

**PENGGUNAAN KAEDAH 2D-PAGE
UNTUK KAJIAN PENGEKSPRESAN
PROTEIN SEMASA
EMBRIOGENESIS *Puntius gonionotus***

SUHaida BINTI AHMAT @ AMIRUDDIN

**MASTER SAINS
UNIVERSITI PUTRA MALAYSIA**

2004

**PENGGUNAAN 2D-SDS PAGE UNTUK KAJIAN
PENGEKSPRESAN PROTEIN SEMASA
EMBRIOGENESIS *Puntius gonionotus***

Oleh

SUHaida BINTI AHMAT @ AMIRUDDIN

**Tesis Ini Dikemukakan Kepada Sekolah Pengajian Siswazah,
Universiti Putra Malaysia Sebagai Memenuhi Keperluan Untuk
Ijazah Master Sains**

Oktober 2004

Teristimewa buat:

*Emak, Abah, Along, Angah dan Nani.....tidak
dilupakan buat Suami tersayang: Mohd Abd Rahman inilah
hasil sokongan yang kalian berikan.....Kalian adalah dian
yang menerangi hidupku.....juga buat insan yang
bakal hadir dalam hidup kami*

Abstrak tesis dikemukakan kepada Senat Universiti Putra Malaysia
sebagai memenuhi keperluan untuk ijazah Master Sains

**PENGGUNAAN 2D-SDS PAGE UNTUK KAJIAN
PENGEKSPRESAN PROTEIN SEMASA
EMBRIOGENESIS *Puntius gonionotus***

Oleh

SUHaida BINTI AHMAT @ AMIRUDDIN

Oktober 2004

Pengerusi : Ismail Omar

Fakulti : Bioteknologi dan Sains Biomolekular

Pengekspresan protein dapat dikesan dengan menggunakan elektroforesis 2-dimensi (2-DE) dan hasilnya adalah suatu elektroferogram. Elektroferogram ini kemudiannya perlu diwarnakan bagi menghasilkan suatu peta protein. Peta protein yang terhasil ini merupakan kajian kuantitatif bagi memerhati perubahan protein yang diekspreskan oleh sesuatu tisu, sel mahupun bendalir badan. Kajian ini dapat mengenal pasti protein yang hadir atau juga yang hilang ketika proses embriogenesis berlaku .

Dalam kerja selidik ini, pengekspresan protein semasa embriogenesis *Puntius gonionotus* telah menunjukkan protein tersebut mengalami perubahan semasa melalui tujuh fasa perkembangan yang dikaji. Matlamat utama penyelidikan ini adalah bertujuan untuk memajukan kaedah 2-DE bagi mengkaji perubahan protein yang berlaku semasa embriogenesis.

Bagi memajukan kaedah ini beberapa kerja preliminari dijalankan terlebih dahulu, iaitu pemilihan penimbal lisis, peratusan gel dan juga pewarnaan gel yang sesuai. Elektroforesis dua-dimensi (2-DE) merupakan suatu kaedah yang digunakan dalam mengkaji ekspresi protein secara keseluruhan dalam sesuatu sampel. Melalui kaedah ini, campuran protein kompleks dapat dipisahkan dalam gel poliakrilamida berdasarkan cas dan berat molekul protein tersebut.

Pemilihan penimbal lisis yang sesuai perlu dilakukan berikutan tiada satu pun kaedah penyediaan sampel yang dapat digunakan secara universal bagi mengekstrak semua jenis protein yang terkandung dalam setiap sampel yang dikaji. Oleh yang demikian, bagi melakukan perbandingan, beberapa jenis penimbal lisis berdasarkan kepada kaedah Görg *et al.* (2000) dan Kanaya *et al.* (2000) samada yang

asal dan juga yang telah diubahsuai serta penimbal Triton X-100 telah digunakan. Seterusnya ekstrak-ekstrak protein tersebut dinilai melalui elektroforesis 1-dimensi. Penimbal lisis Kanaya *et al.* (2000) yang telah diubahsuai adalah didapati larutan pengekstrak yang paling berkesan bagi melarutkan protein telur *Puntius gonionotus*. Penggunaan penimbal ini dapat menghasilkan jumlah jalur protein yang paling banyak dalam pemisahan elektroforesis 1-dimensi. Penimbal lisis ini seterusnya telah digunakan untuk mengekstrak protein dari beberapa fasa embriogenesis *Puntius gonionotus*.

