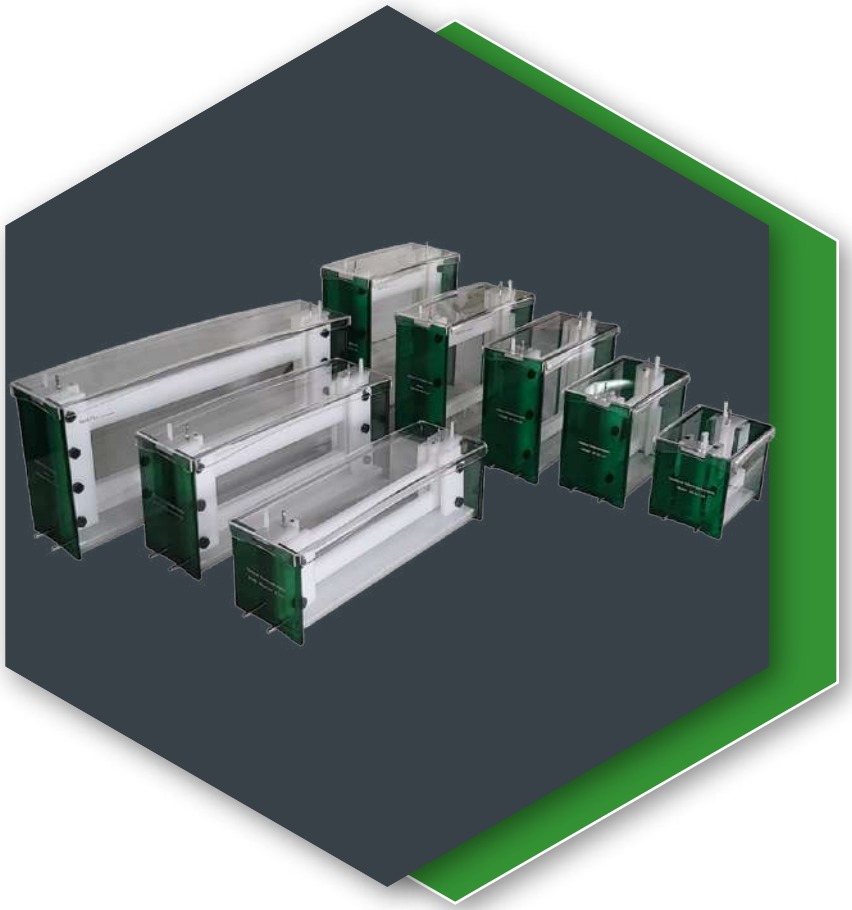
دفترچه راهنما الکتروفورز عمودی

شرکت دانش بنیان دناژن تجهیز

طراح و تولیدکننده تجهیزات آزمایشگاهی و بیوتکنولوژی



الکتروفورز عمودی (Vertical Electrophoresis)

www.Denagene.com

از اینکه دستگاه الکتروفورز عمودی دناژن تجهیز را انتخاب نموده‌اید خرسندیم. این دفترچه راهنما تنها برای مشتریان شرکت دناژن تجهیز طراحی و تدوین شده است تا با استفاده بهینه از اطلاعات و راهنمایی‌های موجود در این دفترچه از دستگاه ها به بهترین نتایج برسید.

لطفا قبل از شروع به کار دستورالعمل‌های لازم را بخوانید. این دستگاه فقط برای استفاده تحقیقاتی و تشخیصی مناسب است. که باید توسط پرسنل متخصص استفاده گردد. در صورت هرگونه استفاده غیرمعمول و نیز تغییرات ایجاد شده در آن توسط افراد فاقد صلاحیت، شرکت دنا ژن تجهیز مسئولیت هر گونه صدمه وارد شده به دستگاه را تقبل نمی کند.

تمامی محتوا و اطلاعات موجود در دفترچه راهنما تحت حفاظت حقوق کپی‌رایت دناژن تجهیز می‌باشد. هرگونه استفاده غیرمجاز از این محتوا تحت پیگرد قانونی قرار خواهد گرفت. استفاده از این مطالب برای مقاصد تجاری یا در دسترس افراد و شرکت‌های غیرمجاز ممنوع است.
در صورت بروز هر گونه سوال یا نیاز به پشتیبانی، با تیم پشتیبانی تماس حاصل فرمایید.

