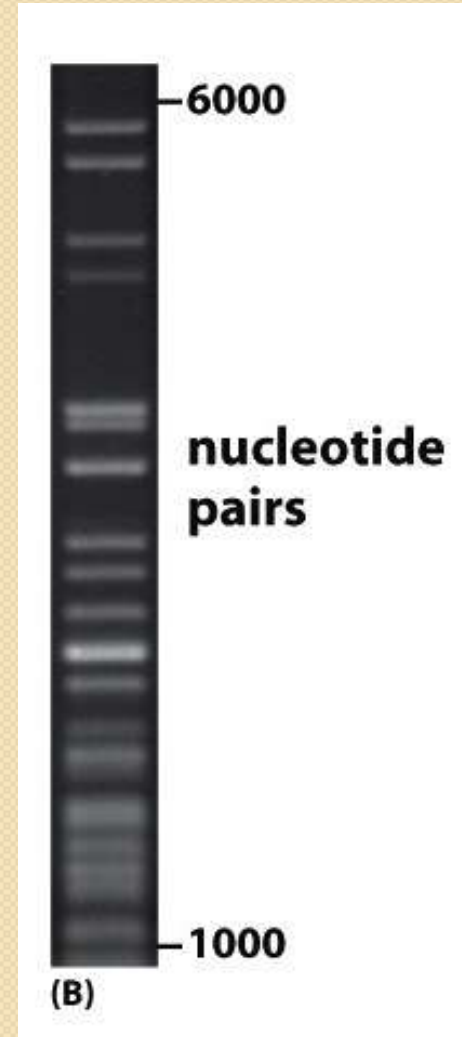
Dengan teknik SDS-PAGE protein-protein mengalami dinaturisasi dan ikatan-ikatan diantara protein-protein dipecahkan.

Akibatnya: hasil SDS-PAGE (untuk pemisahan campuran protein) lebih gampang diinterpretasi dari pada hasil gel agarose.

Elektroforesis Agarose: Asam Nukleat



The most commonly used stain for detecting DNA/RNA is Ethidium Bromide (EtBr). EtBr is a DNA intercalator, inserting itself into the spaces between the base pairs of the double helix.



**double stranded DNA
separated on agarose;
stained with a fluorescent dye**

Molecular Weight Determination

Size (bp) Distance (mm)