Seterusnya, penentuan peratusan gel yang sesuai pula telah dilakukan dengan menggunakan empat jenis peratusan gel yang berbeza. Ia amat penting dalam memastikan julat pengasingan protein yang dikaji adalah luas. Didapati SDS-PAGE yang mempunyai peratusan gel 12% telah dipilih berikutan ia berjaya mengasingkan protein dalam julat yang luas.

Langkah terakhir bagi memajukan kaedah ini, pemilihan kaedah pewarnaan gel pada elektroferogram yang dihasilkan dilakukan. Ia dilakukan untuk mengesan protein yang telah dipisahkan. 'Coomassie Brilliant Blue R-250' dan pewarnaan 'silver' telah dipilih untuk

dilakukan perbandingan. Peta protein merupakan hasil akhir yang diperoleh dan ia hanya berjaya diwarnakan melalui pewarnaan 'silver'.

Melalui peta protein yang diperoleh didapati, degradasi dan sintesis protein berlaku sepanjang proses embriogenesis. Terdapat protein baru dihasilkan bagi setiap fasa embriogenesis. Namun begitu, ada juga protein yang tidak dapat dikesan setelah melalui fasa perkembangan embrio tersebut. Boleh dikatakan kebanyakan protein yang diperoleh adalah bersifat basik dengan julat pH diantara pH 7.5 - pH 10.

Abstract of thesis presented to Senate of Universiti Putra Malaysia in
fulfilment of the requirements for the degree of Master of Science

**DEVELOPMENT OF 2-DIMENSIONAL ELECTROFORESIS FOR
PROTEIN EXPRESSION DURING EMBRIOGENESIS IN *Puntius
gonionotus***

By

SUHaida BINTI AHMAT @ AMIRUDDIN

October 2004

Chairman : Ismail bin Omar

Faculty : Biotechnology and Biomolecular Science

Protein expression can be detected through 2- dimension electrophoresis (2-DE) and the result is known as an electropherogram. The electropherogram is then stained to produce a protein map. This protein map is a quantitative study to obtain the protein changes expressed by tissues, cells or even body fluids. This study is used to determine the visible or disappeared protein during embryogenesis process.

In this investigation, protein expression during embryogenesis of *Puntius gonionotus* shows that the protein went through seven phases of development modification. The main objective of this study is to improve the 2-DE method.

Few preliminary steps have been done to improve the method such as selection of lysis buffer, gel percentage and also suitable gel staining method. In general 2-DE is a method used for protein expression of any sample. Through this method, mixture of a protein complex can be separated in a polyacrylamide gel according to charge and molecular weight of the protein.

Selection of suitable lysis buffer have been done since there is no universal sample preparation method to extract all kinds of protein contained in each sample. Therefore, for comparison, a few type of lysis buffer according to the method used by Görg *et al.* (2000) and Kanaya *et al.* (2000) whether the original or modified method and also Triton X-100 buffer have been used. Hence, the protein extracts are valued by 1-DE. The modified lysis buffer by Kanaya *et al.* (2000) is the best extraction solution to dissolve the egg *Puntius gonionotus* protein. This lysis buffer showed the most protein bands in 1-DE separation.

The buffer is then used to extract proteins in few phases of *Puntius gonionotus* embryogenesis.

The next is the selection of suitable gel percentage done with four different gel percentages. This is important to make sure the broad range of protein separation. From this experiment, SDS-PAGE with 12 % (v/v) gel selected since it have a broad protein separation.

The last step to improve this method is the electropherogram gel staining method. It used to detect the separated protein. Coomassie Brilliant Blue R-250 and silver staining methods were selected for comparison. Protein mapping is the last stage of result obtained from silver staining procedure.

Through the protein mapping, degradation and protein synthesis occur throughout the embryogenesis process. There are new proteins produced at each embryogenesis phase, though there are few proteins not detected after embryo development phase. Most of the proteins are basic with the pH range of 7.5 to 10.0.

