



Biotechnology Explorer™

Protein Fingerprinting

Instruktionsmanual

**Katalognummer
166-0100EDU**

explorer.bio-rad.com

**Delene i dette kit er sendt i separate æsker.
Opbevar proteinstandarderne i fryseren, ved opbevaring i mere end 4 uger.**

Kopiering af enhver del af dette dokument er kun tilladt til undervisningsbrug

BIO-RAD

Undersøgelser af fiskeproteiner- protein-fingerprinting.

Formål: At adskille en blanding af proteiner ved hjælp af elektroforese og få indblik i nogle af de forskellige anvendelses- områder, der er for denne teknik. I denne øvelse bruges øvelsen til at lave nogle evolutionære betragtninger.

Baggrund: I muskler er der en række proteiner der alle medvirker til at få musklen til at trække sig sammen. Nogle er bevaret og ens i hele dyreriget mens andre er specielle og kan betragtes som raffineringer der tilpasser musklen til en speciel funktion bestemt af dyrets levevis. En tabel over hyppigt forekommende proteiner ses bagerst (tabel 1).

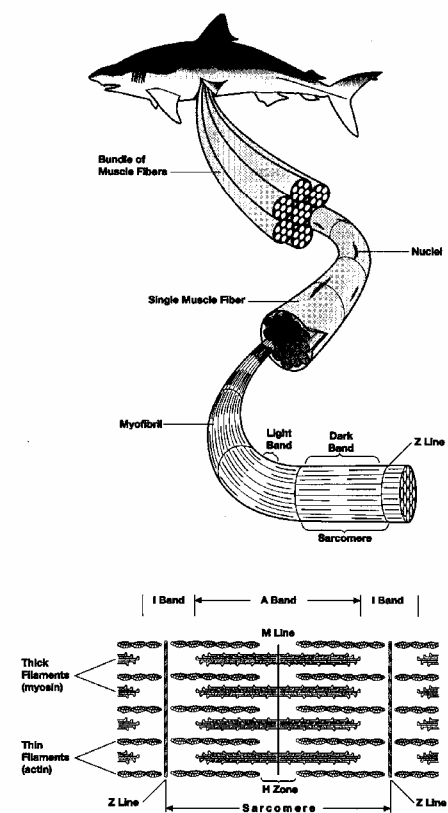
Proteiner er sammensat af aminosyrer.

Aminosyrer indeholder en aminogruppe og en carboxylsyregruppe, der begge bruges til binding, når aminosyrer sættes sammen til proteiner. Derudover indeholder de også en sidekæde. Det er i høj grad denne sidekæde der giver aminosyrer og dermed proteinet sine egenskaber.

Hvilke aminosyrer der sættes sammen i et givet protein bestemmes af organismens DNA. Proteinets opbygning er altså arveligt bestemt. Dette betyder at proteiner kan bruges til at studere bestemte egenskaber eller rettere påvise aktive gener i organismer. Eksempelvis kan man påvise et bestemt protein, vitellogenin, i dyr der er under påvirkning af hunligt kønshormon, og det kan derfor bruges til at påvise kønsskifte hos hanfisk i hormonforurenede vandløb.

Ligeledes kan proteiner bruges til at bestemme slægtskab fordi et bestemt protein, fx det sammentrækkelige (kontraktile) element i en muskel har lidt forskelligt udseende i forskellige dyr, men jo nærmere beslægtede to dyr er desto mere ens er deres DNA og jo mere ens er deres proteiner så også.

Dette sidste skal vi undersøge i denne øvelse. Muskler (det kontraktile element) består især af to proteiner aktin og myosin. De to proteiner oprenses sammen med en del andre proteiner fra forskellige fiskearters kød. Dernæst sorteres de efter størrelse ved elektroforese og til sidst farves proteinerne.