23,000 **11.0**

9,400 **13.0**

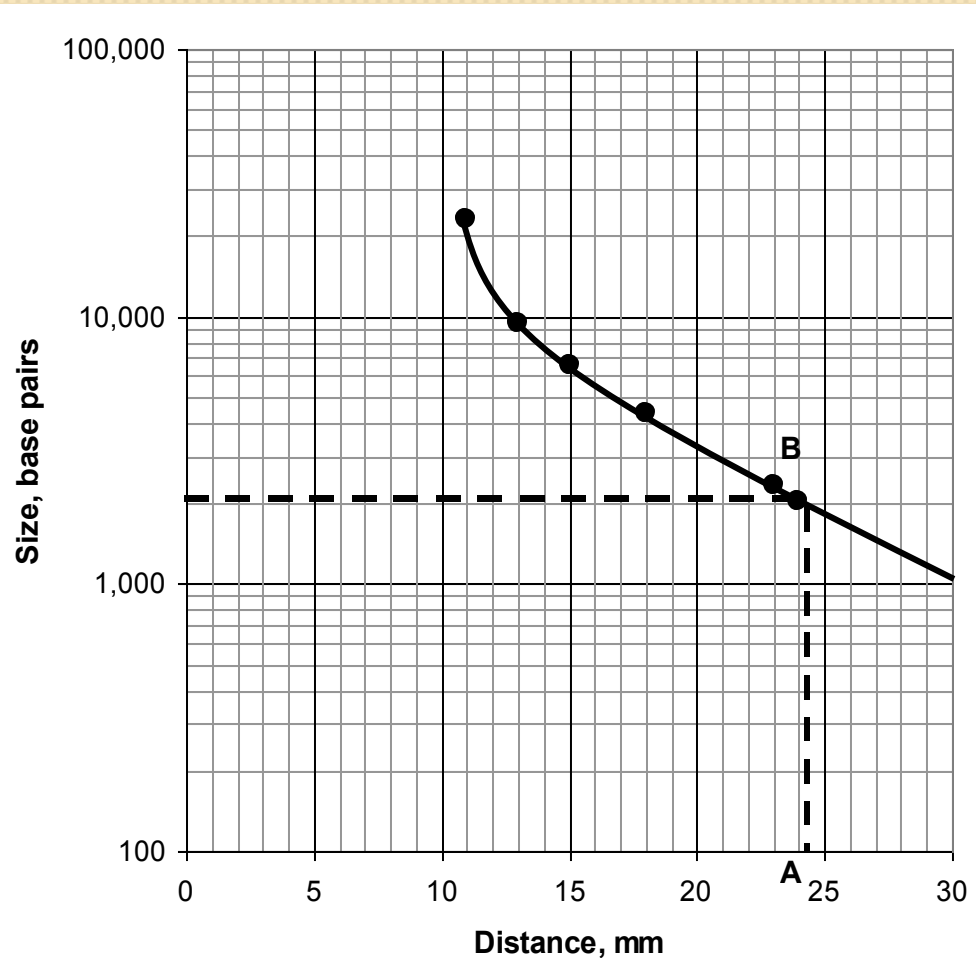
6,500 **15.0**

4,400 **18.0**

2,300 **23.0**

2,000 **24.0**

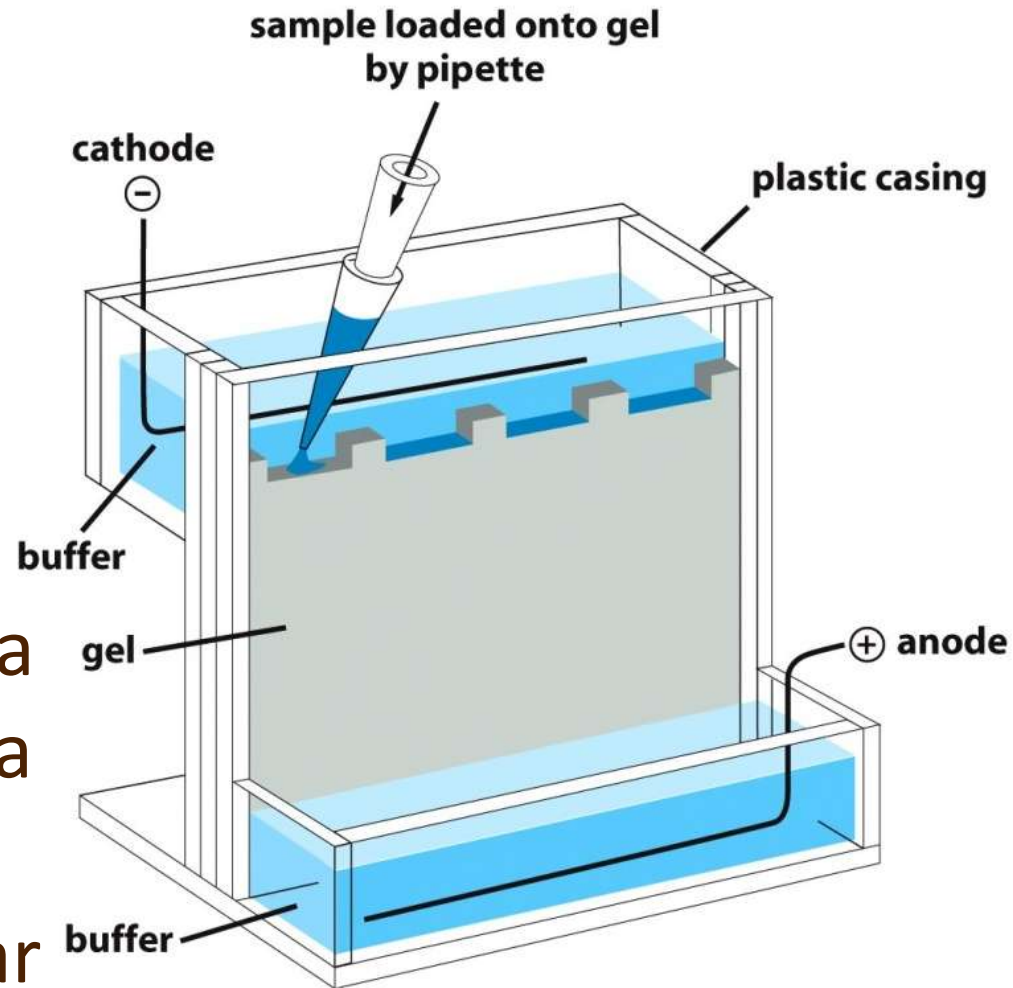
Standard Curve: Semi-log



Protein Elektroforesis: sodium dodecyl sulfate-poliakrilamide gel elektroforesis (SDS-PAGE)

Detergen SDS digunakan supaya semua protein bermuatan negatif.

Kadar poliakrilimida dapat diatur supaya protein² tertentu dipisahkan berdasar ukurannya