PENGHARGAAN

DENGAN NAMA ALLAH YANG MAHA PEMURAH LAGI
PENYAYANG

Alhamdulillah, syukur ke hadrat Ilahi dengan limpah kurnia-Nya, dapatlah akhirnya saya menyiapkan tesis ini dengan jayanya. Sekalung penghargaan dan ucapan terima kasih ditujukan khas buat pengerusi Jawatan kuasa Penyeliaan, En. Ismail Omar, Professor Madya Dr. Nor Aripin Shamaan serta Professor Dr. Mohd Arif Syed selaku ahli jawatakuasa diatas segala dorongan, bimbingan dan nasihat sepanjang pelaksanaan projek ini.

Ucapan terima kasih ini juga dirakamkan kepada En. Jasni dari Jabatan Penetasan serta Penternakan UPM beserta Pelajar Master dari Philipina, Carina diatas bantuan yang diberikan dalam melakukan teknik pembenihan aruhan bagi *Puntius gonionotus* yang buat pertama kali saya lakukan. Tidak ketinggalan semua kakitangan Jabatan Biokimia dan Mikrobiologi, Fakulti Sains dan Pengajian Alam Sekitar, UPM, terutamanya Pn. Siti Rodziah dan juga individu samada yang terlibat secara langsung atau tidak dalam menjayakan projek ini.

Buat rakan seperjuangan Ezarul Faradianna Lokman, Jawahir Jamid, Mohd Zahari Tajul Hassan , Noor Azlina Masdor, Vanitha Mariappan dan Lailatul Jumaiyyah Saleh Huddin jutaan terima kasih ditujukan kepada kalian atas dorongan, semangat serta pandangan yang telah diberikan.

Tidak dilupakan buat abah, mak serta keluarga tercinta diatas pengorbanan dan kesabaran yang diberikan. Pengorbanan yang penuh dengan seribu makna ini akan saya kenang buat selama-lamanya . Akhir sekali buat suami tersayang, Mohd Abd Rahman Saleh, terima kasih atas sokongan dan kasih sayang yang telah dicurahkan. Semoga Allah memberkati apa yang kita lakukan. Insyaallah.

Saya mengesahkan bahawa Jawatankuasa Pemeriksa bagi Suhaidah bt. Ahmat @ Amiruddin telah mengadakan peperiksaan akhir pada 26hb Oktober 2004 untuk menilai tesis Master Sains beliau yang bertajuk "Penggunaan Kaedah 2D-SDS PAGE untuk Kajian Pengekspresan Protein Semasa Embryogenesis *Puntius gonionotus* " mengikut akta Universiti Pertanian Malaysia (Ijazah Lanjutan) 1980 dan peraturan-peraturan Universiti Pertanian Malaysia (Ijazah Lanjutan) 1981. Jawatankuasa Pemeriksa memperakukan bahawa calon ini layak dianugerahi ijazah tersebut. Anggota Jawatankuasa Pemeriksa adalah seperti berikut:

Mohd Yunus Abd Shukor, Ph. D.

Fakulti Bioteknologi dan Sain Biomolekular
Universiti Putra Malaysia
(Pengerusi)

Radzali Muse, Ph. D.

Profesor Madya
Fakulti Bioteknologi dan Sain Biomolekular
Universiti Putra Malaysia
(Ahli)

Janna Ong Abdullah @ Ong Weoi Choo, Ph. D.

Fakulti Bioteknologi dan Sain Biomolekular
Universiti Putra Malaysia
(Ahli)

Musalmah Mazlan , Ph. D.

Profesor Madya
Fakulti Perubatan
Universiti Kebangsaan Malaysia
(Pemeriksa Luar)

ZAKARIAH ABD. RASHID, Ph. D.

Profesor/Timbangan Dekan
Sekolah Pengajian Siswazah
Universiti Putra Malaysia

Tarikh:

Tesis ini telah diserahkan kepada Senat Universiti Putra Malaysia dan telah diterima sebagai memenuhi syarat keperluan untuk ijazah Master Sains. Anggota Jawatankuasa Penyelia adalah seperti berikut:

Ismail Omar

Fakulti Bioteknologi dan Sain Biomolekular
Universiti Putra Malaysia
(Pengerusi)

Nor Aripin Shamaan, Ph. D.

Profesor Madya
Fakulti Bioteknologi dan Sain Biomolekular
Universiti Putra Malaysia
(Ahli)

Mohd Arif Syed, Ph. D.

