

Dokumen nomor : CCRC-03-018-00	Tanggal : 21 Mei 2015
Mengganti nomor : -	Tanggal : -

<b>URAIAN</b>	<b>DIBUAT OLEH</b>	<b>DIPERIKSA OLEH</b>	<b>DIPERIKSA OLEH</b>	<b>DISETUJU OLEH</b>
Jabatan	Staf CCRC	Staf CCRC	Supervisor CCRC	Pimpinan CCRC
Paraf				
Nama	Sri Handayani			Edy Meiyanto
Tanggal	21 Mei 2015			

**PROTOKOL**

**GELATIN ZYMOGRAPHY**

DAFTAR ISI

	HALAMAN
DAFTAR ISI	1
A. RIWAYAT REVISI DOKUMEN	2
B. TUJUAN	2
C. PENDAHULUAN	2
D. OPERASIONAL	3

Dokumen nomor : CCRC-03-018-00	Tanggal : 21 Mei 2015
Mengganti nomor : -	Tanggal : -

**A. RIWAYAT REVISI DOKUMEN**

No Dokumen	Tanggal	Dibuat oleh	Diperiksa oleh	Diperiksa oleh	Disetujui oleh
-		Sri Handayani Staff CCRC	/	Riris Istighfari J Supervisor CCRC	Edy Meiyanto Pimpinan CCRC
<b>Isi</b>					
No Dokumen	Tanggal	Dibuat oleh	Diperiksa oleh	Diperiksa oleh	Disetujui oleh
<b>Isi</b>					
<b>Isi</b>					

**B. TUJUAN**

Memberikan panduan secara detail dan bertahap mulai dari persiapan reagen, gel, lisat sel dan pelaksanaan *gelatin zymography* dari protein sel kanker dengan deteksi MMP-2 dan MMP-9 secara visual.

**C. PENDAHULUAN**

Gelatin zymography merupakan metode elektroforesis yang menggunakan sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel dengan kopolimer berupa gelatin. Gelatin zymography digunakan untuk mendeteksi aktivitas gelatinase : MMP-2 dan MMP-9

**D. OPERASIONAL**

**NB.** Untuk penghematan. Persiapan untuk uji migrasi ini bersamaan dengan uji apoptosis flowcytometry.

**1. Alat**

- Mikropipet 20, 200, 1000 µl
- Tabung reaksi kecil
- Rak tabung kecil
- 24-well plate
- Yellow tip

**2. Bahan**

- Stok sampel dengan konsentrasi tertentu
- DMSO/aquabidest (pelarut sampel)
- Medium Kultur (DMEM/RPMI)
- PBS 1x

**3. Preparasi sampel protein**

**a. Media Kultur**

No	Prosedur Kerja	Perhatian
1.	Sebanyak $5 \times 10^5$ sel ditanam dalam TCD 3	Sel yang digunakan adalah <i>metastatic</i>

Dokumen nomor : CCRC-03-018-00	Tanggal : 21 Mei 2015
Mengganti nomor : -	Tanggal : -

	cm dengan 3 ml media kultur dan diinkubasi selama 24 jam	<i>cell line</i>
2.	Buat larutan uji dengan menggunakan media kultur dengan 0.5% FBS	Volume untuk perlakuan adalah 2 mL. Untuk meningkatkan gelatinase dapat ditambahkan estradiol 40 nM
3.	Setelah inkubasi, buang media kemudian sel dicuci dengan PBS 1 mL sebanyak 1 kali	
4.	Masukan larutan uji dalam sel pada TCD 3 cm kemudian sel diinkubasi kembali selama 24 jam	
5.	Ambil media kultur dan tempatkan dalam <i>microtube</i> 2 mL	Media dalam <i>microtube</i> diletakkan pada suhu 4°C untuk menjaga kestabilan enzim
6.	Lakukan sentrifuge selama 3 menit (400 g, 4°C)	
7.	Ambil supernatan dan masukkan ke dalam <i>microtube</i> baru.	Sampel dapat disimpan pada -80°C jika tidak langsung dilakukan analisis