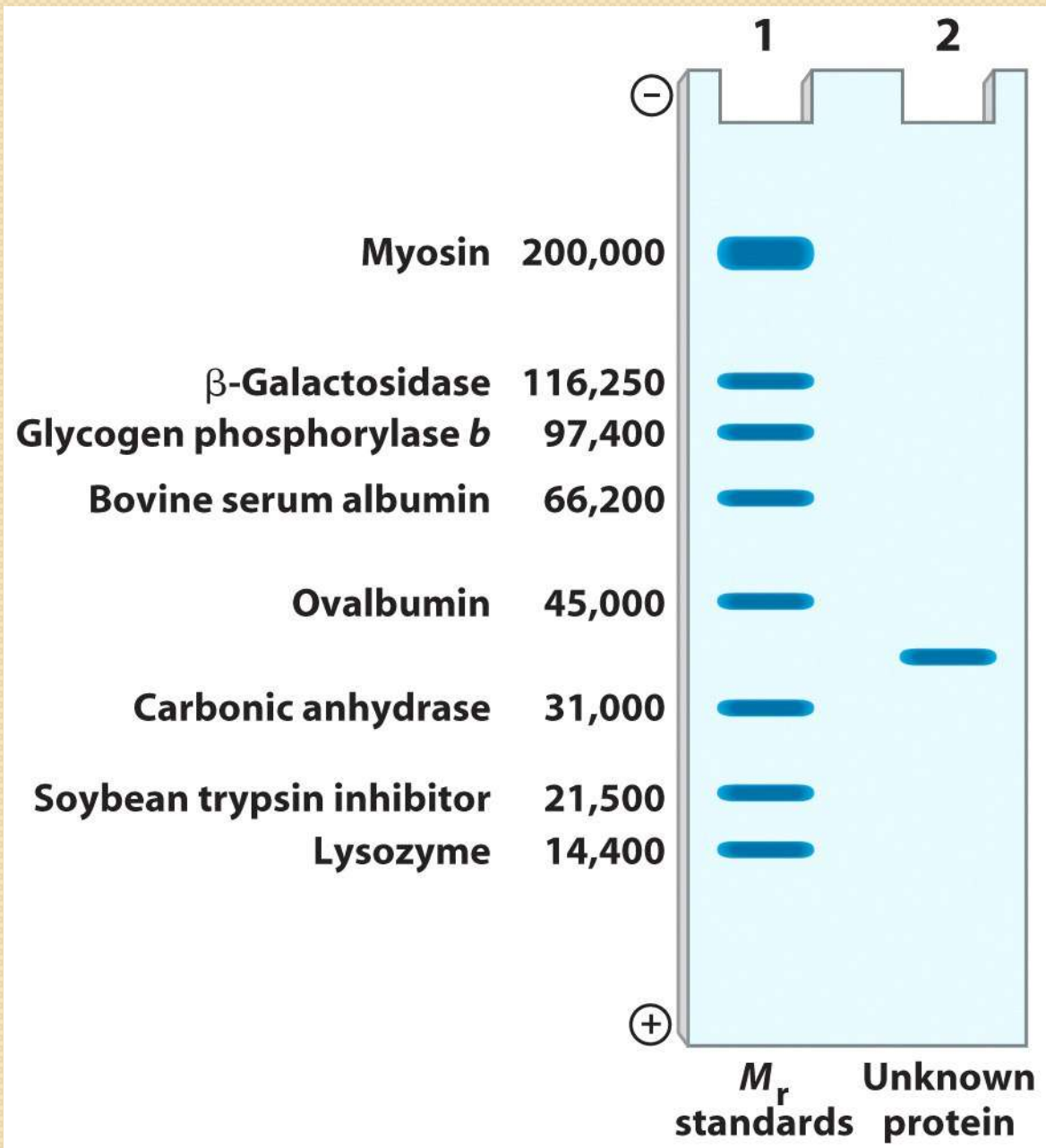


Recommended acrylamide concentration for protein electrophoresis

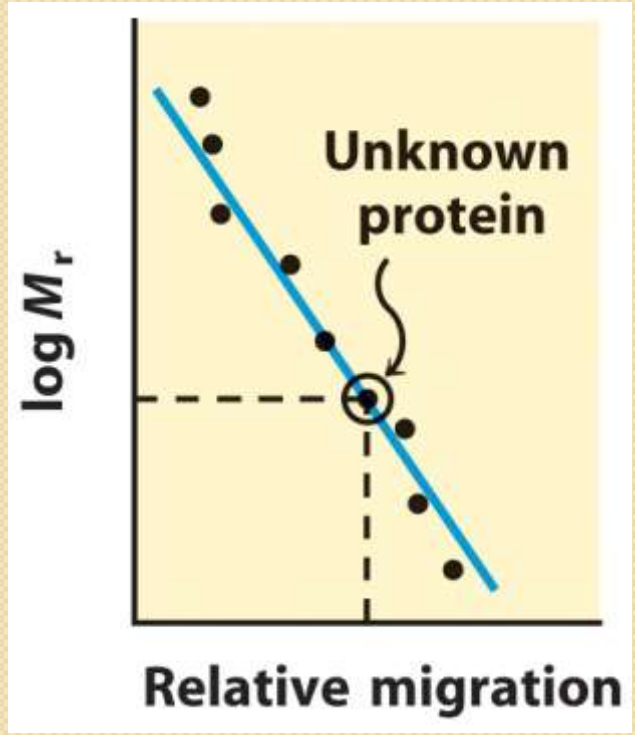
Separation size range (kD)	% Acrylamide
36-205	5%
24-205	7.5%
14-205	10%
14-66*	12.5%
14-45*	15%

** The larger proteins fail to move significantly into the gel*

Penggunaan standar pada SDS-PAGE

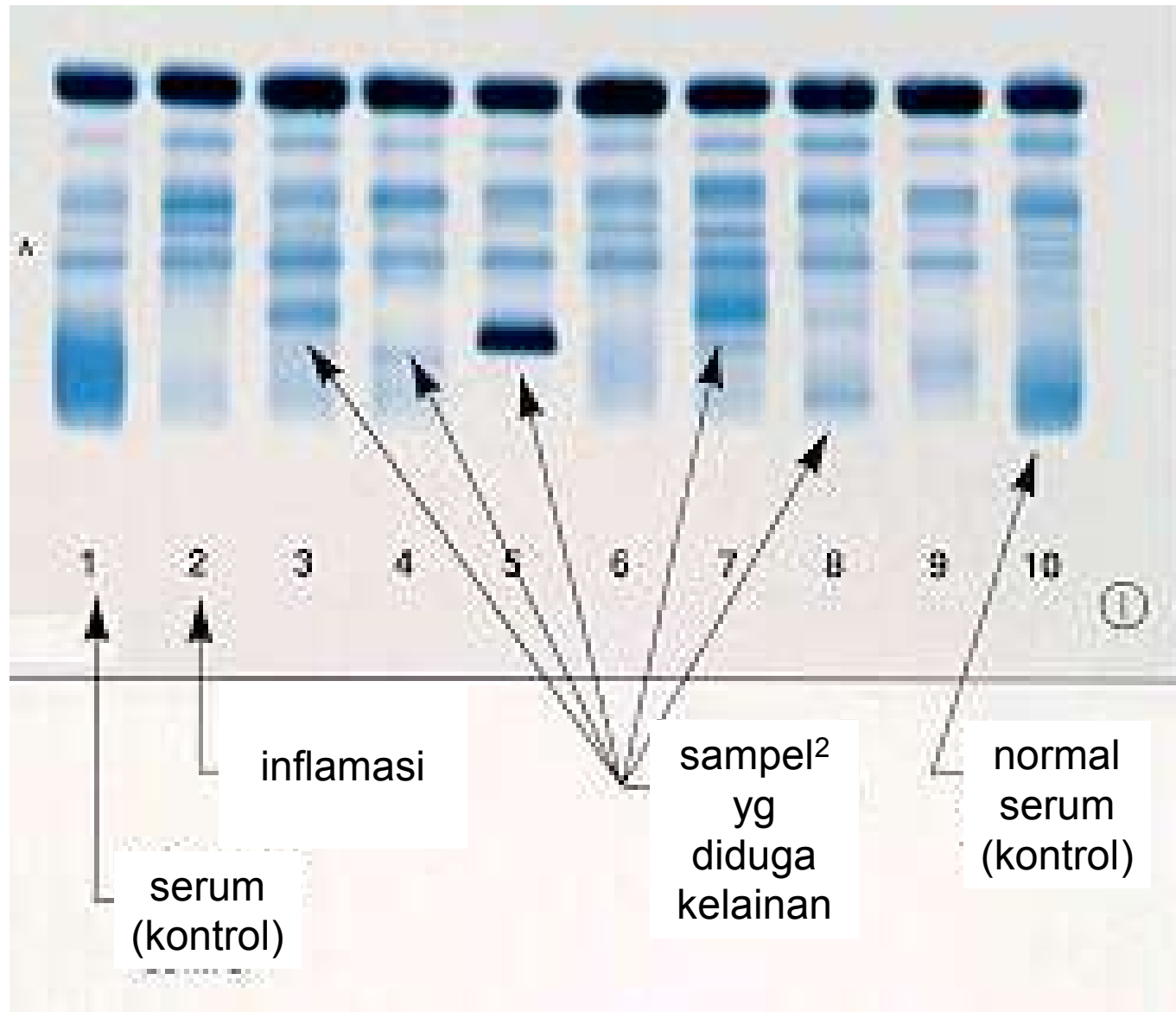


Jarak migrasi protein pada gel SDS-PAGE berhubungan lurus dengan berat molekul (kDaltons) pada skala logaritmik



Contoh² SDS-PAGE....

PROTEIN² SERUM



Contoh² SDS-PAGE.....

MEMONITOR PROSES ISOLASI PROTEIN

Enzyme purification
stages (stained with
Coomassie Blue)



Contoh² SDS-PAGE.....

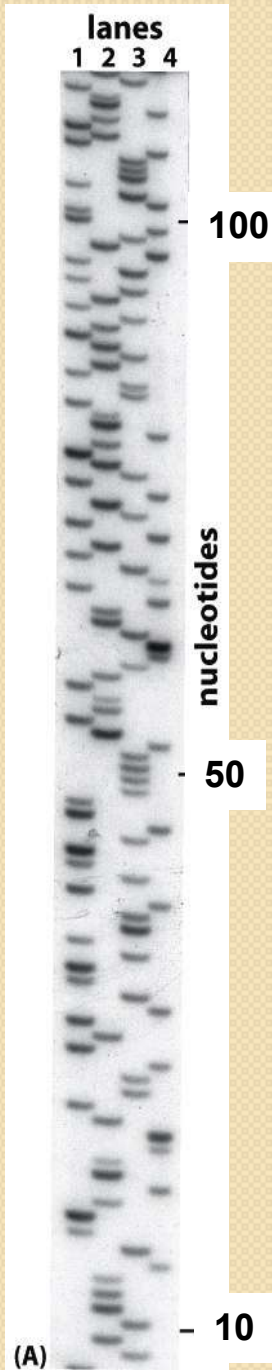
2D (DUA DIMENSI)SDS-PAGE

2D SDS-PAGE dari jaringan hati mencit dimana lebih dari 1000 protein (*spots*) dapat dibedakan
(ukuran gel = 24cm; radiolabelled)

