

BIKE 2035 Biokemian työkurssi II, tentti 30.4.09

Tentin kokonaispistemäärä on 40 p, hyväksymisraja 20 p.

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

1. Proteiinien analysoinnissa yleisimmin käytetty analyttinen menetelmä on SDS-PAGEa. (10p)
 - a. Mitä lyhenne tarkoittaa?
 - b. Mihin perustuu proteiinien konsentroituminen ylägeelissä (stackin gel)?
 - c. Mihin perustuu proteiinien erottuminen alageelissä (resolving gel)?
2. α -Laktalbumiinin puhdistuksessa käytettiin IMAC-sepharose affiniteettikromatografiaa. (10 p)
 - a. Mihin affiniteettikromatografinen puhdistusmenetelmä yleisesti perustuu ja milloin sitä voidaan käyttää?
 - b. Mihin IMAC-sepharose-affiniteettikromatografian käyttö α -laktalbumiinin puhdistuksessa perustuu? Miten α -laktalbumiini sitoutui pylvääseen ja miten se eluoiitiin?
3. α -Laktalbumiinin puhdistuksen yhteydessä kerätyistä näytteistä tehtiin SDS-PAGE ja Western-blottaus. Seuraavassa tätä koskevia kysymyksiä: (10p)
 - 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 voitiin värjätä Ponceau S-väriliuoksessa. Mitä tässä värjäyksessä tulee 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?
4. 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 (10^3 /mg)	proteiinimäärä (mg)
soluhomogenaatti	51,2	314,0
suolasaostus	31,1	21,3
ionivaihtokromatografia	17,1	2,38
geelisuodatus	8,3	0,093

Muista vastata kurssipalautteeseen!

Hauskaa vappua!