#### b. Lisat

\*lihat protokol Western Blot

Sampel yang dimasukkan dalam sumuran tidak perlu dipanaskan terlebih dahulu

#### 4. Elektroforesis

##### a. Separating gel 8%

Bahan	2 gel	1 gel
ddH <sub>2</sub> O	5.75 ml	2.875 ml
30% acrylamide/0.8% bisacrylamide	4.0 ml	2.0 ml
1.5 MTris HCl, pH 8.8	3.75 ml	1.875 ml
Gelatin Solution (20 mg/mL, 1 % w/v SDS)	1.5 ml	0.75 ml
10% w/v APS	50 µL	25 µL
TEMED	10 µL	5 µL
Total volume	15.060 ml	7.530 ml

##### b. Stacking gel

Bahan	2 gel
ddH <sub>2</sub> O	3.05 ml
30% acrylamide/0.8% bisacrylamide	0.65 ml
0.5 MTris HCl, pH 6.8	1.25 ml
10% SDS	50 µL
10% w/v APS	25 µL
TEMED	8 µL
Total volume	5.033 ml

Dokumen nomor : CCRC-03-018-00	Tanggal : 21 Mei 2015
Mengganti nomor : -	Tanggal : -

\* 30% acrylamide/0.8% bisacrylamide (BA)

Akrilamid	29 g	14.5 g
Bisakrilamid	1 g	0.5 g
Aquabidest (warm, heating)	ad 100 mL	ad 50 mL

(Bis/Acrylamide disimpan pada temperatur 4°C dengan dibungkus aluminium foil)

\* APS

Ammonium persulfate	100 mg
ddH <sub>2</sub> O	ad 1 mL

(APS dibuat fresh atau dapat disimpan pada 4°C selama 2 minggu)

\* Gelatin solution

Gelatin	100 mg
ddH <sub>2</sub> O	4.5 mL
10% SDS	0.5 mL

(dapat disimpan selama 6 bulan pada temperatur 4°C)

\* 1.5 M Tris HCl, pH 8.8

Tris (BM : 121,1)	18.17 g
Aquabidest	75 mL
HCL	ad pH 8,8
Aquabidest	ad 100 mL

(disimpan pada temperatur kamar)

\* 1 M Tris HCL pH 6,8

Tris (BM : 121,1)	12.1 g
Aquabidest	75 mL
HCL	ad pH 6,8
Aquadest	ad 100 mL

(disimpan pada temperatur kamar)

\* Komposisi 10% SDS

SDS	1 g
Aquabidest	ad 10 mL

(disimpan pada temperatur kamar)

**c. Running buffer**

glycine	28.83 g
Tris base	6.0 g
SDS	2.0 g
ddH <sub>2</sub> O	ad 2 L

(disimpan pada temperatur kamar)

**d. Sample buffer**

Dokumen nomor : CCRC-03-018-00	Tanggal : 21 Mei 2015
Mengganti nomor : -	Tanggal : -