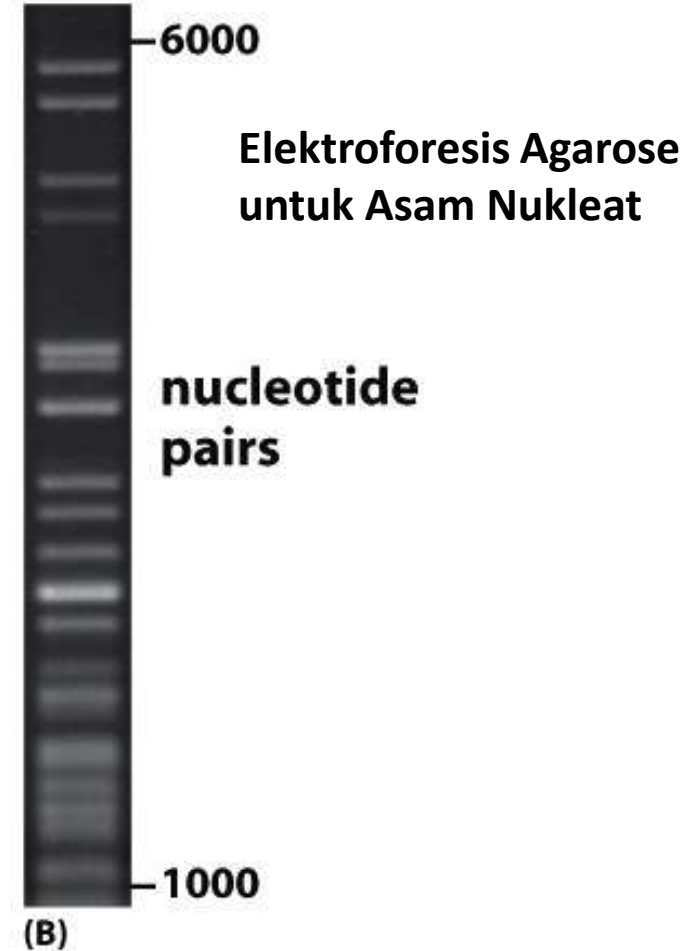


- Digunakan untuk mengikuti perubahan² yang terjadi pada suatu protein yang berada di tipe sel atau jaringan tertentu
- Ada alat 2D SDS-PAGE di Lab Terpadu USU

PAGE untuk Asam Nukleat



single stranded DNA separated with PAGE; 1,2,3,4 indicate fragments ending in G,A,T and C respectively



double stranded DNA separated on agarose;
stained with a fluorescent dye

Langkah-langkah sesudah elektroforesis?

DNA (elektroforesis agarose) :

Ukur jarak pita-pita dari awal gel pemisah dan membandingkan dengan standar supaya dapat berat fragmen DNA

Mentransfer ke membran (*electrophoretic transfer*) untuk ***Southern blotting***, yaitu meneliti lebih lanjut dengan probe-probe DNA.

Northern blotting: meneliti hasil elektroforesis RNA lebih lanjut dengan probe hibridisasi RNA

Eastern blotting: meneliti hasil elektroforesis protein dengan probe khusus utk karbohidrat, lipida atau fosforilasi supaya modifikasi post-translational pada protein dapat didektsi

Langkah-langkah sesudah elektroforesis?

PROTEIN:

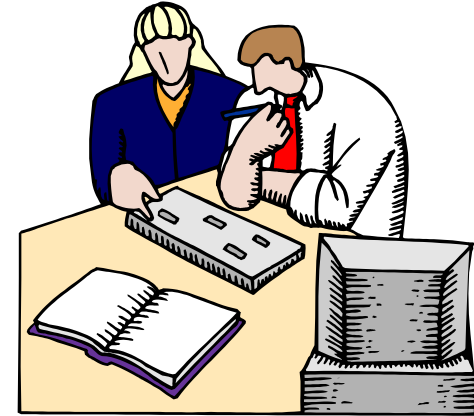
Fixation dan mewarnai dengan larutan 9:2:9 (metanol: akuades: asam asetic) dan perwarna *Coomassie Blue*. Lalu mencuci.

Ukur jarak pita-pita dari awal gel pemisah dan memperbandingkan dengan standar supaya dapat berat molekulnya

Mentransfer ke membran (*electrophorectic transfer*) untuk **Western blotting**, yaitu meneliti lebih lanjut dengan antibodi-antibodi.