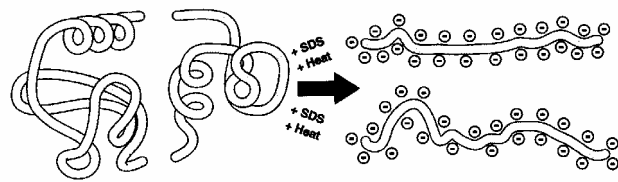


Teori:

Elektroforese er en meget udbredt teknik til adskillelse af proteiner og DNA. Det kan opfattes som en slags forhindringløb for proteiner. Forhindringsbanen kaldes en gel. I dette tilfælde er forhindringsbanen et kemisk stof kaldet polyscrylamid og i hver ende er der en elektrode. Det er således elektriske kræfter der trækker i molekylerne, i dette tilfælde proteiner.

For at adskille proteiner skal de første forbehandles. Dette går ud på at nedbryde den tredimensionelle opbygning af proteinet. Første tilsættes et stof der fjerner svovlbroer i proteinet (et reducerende stof der laver -S-S- (svovlbroer) om til -S-H + H-S- (to cystein-aminosyrer)). Herved frigøres proteinets 3-dimensionelle struktur delvist. Dernæst udsættes det for varme således at den snoede proteinkæde foldes helt ud og et stof tilsættes, SDS der er en slags sæbe, som sætter sig på proteinet og giver det en ensartet negativ ladning som er ligeligt fordelt over hele proteinet, altså samme ladning Herved

opnås at det eneste afgørende for adskillelsen af proteinerne er deres



længde.
de

Da alle proteiner er negative, vil

bevæge sig mod den positive pol og de små proteiner vil løbe længst.

Dernæst påsættes proteinerne på gelen og der sluttet strøm til. Efter endt elektroforese farves proteinerne da de fleste proteiner fra naturens hånd er farveløse.

For at holde lidt styr på størrelserne af de sorterede proteiner sættes en blanding af farvede proteiner med kendte størrelser på gelen som reference (kaleidoskopblanding).

Desuden sættes en standardblanding med almindeligt forekommende muskelproteiner på (Actin/myosin standard).

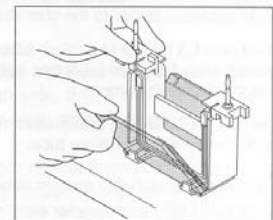
Udførelse:

A: Klargøring af elektroforesekar.

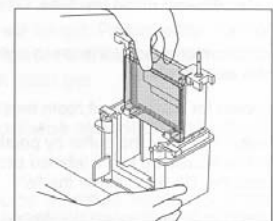
1. Først klargøres gelen som vist på tegneserien. **DER BÆRES HANDSKER NÅR GELEN HÅNDTERES:** Skær en skalpel langs linien "cut" i bunden af gelen. Træk derefter modsat i slippen "pull". Træk forsigtigt kammen op. **ske helt parallelt.** Sæt de to geler fast i den inderste holder den korte plade indad. Vær sikker på at gelen er helt i bund. holderen i inderkarret og luk med vriderne. Sæt inderkarret i minitanken.

2. Det inderste kammer fyldes helt med TGS-elektroforesebuffer (ca. 150 ml).

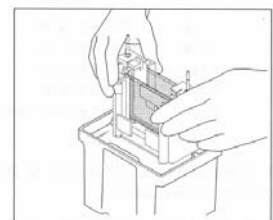
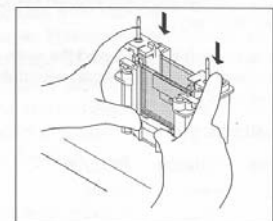
3. Fyld minitanken med ca. 200 ml TGS-elektroforesebuffer.



med

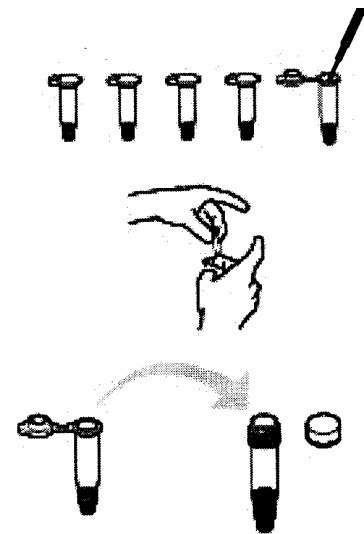


Skal
med
Sæt



B: Klargøring af protein-prøver.

