

BIKE 2035 Biokemian työkurssi, tentti 18.5.07

Tentin kokonaispistemäärä on 50 p, läpäisyraja on 25 p.

Käytä aina kun mahdollista, piirroksia ja kaavioita kuvaamaan asioita, mutta muista myös selittää piirtämäsi kuvat.

1. Punasolumembraanien lipidien eristäminen tapahtuu uuttamalla. (6p)
Fosfaattipuskurissa olevaan membraanisuspensioon lisätään metanolia ja kloroformia sekä vettä niin, että vesi:metanoli:kloroformi-suhde on lopulta 1,8:2:2. Perusteellisen sekoituksen jälkeen muodostuu kaksi faasia.
 - a. Mikä on yläfaasin ja mikä alafaasin liuotin tai liuotinseos?
 - b. Mitä yhdisteitä tai yhdisteryhmiä on liuenneena yläfaasiin?
 - c. Mitä yhdisteitä tai yhdisteryhmiä on liuenneena alafaasiin?
2. Eristettyjen punasolumembraanien lipidifraktiosta määritettiin fosfolipidit (4p)
värireaktiolla. Mitä kemiallisia reaktioita tapahtuu näytteen valmistuksessa ja itse värireaktiossa?
3. Proteiinien analysoinnissa voidaan käyttää SDS-PAGEa. (10p)
 - a. Mihin perustuu proteiinien erottuminen SDS-PAGEssa?
 - b. Miten SDS-PAGE suoritetaan? Kuvaa tärkeimmät vaiheet ja niiden merkitys!
4. α -Laktalbumiinia puhdistettiin affiniteettikromatografialla. Kuvaa käytetyn (10p)
kromatografiamenetelmän periaate, suoritus ja odotettu lopputulos.
5. α -Laktalbumiinin puhdistuksen yhteydessä kerätyistä näytteistä tehtiin (10p)
SDS-PAGE ja Western-blottaus. Seuraavassa tätä koskevia kysymyksiä:
 - a. SDS-PAGE:n jälkeen geeli tasapainotettiin Tris-glysiini-metanoli-puskurissa, pH 8,3, laitettiin kontaktiin PVDF-kalvon kanssa ja ajettiin Trans-blot-laitteessa (100 V) siten, että membraani oli anodin puolella. Mitä tässä siirrossa tapahtui?
 - b. Siirron jälkeen membraani värjätettiin Ponceau S-väriliuoksessa. Mitä tässä värjäyksessä tuli esille?
 - c. Tämän jälkeen membraania käsiteltiin gelatiiniliuoksessa. Mikä oli käsittelyn tarkoitus?
 - d. Membraania käsiteltiin seuraavaksi primaarivasta-aineessa, joka oli laimennettu pullosta, jonka päällä luki: goat anti-bovine α -lactalbumin. Mitä tämä on ja mikä oli käsittelyn tarkoitus?
 - e. Mitä näiden vaiheiden jälkeen vielä piti tehdä α -laktalbumiinin osittamiseksi membraanilta?

6. Olet puhdistanut erään entsyymin ja seurannut puhdistuksen etenemistä tekemällä eri vaiheista mittauksia, joiden perusteella olet saanut selvitettyä alkuperäisen soluhomogenaatin ja kunkin puhdistusvaiheen kokonaisproteiinin määrän ja entsyymin aktiivisuuden. Tulokset ovat taulukossa. Laadi vielä tulosten perusteella puhdistustaulukko, josta ilmenevät kunkin vaiheen saalis (%), spesifinen aktiivisuus ja puhdistuskerroin. (10p)

Fraktio	entsyymin aktiivisuus (10^6 U/mg)	proteiinimäärä (mg)
soluhomogenaatti	51,2	314,0
suolasaostus	31,1	21,3
ionivaihtokromatografia	17,1	2,38
geelisuodatus	8,3	0,093