Praktikum 7

Elektroforesis: Agarose serta SDS-PAGE



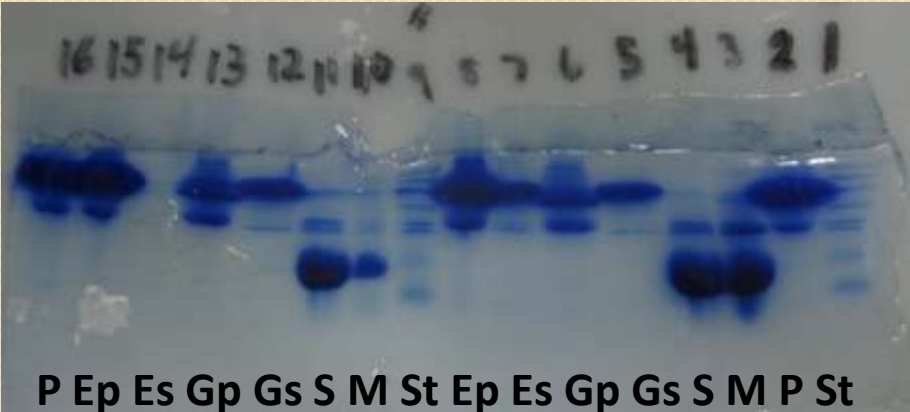
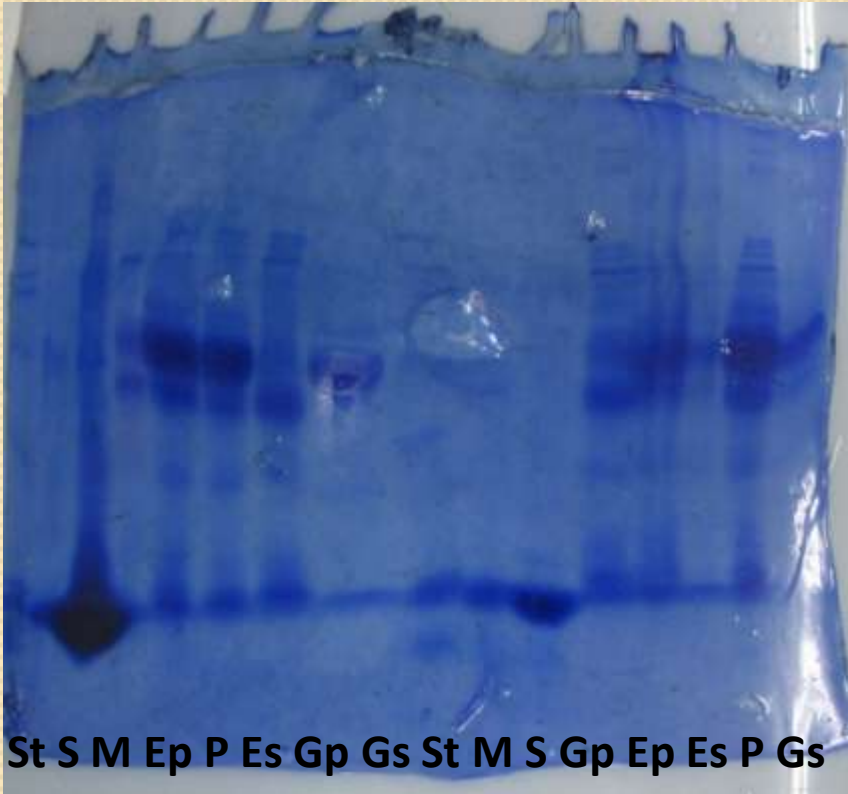
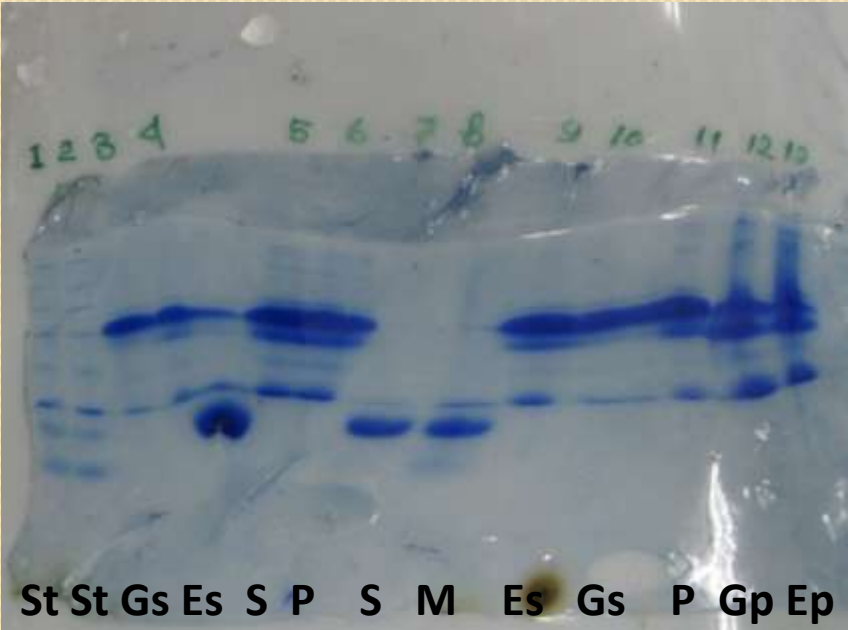
- Tgl 26 dan 27 Oktober
- Bagian praktikum
 - **Hari Rabu:** SDS-PAGE hasil isolasi protein (dijalankan 4-8 jam)
 - **Hari Kamis:** Hasil SDS-PAGE dicuci dan elektroforesis agarose hasil isolasi DNA serta PCR

Gel SDS-PAGE disiapkan....

Plat dan klem

Video (alat-alat yang agak terkini dibanding dengan alat kita!!)

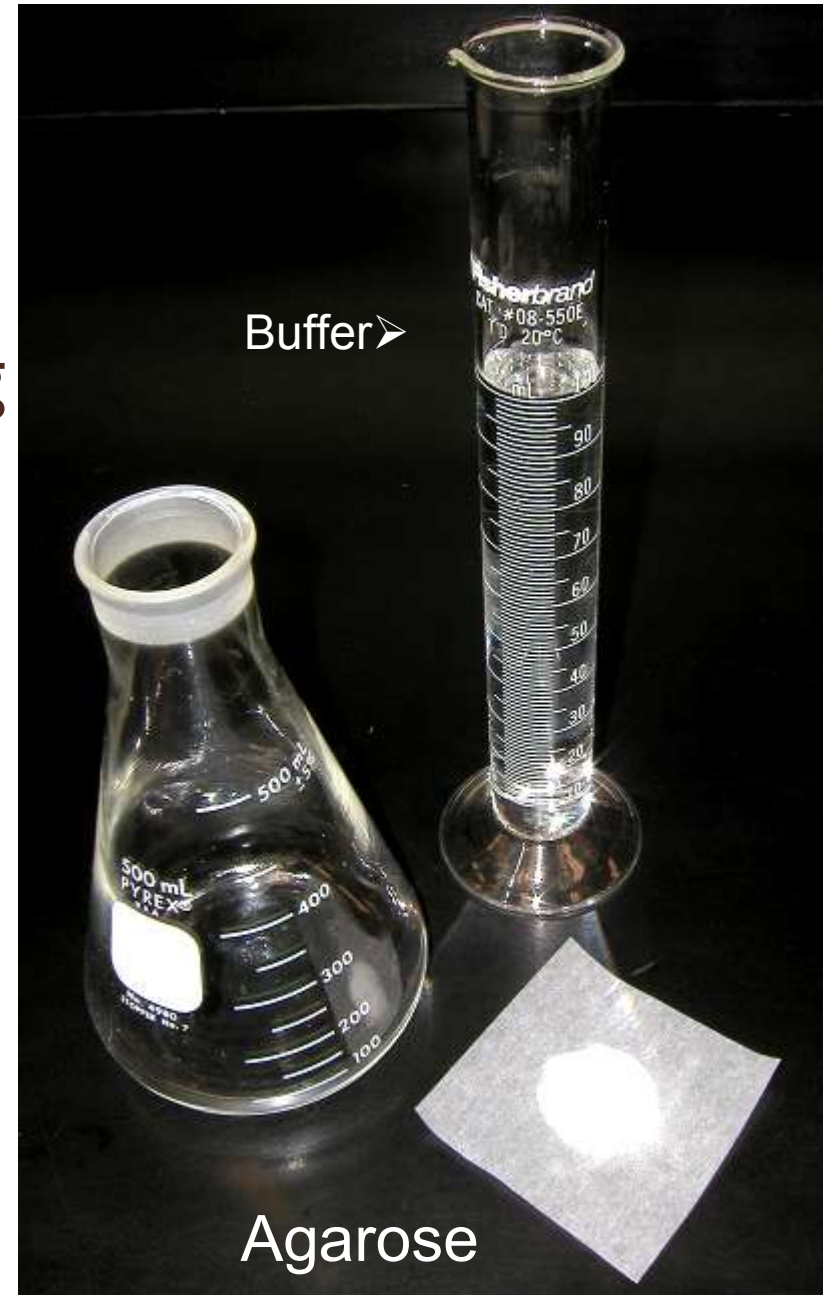
Hasil SDS-PAGE protein dari darah dari tahun 2010