1. Mærk 1 eppendorf-rør og et skruelågmikrorør for hver proteinprøve.
2. Tilsæt 250 μ l Bio-Radprøvebuffer til hvert eppendorfrør.
3. Skær en tern fiskeprotein, 2,5 mm på hver led og den ned i det mærkede eppendorfrør og luk låget
4. Knips på eppendorfrøret 15 gange så prøven blandes med prøvebufferen.
5. Stil prøven i 5 minutter ved stuetemperatur. (nu opløses og udvindes proteinerne).
6. Hæld væsken **uden fiske kød**, fra hvert eppendorfrør over i det tilsvarende mærkede skruelågsrør.
7. Få standard prøverne, (færdig farvet standard (KS) og aktin/myosin standard (AM)) udleveret af din lærer.
8. Opvarm fiskeprøverne i skruelågsrørene og AM-standarden i 5 minutter ved 95 grader C. (Nu nedbrydes den 3-dimensionelle struktur af proteinet, og der påsættes negativ ladning)

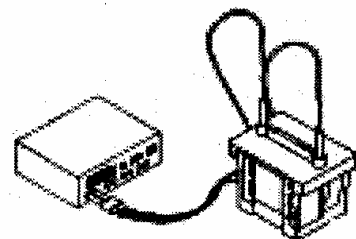


put
i.

C: Påsætning af prøver.

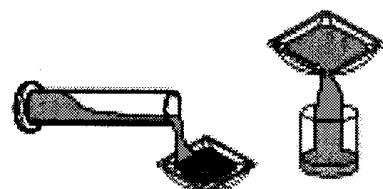
1. Påsæt prøverne efter nedenstående skema.
2. Roligt håndelag og stor tålmodighed er nødvendigt. DER SKAL SKIFTES PIPETTESPIDS IMELLEM HVER PRØVE.
3. Sæt låg på karret UDEN AT RYSTE DET og tilslut strømmen. 200 V i 30 minutter. Da alle prøverne er farvede kan elektroforesen følges meget flot og illustrativt. Lad ikke den blå linie køre længere end til bunden af gelen.

Lane	Volume	Sample
1 & 2	empty	empty
3	10 μ l	Kaleidoscope standards (KS)
4	10 μ l	fish sample 1
5	10 μ l	fish sample 2
6	10 μ l	fish sample 3
7	10 μ l	fish sample 4
8	10 μ l	fish sample 5
9	10 μ l	Actin and myosin standard (AM)
10	empty	empty



D: Farvning af gelen.

1. Låget fjernes, og elektroforesebufferen hældes ud. Gelen afmonteres og lægges på bordet med den lille plade opad. Skær tapen væk ved at skære med fast hånd i den hvide tape langs siderne, og vrid forsigtigt den ene plade væk. Gelen hænger ved den anden. Gelen skylles nu i en flad skål med vand for at vaske tiloversbleven SDS væk. Skyl to gange. Pas på for nu glider gelen let af pladen.
2. Løft gelen over i farvebadet indeholdende



coomassie blue. Lad den ligge en time.

(farvestoffet binder sig til proteiner). Vip forsigtigt farvebadet nu og da.

3. Efter en time hældes farven fra gelen og den skylles gentagne gange i vand. Lad den ligge natten over i vand.

Nu bør man kunne se en masse blå bånd på gelen og en række forskelligt farvede bånd i sporet med kaleidoskopbalningen. Hvis det er muligt - tag da et digitalt billede af gelen. Gelen kan måles op. Dvs at man måler hvor langt de enkelte bånd har bevæget sig i millimeter fra påsætningstedet. Dette kan fx gøres ved at tegne den af på følgende måde. Læg et ark OHP-plastik på gelen og tegn den af med en vandfast spritpen. Eventuelt kan I prøve at fotokopiere den. Det er også muligt at tørre gelen.