فهرست

مقدمه ۱

ایمنی ۲

مشخصات فنی ۳

نحوه نگهداری ٤

تکنیک SDS-PAGE ٦

اثر ژل پلی اکریل آمید ۷

تکنیک SDS-PAGE در شرایط احیایی و غیراحیایی ۸

سیستم بافری ۸

آماده سازی نمونه ۹

مواد لازم جهت انجام SDS-PAGE ۱۰

انجام آزمایش ۱۱

سر هم کردن پلیت ها ۱۱

ریختن ژل پایین ۱٦

ریختن ژل بالا ۱۷

آماده سازی جهت ران ۱۸

آماده سازی نمونه ۱۸

رنگ آمیزی ۱۹

مواد و روش رنگ آمیزی ۲۰

تعیین وزن ۲۱

مقدمه

شرکت دناژن تجهیز طراح و تولید کننده انواع مدل تانک های الکتروفورز عمودی جهت جداسازی پروتئین ها و اسیدهای نوکلئیک می باشد.

تانک های الکتروفورز عمودی ساخت شرکت دناژن تجهیز در مدل های،Mini VD 10x10، Midi VD 15x15،Maxi VD 20x20 Maxi VD 22x23 و خانواده Mega gel قابل ارایه به محققین و متخصصین می باشد. شرکت همچنین مدل های سفارشی و ویژه را طراحی و تولید می نماید.

طراحی تمامی این مدل ها به گونه ای می باشد که نیاز به گیره و سیستم های قدیمی جهت تهیه ژل را مرتفع نموده است.

در واقع در درون خود دستگاه ژل تهیه می شود و پس از آن ژل را در محفظه تانک قرار داده و دستگاه را جهت جداسازی مولکول ها به منبع تغذیه متصل می نمایند.

الکتروفورز عمودی

دستگاه تانک الکتروفورز عمودی شرکت دناژن تجهیز به صورت پکیج کاملی که شامل محفظه تانک، مادول ران کننده ژل، درب تانک، شیشه ها جهت تهیه ژل، کامب، سیم رابط، اسپیسرها، تخته ژل و کاردک جدا کننده ژل می باشد.

مادول ران کننده ژل بگونه ای می باشد که به صورت مستقیم ژل ریزی صورت می گیرد و دستگاه جهت جداسازی مولکول ها در تانک قرار می گیرد.

جهت راحتی عمل تهیه ژل اسپیسر دستگاه ها به صورت پیش فرض به شیشه مربعی چسبیده است. این اسپیسر دارای ضخامت ۱ میلیمتر می باشد. در صورت نیاز مشتری به اسپیسرهای با ضخامت دیگر، می تواند قبل از فرستادن دستگاه آن را سفارش دهد.

سیم های رابط دستگاه الکتروفورز عمودی به گونه ای طراحی شده اند که با کلیه منبع تغذیه های روتین مورد استفاده در آزمایشگاه قابلیت اتصال دارند؛ توصیه می شود جهت گرفتن نتایج بهتر از دستگاه منبع تغذیه مدل DGT Universal استفاده شود.

سیستم سیرکولاتور موجود در دستگاه قابلیت حفظ دمای محفظه و جلوگیری از گرم شدن دمای محفظه را دارد و نیاز به سیستم چیلر جهت خنک شدن را مرتفع می نماید.
همراه هر دستگاه دو عدد کامب روتین تانک های الکتروفورز عمودی می باشد. اما در صورت نیاز به کامب سفارشی و یا کامب های بیشتر لازم است قبل از فرستادن دستگاه ، با شرکت هماهنگ کنید.