Prosedur Kerja Pembuatan Gel

No	Prosedur Kerja	Perhatian
1.	Bersihkan lempeng pencetak gel dan semprot dengan alkohol dan dikeringkan dengan tisu.	Jangan sampai tertinggal serabut tissue pada lempeng.
2.	Tangkupkan sepasang pencetak gel, ratakan pada alas yang rata	-
3.	Pasang pencetak gel pada alat dan putar pengunci sampai terkunci	-
4.	Untuk membuat 1 gel: siapkan conical tube 15 mL untuk <i>separating gel</i> dan 15 mL untuk <i>stacking gel</i> .	Pastikan kebersihan tube dari kotoran atau sabun yang kemungkinan masih menempel.
5.	Buat resolving dan <i>stacking gel</i> dengan masukan secara berturut turut aquadest, BA, Tris HCl, larutan gelatin/SDS sesuai formula.	-
6.	Tambahkan secara berurutan APS dan TEMED pada resolving gel kemudian campur homogen.	APS dan TEMED diberikan terakhir dan dengan cepat karena mudah memadat.
	Segera masukkan $\pm 6$ mL larutan <i>separating Gel</i> pada pencetak gel dengan blue tip.	Masukan perlahan-lahan dan diusahakan tidak timbul gelembung. Pencetak gel disisakan sedikit di atas untuk <i>Stacking gel</i> sesuai lebar sisir cetakan.
7.	Tambahkan 1 ml aquadest sampai menutup seluruh permukaan gel. Aquadest digunakan untuk menghilangkan gelembung dan meratakan permukaan gel.	aquadest dibiarkan di dalam pencetak gel sampai gel mengeras.
8.	Bersihkan lempeng pencetak gel dan semprot dengan alkohol dan dikeringkan dengan tisu.	Jangan sampai tertinggal serabut tissue pada lempeng.
9.	Biarkan <i>Separating Gel</i> mengeras pada temperatur kamar.	Waktu yang diperlukan kira-kira 45 - 60 menit.
10.	Periksa mengerasnya gel dengan melihat sisa gel yang di sentrifuge tube.	Jika sudah mengeras, biasanya yang di pencetak gel juga sudah mengeras.
11.	Ambil aquadest dengan cara pencetak gel dimiringkan dan dibantu tissue	
12.	Tambahkan pada larutan <i>stacking gel</i> secara berurutan APS dan TEMED kemudian campur homogen.	APS dan TEMED diberikan terakhir dan dengan cepat karena mudah memadat.
13.	Segera masukan $\pm 1$ ml larutan <i>stacking gel</i> dengan blue tip ke pencetak gel sampai pencetak gel penuh dan segera pasang sisir pelan-pelan.	<i>Stacking gel</i> cepat mengeras sehingga harus cepat dimasukan pencetak gel begitu ditambahkan TEMED. Tidak boleh ada gelembung pada gel.
14.	Biarkan <i>Stacking Gel</i> mengeras pada temperatur kamar.	Waktu yang diperlukan kira-kira 5-15 menit.
15.	Periksa mengerasnya gel dengan melihat sisa gel yang di conical tube.	Jika sudah mengeras, biasanya yang di pencetak gel juga sudah mengeras.

Dokumen nomor : CCRC-03-018-00	Tanggal : 21 Mei 2015
Mengganti nomor : -	Tanggal : -

Prosedur Kerja Elektroforesis

No	Prosedur Kerja	Perhatian
1.	Ambil lisat sel atau media kultur sel sesuai perhitungan dari protein assay dan pindahkan ke <i>microtube</i> baru kemudian tambahkan loading buffer 10x.	Volume loading buffer tergantung konsentrasi loading buffer. Untuk sampel berupa media kultur : Campurkan sampel dengan loading buffer 10x dengan perbandingan sampel : loading buffer 10x = 9 : 1 (volume total = 20 $\mu$ L)
2.	Gel yang sudah mengeras diambil sisirnya.	Lakukan dengan hati-hati jangan sampai merusak sumuran yang terbentuk.
3.	Cuci busa di sumuran dengan aquadest	
4.	Pasang gel pada chamber	
5.	Masukkan Buffer SDS Page 1x perlahan-lahan sampai chamber elektroforesis bagian tengah terpenuhi.	Jangan sampai timbul buih di bagian bawah. Buih dapat mengganggu aliran arus.
6.	Isi chamber di bagian atas gel dengan buffer SDS page 1x sampai kawat chamber paling atas tergenangi.	Jika muncul buih dibagian bawah, miringkan chamber pelan-pelan sampai buih hilang. Jika belum hilang juga, keluarkan dari chamber, masukan kembali pelan-pelan.
7.	Loading sampel dengan menggunakan white tip dan <i>prestained marker</i> 5-7 $\mu$ L dengan menggunakan white tip. <i>Prestained marker</i> diletakkan di sumuran pinggir.	Lakukan loading sampel pada sumuran perlahan-lahan dan setetes-setetes. Sampel pekat akan lebih sulit turunnya dibanding sampel encer. Pilih <i>prestained marker</i> yang sesuai dengan BM protein yang kita inginkan.
8.	Jalankan elektroforesis dengan setting voltase 125 volt (60 mA) selama 110 menit	Kabel merah +, hitam - Lihat sampai blue dye melewati stacking gel (sekitar 90 menit) kemudian ditambah waktu 20 menit
9.	Cuci lempeng gel dengan aquadest	agar tidak terlalu licin saat dipegang.
10.	Buka lempeng dengan menggunakan spatel pipih kecil. Bagian ujung kiri atas gel sebagai penanda gel 1 dan Bagian ujung kiri bawah gel sebagai penanda gel 2.	Gunakan sarung tangan karet bersih dan spatel bersih. Buka lempeng dengan kaca bagian dalam dibawah.
11.	Foto gel	Pastikan foto marker dengan baik