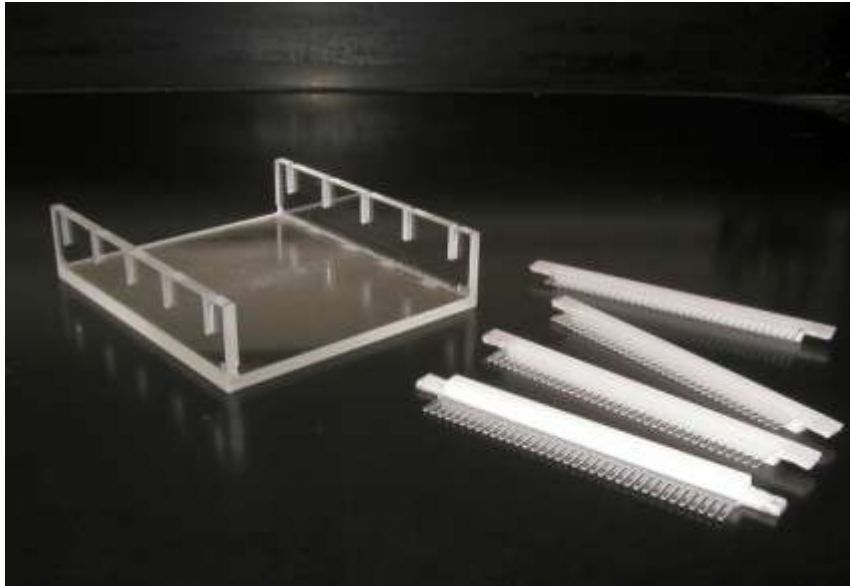
Elektroforesis Agarose utk DNA

An agarose gel is prepared by combining agarose powder and a buffer solution.

Flask for boiling



Preparing the Casting Tray

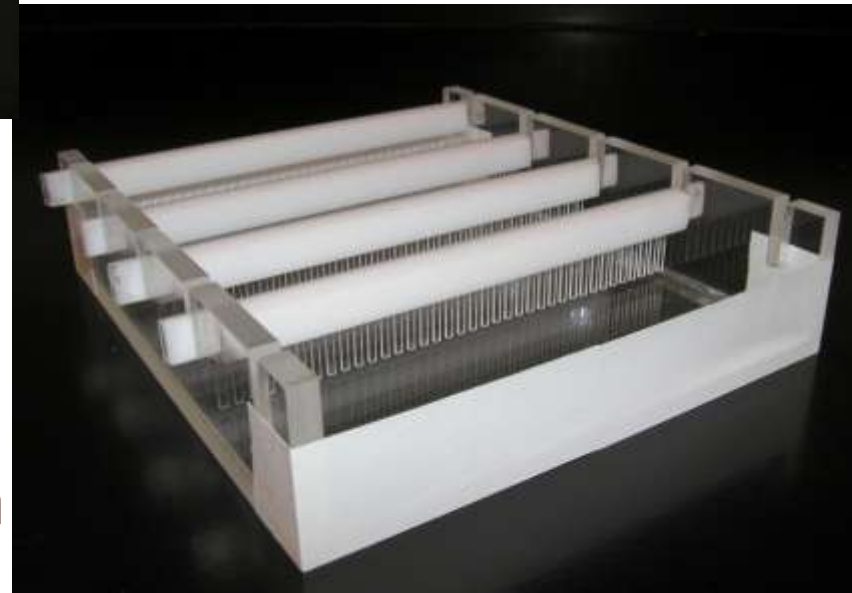


casting tray and combs

Seal the edges of the casting tray and put in the combs.

Place the casting tray on a level surface.

None of the gel combs should be touching the surface of the casting tray.



Melting the Agarose



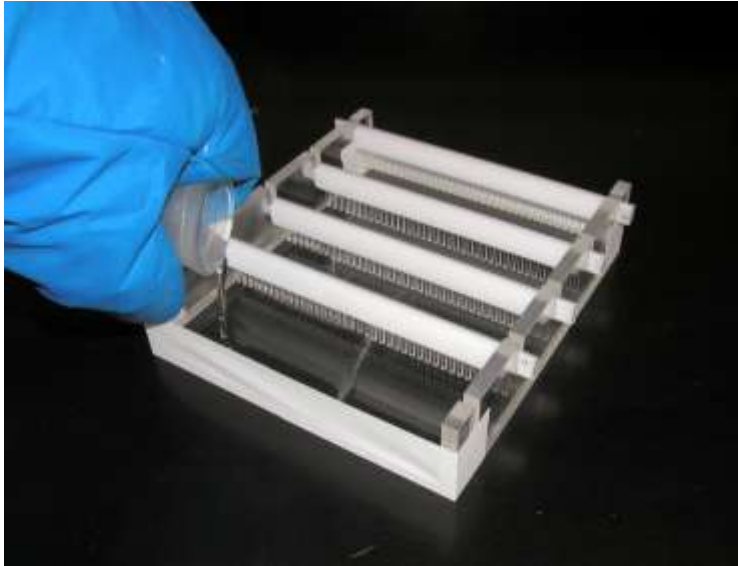
Agarose is insoluble at room temperature