ایمنی

- هنگامی که دستگاه به درستی مورد استفاده قرار می گیرد، هیچ گونه مشکل خاصی ایجاد نخواهد کرد. اما در صورتی که توسط افراد فاقد صلاحیت استفاده شود، دستگاه قابلیت ایجاد خطرات برق گرفتگی را خواهد داشت.
- فردی که قرار است از دستگاه استفاده کند، باید قبل از هر کاری راهنمای استفاده را بخوبی مطالعه نماید.
- هیچ گاه دستگاه را بدون قرار دادن درب آن استفاده نکنید.
- در صورت وجود هر گونه مشکل در بدنه تانک و درب دستگاه، به هیچ وجه از آن استفاده نکنید.
- اکریل آمید در حالت مونومر یک نوروتوکسین بسیار خطرناک می باشد. حتی ژل های پلیمریزه شده نیز حاوی مقداری مونومر اکریل آمید می باشند. بنابراین لازم است در هنگام کار با این ماده، موارد امنیتی از قبیل پوشیدن دستکش و زدن ماسک را کامل رعایت کنید.
- تانک را بیشتر از خطوط حداکثر ظرفیت بافر با running buffer پر نکنید.
- در هنگام run کردن نمونه، تانک را جابجا نکنید.
- در هنگام الکتروفورز مقادیر بسیار کمی از انواع گازها در کنار الکترودها تولید می شود. نوع گاز تولید شده به ترکیب بافر بکار برده بستگی دارد. به منظور پخش نمودن این گازها، از ران نمودن دستگاه در مکان دارای تهویه مناسب اطمینان حاصل نمایید.

مشخصات فنی

مدل	MiniVD10*10	MaxiVD 22*23
ابعاد پلیت(cm)	۱۰ × ۱۱	۲۲ × ۲۳
ابعاد ژل(cm)	۸ × ۸,۵	۲۰ × ۲۱
تعداد ژل	۲	۲
حجم ژل(ml)	۲ × ٦,۵	۲ × ٤٤,۱
ابعاد تانک(cm)	۱٤ × ۱۲,۵ × ۱۷	۲۵ × ۱۲,۵ × ۳۰
حجم بافر داخلی(ml)	۸۰	۷۵۰
حجم بافر خارجی(ml)	۱۰۰۰	۴۰۰۰
تعداد نمونه	۲ × ۱۱	۲ × ۲۴

دستورالعمل‌های نگهداری از دستگاه

- جهت تمیز کردن دستگاه از آب گرم و دترجنت متوسط استفاده گردد. آب با دمای بالاتر از ۶۰ درجه سانتیگراد می تواند به دستگاه صدمه بزند. قسمت مادول ران کننده ژل، باید با دقت با آب گرم شسته شود تا از تجمع نمک ها جلوگیری شود اما دقت شود که به الکترودهای دستگاه صدمه وارد نشود.

- هیدروکربن های آلیفاتیک، هگزان و مایع ظرفشویی جهت تمیز نمودن دستگاه بسیار مناسب می باشند. بیش از ۳۰ دقیقه دستگاه را در دترجنت ها قرار ندهید.

- به هیچ وجه دستگاه را در کنار مواد شوینده زیر قرار ندهید، زیرا این مواد می توانند موجب صدمه برگشت ناپذیر به دستگاه شوند.

- استون، فنول، کلروفرم، تتراکلرید کربن، متانول، اتانول، ایزوپروپیل الکل و آلکالین ها.

از بین بردن RNase را می توان طبق پروتکل زیر انجام داد:

ابتدا همان گونه که قبلا گفته شد، با استفاده از یک دترجنت معمولی دستگاه را تمیز نمایید.
سپس با استفاده از هیدروژن پراکسید ۳٪ (H_2O_2) به مدت ۱۰ دقیقه دستگاه را بشویید.
سپس دستگاه را با آب DEPC Treated با رقت ۰٫۱٪ شستوشو دهید.

- توجه شود که DEPC یک ماده سرطان زا می باشد. همیشه در هنگام استفاده از آن کلیه مراقبت های ایمنی را رعایت کنید.