Profesor
Fakulti Bioteknologi dan Sain Biomolekular
Universiti Putra Malaysia
(Ahli)

AINI IDERIS, Ph. D.

Profesor/Dekan
Sekolah Pengajian Siswazah
Universiti Putra Malaysia

Tarikh:

PERAKUAN

Dengan ini adalah disahkan bahawa tesis yang dikemukakan oleh saya adalah dari kerja asal saya sendiri kecuali sesetengah petikan yang mana digunakan sebagai perakuan kebenaran. Saya juga mengesahkan tesis ini tidak pernah diserahkan pada mana-mana ijazah di UPM mahupun institusi-isntitisi pengajian tinggi yang lain

SUHaida BT AHMAT @ AMIRUDDIN

Tarikh:

ISI KANDUNGAN

Muka surat

DEDIKASI	ii
ABSTRAK	iii
ABSTRACT	vii
PENGHARGAAN	x
PENGESAHAN	xii
PERAKUAN	xiv
SENARAI JADUAL	xviii
SENARAI RAJAH	xx
SENERAI SINGKATAN	xxii
ISTILAH	xxiii
BAB	
I PENGENALAN	1
Objektif	5
II PENULISAN KAJIAN LEPAS	6
EMBRIOLOGI IKAN	6
Pengenalan	6
Sistem endokrin ikan	7
Gametogenesis	9
Spermatogenesis	9
Oogenesis	10
Protein Yolka	12
Embryogenesis bagi ikan	14
Kepentingan protein semasa embriogenesis	17
TERNAKAN IKAN AIR TAWAR DI MALAYSIA	19
PROTEOMIK	23
ELEKTROFORESIS DUA-DIMENSI	26
Pengenalan	26
Sejarah elektroforesis 2-Dimensi	27
Elektroforesis 2-Dimensi dengan	
‘immobilized pH Gradient’ (IPG)	31

PENYEDIAAN SAMPEL	34	
Pemelarutan Sampel Protein	34	
Agen Penyelerak	31	
Agen Surfaktant	35	
Agen Penurun	40	
DIMENSI PERTAMA: IEF	43	
DIMENSI KEDUA: SDS-PAGE	44	
PEWARNAAN PROTEIN PADA		
GEL POLIAKRILAMIDA	46	
Kaedah pewarnaan Bukan Radioaktif	47	
Pewarnaan Coomassie Brilliant Blue R-250	47	
Pewarnaan Pendaflour	49	
Pewarnaan 'Silver'	50	
PENGANALISAAN IMEJ ELEKTROFORESIS 2-D	52	
III BAHAN, ALATAN DAN KAEDAH	54	
BAHAN	54	
Sampel Telur <i>Puntius gonionotus</i>	54	
Bahan kimia	58	
Alatan	58	
KAEDAH	60	
Carta Alir Aturcara Kerja Penyelidikan	60	
Peringkat Kerja Penyelidikan	61	
Penganggaran Kandungan Protein	62	
Pengekstrakan Sampel	63	
PENGASINGAN PROTEIN SECARA		
ELEKTROFORESIS 1-DIMENSI	65	
Pemilihan Penimbal Lisis	65	
Penentuan Peratusan Gel	67	
PENGASINGAN PROTEIN SECARA		
ELEKTROFORESIS 2-DIMENSI	68	
Pewarnaan Gel	68	
Langkah Kerja Pertama	69	
Aplikasi Sampel dan Rehidrasi IPG		69
Pemfokusan Isoelektrik	71	
Penyeimbangan Jalur IPG	72	

Langkah Kerja Kedua	74
Penyediaan SDS-PAGE	74
Pemindahan Jalur IPG dan Elektroforesis	75
Pewarnaan Gel	78
Pewarnaan Coomassie Brilliant Blue	78
Pewarnaan 'Silver'	79
Peta Protein Bagi Setiap Fasa Embriogenesis	80
IV KEPUTUSAN DAN PERBINCANGAN	81
Pengekstrakan sampel	81
Pemilihan Penimbal Lisis	84
Pemilihan Peratusan Gel	90
Pemilihan Pewarnaan Gel	95
Peta Protein Bagi Setiap Fasa Embriogenesis	100
V KESIMPULAN	118
RUJUKAN	123
APPENDIK	130
BIODATA PENULIS	140