Heat carefully until the solution boils



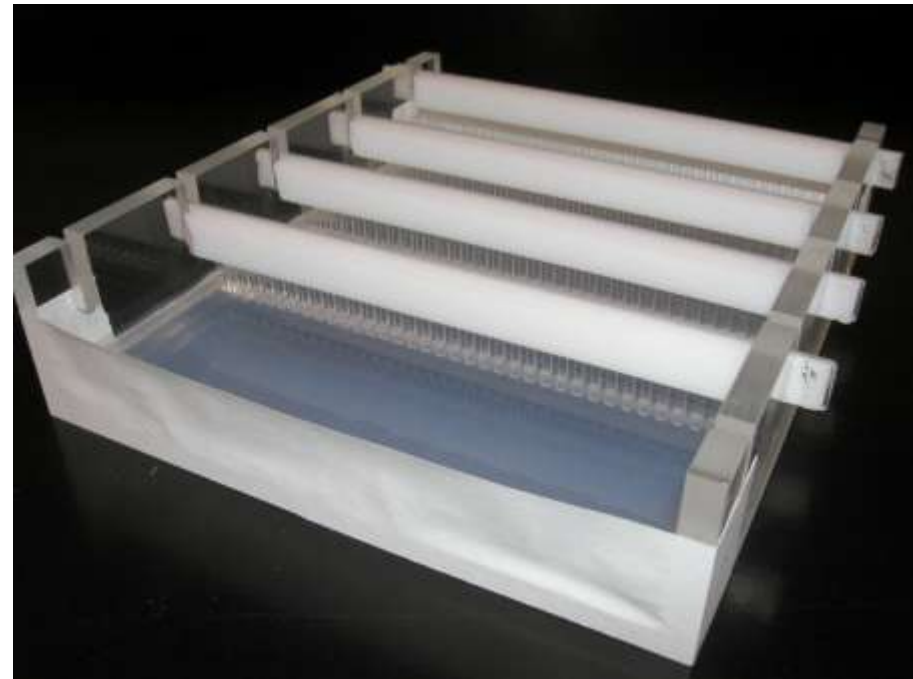
After boiling the solution is clear

Pouring the Gel

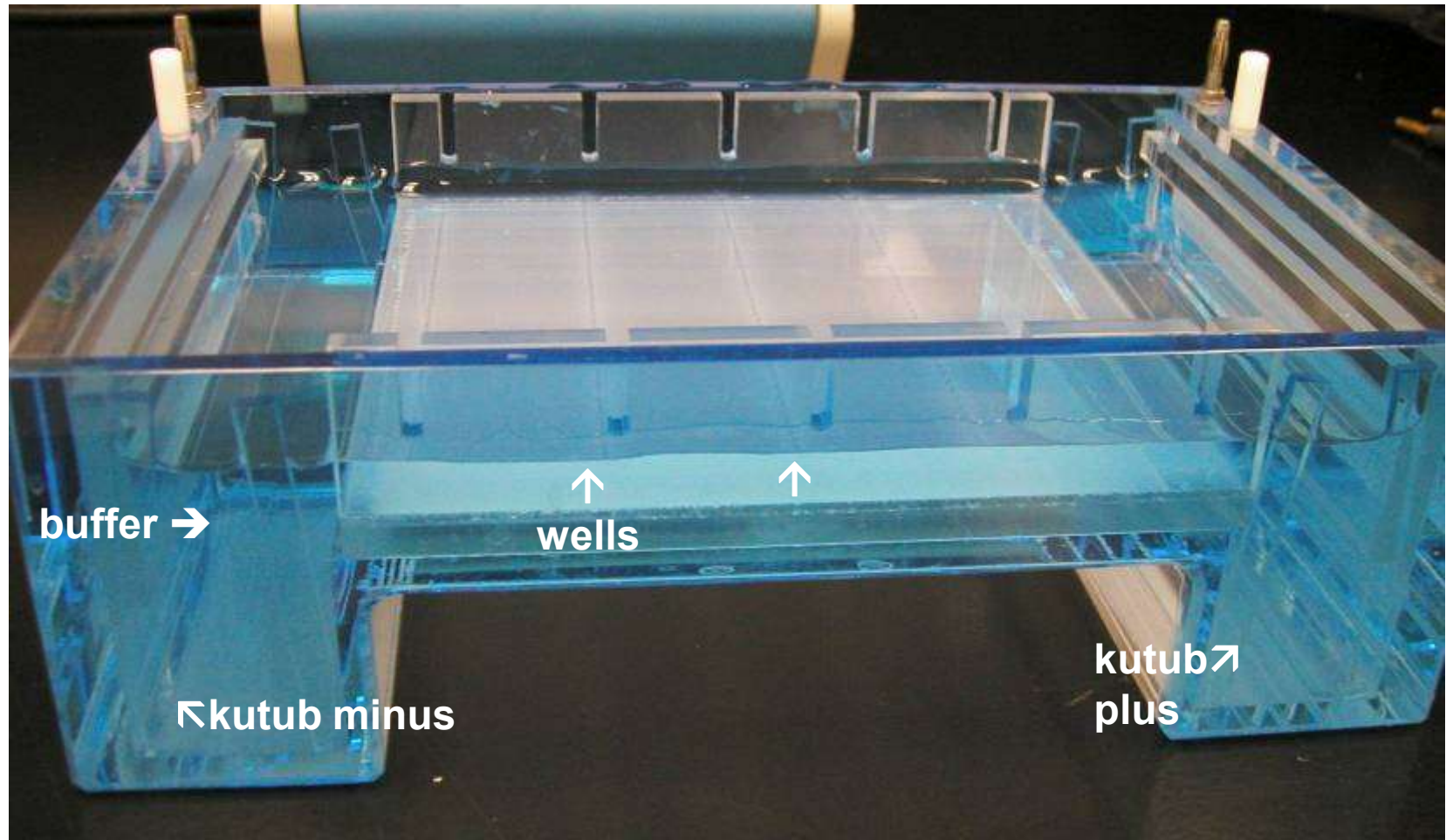


Allow the agarose solution to cool slightly ($\sim 60^{\circ}\text{C}$). Carefully pour the agarose solution into the casting tray. Avoid air bubbles.

Allow to cool (30-45 minutes) so that the agarose polymerizes, forming a flexible gel. Remove the combs and tape.



Prepare the electrophoresis chamber



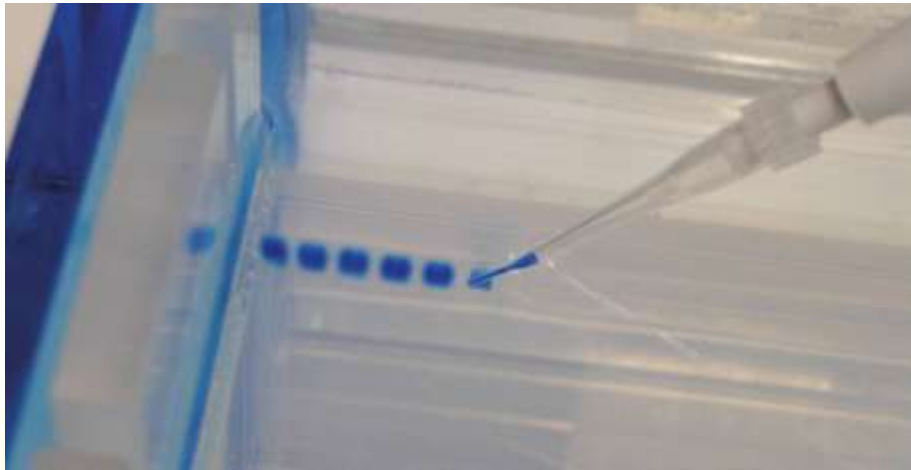
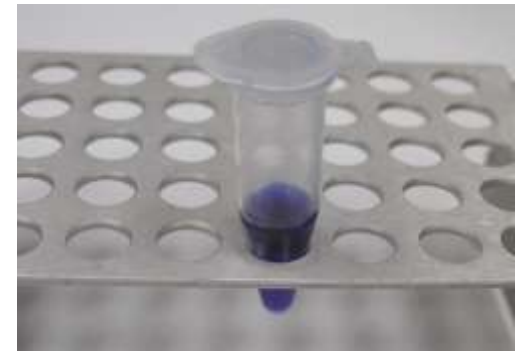
Place the gel in the electrophoresis chamber.
Add enough electrophoresis buffer to cover the gel to a depth of at least 1 mm. Make sure each well is filled with buffer.