- به صورت ماهانه، دستگاه را در محل های به هم اتصال یافته جهت هر گونه نشتی چک نمایید. برای این کار دستگاه را در یک ورقه کاغذی پیچانده و سپس با آب مقطر تا محل حداکثر ظرفیت پر نمایید. هرگونه نشتی بر روی کاغذ قابل مشاهده خواهد بود. در صورت وجود هرگونه نشتی، سعی در تعمیر نمودن آن ننمایید و در اسرع وقت دنا ژن تجهیز را مطلع نمایید.

- محل الکترودهای پلاتینی معمولا جهت محافظت به طور نسبی پوشیده شده اند. در هنگام تمیز نمودن تانک از براش های تمیز کننده در ناحیه الکترود استفاده ننمایید. معمولا کر دادن با آب مقطر کافی می باشد.

تکنیک SDS-PAGE

تکنیک SDS-PAGE یک روش کم هزینه سریع و تکرار پذیر جهت مطالعه پروتئین ها می باشد.
این روش به طور معمول برای بررسی مراحل خالص سازی، محاسبه مقدار نسبی و تعیین وزن مولکولی پروتئین ها بکار می رود. در تکنیک SDS-PAGE به دلیل استفاده از ماده سدیم دودسیل سولفات (SDS) و همچنین ویژگی های عالی ژل پلی اکریل آمید قدرت تفکیک پروتئین ها بسیار خوب می باشد. SDS یک دترجنت آنیونی می باشد که با اتصال به نواحی هیدروفوب پروتئین ها آنها را دناتوره می کند.
در واقع مولکول SDS با اتصال به پروتئین ها بار طبیعی آنها را می پوشاند و توزیع یکنواختی از بارهای منفی بر روی آن ایجاد می نماید. در نتیجه این اتفاق، جداسازی پروتئین ها تنها بر اساس وزن مولکولی شان صورت می گیرد.

جهت خطی نمودن مولکول های پروتئینی، آنها را در مقدار کافی SDS و ماده احیا کننده مرکاپتو اتانول جهت از بین بردن باندهای دی سولفیدی و نیز دقایقی حرارت قرار می دهند. مقدار SDS لازم جهت اتصال به پروتئین ها، ۱,٤ گرم SDS به ازای هر گرم پروتئین می باشد.

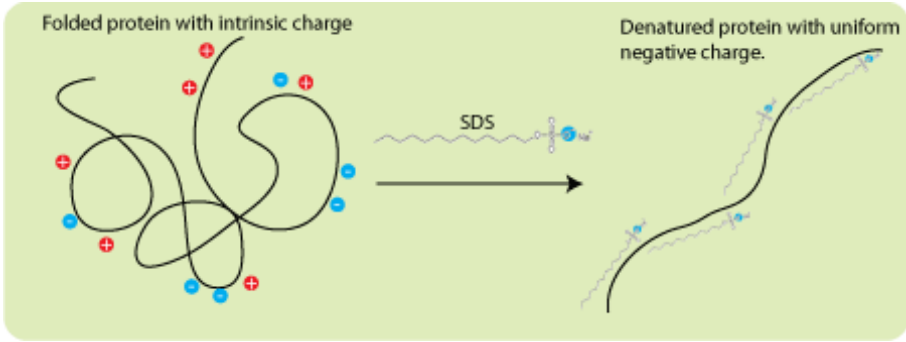
حالا در هنگام ران نمودن الکتروفورز جداسازی پروتئین ها تنها بر اساس وزن مولکولی شان خواهد بود. بدین معنا که هرچه اندازه مولکول بزرگ تر باشد، حرکت آن به دلیل اصطکاک با محیط اطراف کمتر خواهد بود.

معمولا مولکول SDS به قندها متصل نمی گردد، از این رو پروتئین هایی که بخش قندی آنها بزرگ است، نسبت به وزن مولکولی خود SDS کمتری می گیرند.

با کاهش اتصال مولکول های SDS در آنها، حرکت کندتری بر روی ژل خواهند داشت. این امر موجب تخمین وزن آنها بیش از وزن طبیعی شان می شود.