SENARAI JADUAL

Jadual	Muka surat
1. Penganggaran pengeluaran ikan dari kolam air tawar mengikut negeri dan spesis ikan bagi tahun 2002	21
2. Anggaran pengeluaran ikan dari kolam dan sangkar air tawar, bekas lombong, tangki simen dan kandang mengikut negeri dan spesis ikan bagi tahun 2000	22
3. Pencapaian penting dalam perkembangan kaedah elektroforesis 2-D	30
4. Sampel telur yang dikutip	56
5. Jenis penimbal yang digunakan	63
6. Kandungan protein yang diperolehi menggunakan 4 jenis penimbal lisis	82
7. Kepekatan dan amaun protein yang diperolehi bagi setiap sampel melalui kaedah Bradford (1976)	100
8. Anggaran berat molekul relatif dan nilai pH bagi sampel P0	105
9. Anggaran berat molekul relatif dan nilai pH bagi sampel P1	107

10. Anggaran berat molekul relatif dan nilai pH bagi sampel P2	109
11. Anggaran berat molekul relatif dan nilai pH bagi sampel P3	111
12. Anggaran berat molekul relatif dan nilai pH bagi sampel P4	112
13. Anggaran berat molekul relatif dan nilai pH bagi sampel P5	114
14. Anggaran berat molekul relatif dan nilai pH bagi sampel P6	115
15. Jumlah bintik protein yang diperoleh bagi setiap sampel telur <i>Puntius gonionotus</i>	122

SENARAI RAJAH

Rajah	Muka surat
1. Skema laluan penghasilan hormon Gonadotropin	8
2. Peta 2-D bagi taburan protein telur <i>Oncorhynchus masou</i> sebelum menetas	14
3. Pembentukan zigot ikan Zebra selepas 24 jam disenyawakan	15
4. Gambaran secara ringkas bagi keseluruhan langkah kerja langkah kerja yang terlibat dalam elektroforesis 2-D	33
5. Teknik Aruhan Pembenuhan terhadap <i>Puntius gonionotus</i>	57
6. Mesin Pemfokusan isoelektrik	59
7. Set elektroforesis	59
8. Ringkasan atur kerja penyelidikan	60
9. Penanggalan lapisan plastik pada IPG	69
10. Perletakan jalur IPG pada bekas pemfokusan yang mengandungi sampel	70
11. 'Wick' diletakkan pada hujung IPG dengan penyepit	71
12. Ringkasan langkah kerja pertama	73
13. Jalur IPG dipindahkan ke gel PA-SDS	75
14. Agaros diisi ke dalam telaga IPG	76

15. Jalur IPG ditolak masuk ke dalam telaga IPG	77
16. Pengasingan protein berdasarkan penggunaan penimbal lisis berbeza	84
17. Gel 7.5%	93
18. Gel 10%	93
19. Gel 12%	94
20. Gel 15%	94
21. Pewarnaan 'Silver' bagi sampel P6	96
22. Pewarnaan Coomassie Brilliant Blue R-250 bagi sampel P6	96
23. Peta protein bagi sampel P0	105
24. Peta protein bagi sampel P1	107
25. Peta protein bagi sampel P2	109
26. Peta protein bagi sampel P3	111
27. Peta protein bagi sampel P4	112
28. Peta protein bagi sampel P5	114
29. Peta protein bagi sampel P6	115

SENARAI SINGKATAN

pH	- kepekatan ion hidrogen
b/i	- berat/isipadu
g	- gram
mg	- miligram
ml	- mililiter
min	- minit
μ	- mikro
%	- peratus
M	- kemolaran
kDa	- kilodalton
SDS-PAGE	- Elektroforesis gel poliakrilamida-sodium dodesil sulfat
2-DE	- Elektroforesis 2-dimensi
1-D	- 1-dimensi

ISTILAH

BAHASA INGGERIS

BAHASA MELAYU

Blastodisc

Cakera blasto

Chaotropic Agent

Agen Penyelerak

Equilibration

Penyeimbangan

Florescence

Pendaflour

Reducing Agent

Agen Penurun

Resolving gel

Gel pemisah

Stacking gel

Gel pepadat

Surfactant agent

Agen surfaktan

Zebrafish

Ikan Zebra