Applying the samples

DNA samples (human and fruit) are mixed with sample loading buffer and tracking dye. This allows the samples to be seen when loading onto the gel, and increases the density of the samples, causing them to sink into the gel wells.

Loading Buffer: →

- Bromophenol Blue (for color)
- Glycerol (for weight)

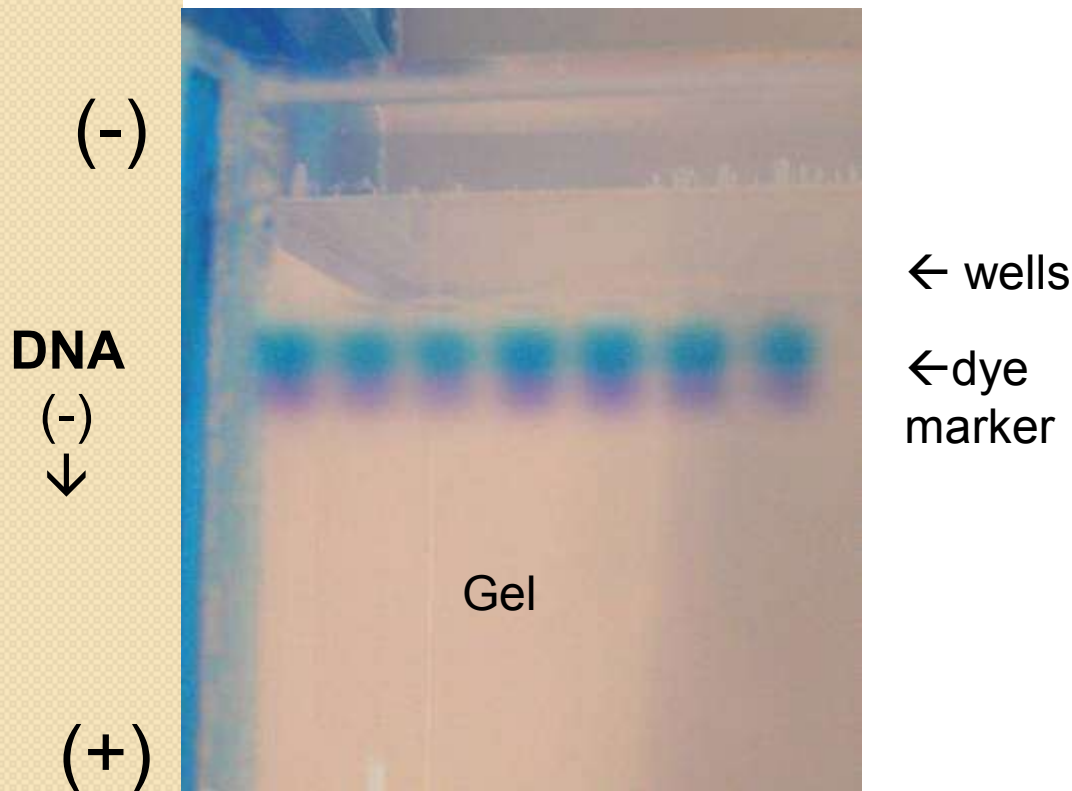


Carefully place the micropipette tip over a well and gently expel the sample.

The sample should sink into the well. Be careful not to puncture the gel with the pipette tip.

Running the gel

1. Place the cover on the electrophoresis chamber, connecting the electrical leads.
2. Connect the electrical leads to the power supply.
3. When the power is turned on, bubbles should form on the electrodes in the electrophoresis chamber.

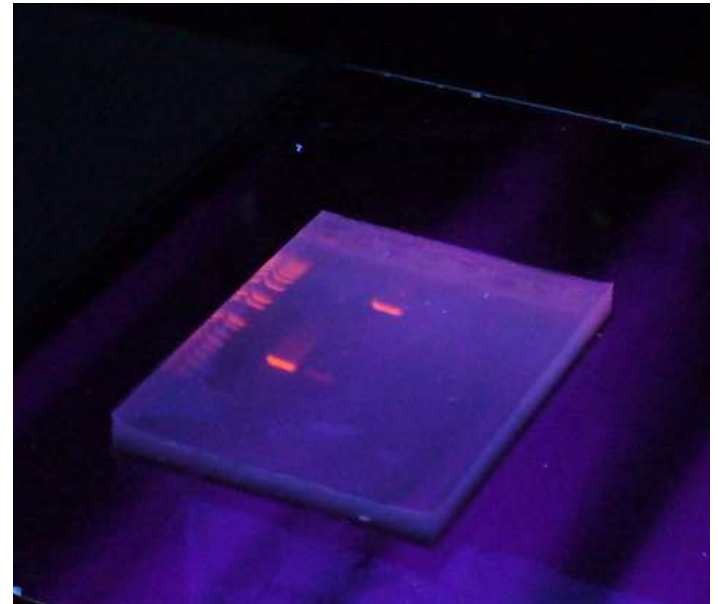


After the current is applied, make sure the gel is running in the correct direction. The dye used will run in the same direction as the DNA.

Run the gel for 30 minutes.

Visualising the gel

1. Turn off the electrophoresis apparatus.
2. Remove the gel from the chamber and transfer it to the UV reader platform.
3. Turn on the UV lamp and view the DNA bands



Laporan:

Anda harus menyiapkan laporan mengenai praktikum isolasi DNA dan elektroforesis agarose

atau

mengenai praktikum isolasi protein dan SDS-PAGE

References:

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. 2008. *Molecular Biology of the Cell (5th ed)*, Garland Science, Taylor & Francis Group, New York.

Dunn, S.M.J. 1990. *PMCOL 306 Course Notes*, University of Alberta Pharmacology Department

Holme, D. J. & Peck, H. 1998. *Analytical Biochemistry (3rd ed)*, Addison Wesley Longman Inc., New York.