Dokumen nomor : CCRC-03-018-00	Tanggal : 21 Mei 2015
Mengganti nomor : -	Tanggal : -

Pencucian dan Inkubasi Gel

a. *Renaturing solution (2.5% Triton X-100 solution)*

Triton X-100	25 mL	5 mL
ddH <sub>2</sub> O	ad 1000 mL	ad 200 mL

b. *Incubation buffer/Developing buffer*

NaCl	8.766 g	4.383 g
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	1.47g	0.735 g
Tris base	6.057 g	3.0285 g
NaN <sub>3</sub>	0.5 g	0.25 g
ddH <sub>2</sub> O	ad 1000 mL	ad 500 mL

No	Prosedur Kerja	Perhatian
1.	gel dilepas dengan spatel perlahan-lahan, ambil dengan tangan dan ditampung pada wadah yang berisi renaturing solution.	Gunakan wadah plastik yang seukuran dengan gel, jangan wadah yang terlalu besar. Bersihkan lempeng gel dengan air mengalir kemudian dibilas dengan aquadest.
2.	Inkubasi gel dalam renaturing solution di atas shaker selama 30 menit pada suhu ruang	
3.	Tiriskan gel dari renaturing solution dan cuci gel menggunakan dH <sub>2</sub> O minimal 1 kali	
4	Inkubasi gel dalam <i>incubation buffer</i> di atas shaker selama 30 menit pada suhu ruang	
4.	Ganti <i>incubation buffer</i> dan inkubasi selama 20 jam pada suhu 37°C	

Pewarnaan Gel

i. *Staining solution (Commasie brilliant blue 0.05%)*

Coomassie Brilliant Blue G-250	1 g
Aquadest	450 mL
methanol	450 mL
glacial acetic acid	100 mL

ii. *Destaining solution*

methanol	100 mL
ddH <sub>2</sub> O	800 mL
acetic acid	100 mL

No	Prosedur Kerja	Perhatian
1.	Tiriskan gel dan masukkan gel dalam staining solution	
2.	Inkubasi gel dalam staining solution selama 30 menit	

Dokumen nomor : CCRC-03-018-00	Tanggal : 21 Mei 2015
Mengganti nomor : -	Tanggal : -

3.	Tiriskan gel dari staining solution dan cuci menggunakan destaining solution hingga aktivitas gelatinolitik terlihat sebagai pita yang transparan dengan latar warna biru	Pencucian dilakukan selama 24 jam. Ganti <i>destaining solution</i> jika sudah jenuh oleh CBB
4.	Foto gel	
5.	Siapkan plastik tebal, kertas whatman yang telah dipotong sesuai ukuran gel dan ditulis nama sampel per sumuran, serta panaskan sealer	
6.	Letakkan 1 gel pada plastik tebal dengan bagian atas gel di bagian bawah	Tempelkan bagian bawah gel yang rata dahulu agar gel menempel sempurna
7.	Tempelkan kertas whatman diatas gel pada posisi telungkup	Sesuaikan dengan tulisan nama sampel per sumuran
8.	Seal 2x dengan pemberian jarak untuk gel berikutnya	
9.	Lakukan mulai no. 6 untuk gel berikutnya	
10.	Foto gel dan tempelkan di logbook	

#### 4. Daftar Rujukan

- Kupai, K., Szucs, G., Cseh, S., Hajdu, I., Csonka, C., Csont, T., Ferdinandy, P., 2010. Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zymography. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods, Troubleshooting methods in pharmacology and toxicology* 61, 205–209. doi:10.1016/j.vascn.2010.02.011
- Toth, M., Fridman, R., 2001. Assessment of Gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by Gelatin Zymography. *Methods Mol. Med.* 57. doi:10.1385/1-59259-136-1:163

*Jika ada sesuatu dalam SOP ini tidak bisa dilakukan atau tidak sesuai dengan kenyataan dilapangan, segera laporkan kepada Staff/Supervisor CCRC*