

ΠΕΙΡΑΜΑ 1: Απομόνωση και χαρακτηρισμός α-Λακταλβουμίνης
(Αναφορά Εργαστηρίου)

Όν/μο (α): _____ Α.Μ.: _____

Ημέρα/Θέση: _____ Ημ/νία: _____

A. Παρασκευή υπερκείμενου B

Αναφέρετε (συνοπτικά) γιατί επιλέχθηκε κάθε στάδιο επεξεργασίας στο συγκεκριμένο πείραμα και τι επίδραση είχε πάνω στο δείγμα.

1^η φυγοκέντριση:

Οξίνιση και θέρμανση υπό ανάδευση:

2^η φυγοκέντριση:

Φιλτράρισμα:

Φύλαξη στους -12° C:

B. Χρωματογραφία

1) Αναφέρετε γιατί χρησιμοποιείτε χρωματογραφία συγγένειας και με ποιο τρόπο επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός.

2) Όγκος χρωματογραφικού υλικού πλήρωσης:

Ρυθμιστικό εξισορρόπησης:

3) Συγκέντρωση δείγματος (mg/ml):

Όγκος δείγματος που φορτώθηκε στην κολώνα:

4) Πλύσιμο κολώνας-συμπληρώστε τον πίνακα:

| # κλάσματος | Όγκος (ml) | Απορρόφηση A ₂₈₀ |
|-------------|------------|-----------------------------|
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |

Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης:

5) Έκλουση δείγματος-συμπληρώστε τον πίνακα:

| # κλάσματος | Όγκος (ml) | Απορρόφηση A ₂₈₀ |
|-------------|------------|-----------------------------|
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |

Ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης:

6) Σχεδιάστε τα διαγράμματα της απορρόφησης A₂₈₀ (άξονας y) προς τον αριθμό των εκλούμενων κλασμάτων (άξονας x) για τους παραπάνω πίνακες και επισυνάψτε τα στην αναφορά σας. Πόσες πρωτεΐνες έχετε απομονώσει; Ποια βρίσκεται σε μεγαλύτερη αναλογία; Πιστεύεται ότι κάθε κορυφή περιέχει μία μόνο πρωτεΐνη ή ένα μίγμα πρωτεϊνών;

7) Αναφέρετε ποια κλάσματα επιλέξατε για περαιτέρω μελέτη και γιατί.

Γ. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford

1) Πίνακας δεδομένων για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης

| Δείγμα, # | H ₂ O (μl) | Όγκος (μl) πρότυπου διαλύματος πρωτεΐνης (BSA, 1mg/ml) | μg πρωτεΐνης | διάλυμα Bradford (ml) | A ₅₉₅ |
|-----------|-----------------------|--|--------------|-----------------------|------------------|
| 1 | 100 | 0 | - | 1 | |
| 2 | 95 | 5 | | 1 | |
| 3 | 92,5 | 7,5 | | 1 | |
| 4 | 90 | 10 | | 1 | |
| 5 | 87,5 | 12,5 | | 1 | |
| 6 | 85 | 15 | | 1 | |

2) Σχεδιάστε το διάγραμμα με τα δεδομένα σας για την BSA τοποθετώντας στον άξονα y την απορρόφηση και στον άξονα x τα μg (ή mg) της πρωτεΐνης που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε περίπτωση και επισυνάψτε το στην αναφορά.

Αυτή είναι η καμπύλη αναφοράς από την οποία θα υπολογίσετε τη συγκέντρωση της συνολικής πρωτεΐνης στα δείγματα άγνωστης συγκέντρωσης που συλλέξατε από τα στάδια A και B του πειράματος (σε mg/ml) καθώς και τη συγκέντρωση του αγνώστου δείγματος που σας δόθηκε.

3) Πίνακας δεδομένων για τα δείγματα άγνωστης συγκέντρωσης (σε περίπτωση που έχουν διαφοροποιηθεί οι ποσότητες για την παρασκευή των δειγμάτων, συμπληρώστε τον πίνακα κατάλληλα):

| Δείγμα, # | H ₂ O (μl) | Όγκος αγνώστου δείγματος (μl) | μg πρωτεΐνης | διάλυμα Bradford (ml) | A ₅₉₅ | Συγκέντρωση δείγματος (μg/μl ή mg/ml) |
|-----------|-----------------------|-------------------------------|--------------|-----------------------|------------------|---------------------------------------|
| 7 | 95 | Τυρόγαλα 5 | | 1 | | |
| 8 | 0 | ρυθμ/κο A 100 | | 1 | | |
| 9 | 50 | ρυθμ/κο B 50 | | 1 | | |
| 10 | 95 | α λακτ/νη (άγνωστο) 5 | | 1 | | |

Γ. Ηλεκτροφόρηση

1) Αναφέρετε πώς επεξεργαστήκατε τα δείγματά σας πριν τα φορτώσετε στην πηκτή.

Συμπληρώστε τον παρακάτω πίνακα:

| # θέσης | δείγμα | αναλογία δείγμα-sample buffer (μl/μl) | όγκος δείγματος/slot (μl) |
|---------|--------|--|------------------------------|
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |

2) Σχολιάστε την ποιότητα διαχωρισμού των δειγμάτων σας συμπεριλαμβάνοντας ένα σκίτσο ή μια φωτογραφία της πηκτής. Σημειώστε (σωστά!) ποιο δείγμα αντιστοιχεί σε κάθε θέση.

3) Γιατί σε κάποιες θέσεις υπάρχουν παραπάνω από μία μπάντες; Τι αντιπροσωπεύει κάθε μπάντα στη συγκεκριμένη μέθοδο ηλεκτροφόρησης;