جهت حل این مشکل، می توان SDS-PAGE را در ژل های دارای شیب غلظتی یا در سیستم های بافری تریس- بورات- SDTA به جای بافر معمول تریس –گلیسین قرار داد.

بورات با اتصال به قندها، موجب افزایش میزان بار منفی گلیکوپروتئین خواهد شد و تا حدود زیادی کاهش اتصال به SDS جبران خواهد شد.



شکل ۱. مکانیسم عمل SDS

اثر ژل پلی اکریل آمید

ژل پلی اکریل آمید نقش بسیار موثری در تفکیک پروتئین ها در SDS-PAGE دارا می باشد.

قطر منافذ موجود در ژل پلی اکریل آمید که متاثر از غلظت دو جزء سازنده آن می باشد (T ٪ ، C ٪) دامنه وزنی قابل تفکیک در SDS-PAGE را مشخص می کند.

به عنوان مثال در ژل با غلظت ۵، ۱۰ و یا ۱۵٪ (با فرض C معادل ۲,۶ درصد) به ترتیب می توان پروتئین های در محدوده ۲۰۰-۳۰۰ ، ۱۵-۲۰۰ و ۱۲-۱۰۰ کیلو دالتون را جدا نمود.

باید در نظر گرفت که رابطه مسافت طی شده و لگاریتم وزن مولکولی در محدوده کمی به صورت خطی می باشد.

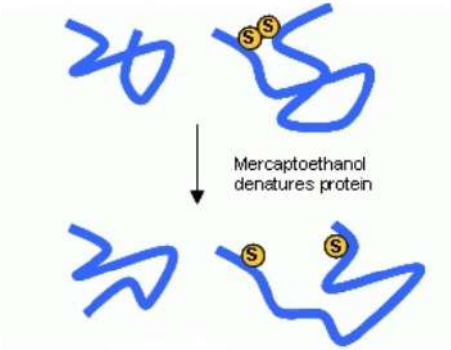
به منظور افزایش میزان این رابطه خطی، باید الکتروفورز را در شیبی از غلظت ژل پلی اکریل آمید انجام داد.

تکنیک SDS-PAGE در شرایط احیایی و غیراحیایی

پیوندهای دی سولفیدی درون رنجیره ای یا بین زنجیره ای نقش عمده ای در شکل گیری ساختمان سوم و چهارم پروتئین ها دارند. احیای این پیوندها با استفاده از مواد تیول دار (مانند ۲- مرکاپتو اتانول) منجر به از بین رفتن ساختمان های سوم و چهارم پروتئین ها خواهد شد.

پروتئین های دارای پیوند دی سولفیدی، دارای حرکت متفاوتی در شرایط احیایی و غیر احیایی الکتروفورز می باشند. احیا شدن این پیوندهای دی سولفیدی موجب جدا شدن زیرواحدهای پروتئینی در پروتئین های چند زیر واحدی و همچنین خطی شدن کلیه پروتئین ها می شود که این امر موجب اتصال یکنواخت SDS به پروتئین خواهد شد.

بنابراین می توان با مقایسه الگوی الکتروفورز احیایی و غیر احیایی یک پروتئین اطلاعات زیادی راجع به ساختار سوم آن بدست آورد. DTT و ۲- مرکاپتو اتانول رایج ترین احیا کننده های پیوند دی سولفیدی می باشند.



مکانیسم عمل مرکاپتو اتانول

سیستم بافری

ژل پلی اکریل آمید از دو قسمت ژل متراکم کننده (Stacking gel) و ژل جداکننده (Resolving gel) تشکیل شده است. ژل متراکم کننده در بالا قرار گرفته است و مواد تشکیل دهنده آن با ژل جدا کننده متفاوت می باشد. در ژل متراکم کننده به دلیل تراکم یکسان بار الکتریکی کلیه پروتئین ها حرکت آنها با سرعت یکسانی می باشد و به صورت یک لایه نازک در می آیند. اما با رسیدن مجموعه پروتئینی به ابتدای ژل جدا کننده، جداسازی آنها بر اساس وزن مولکولی شروع می شود. بار خالص پروتئین- SDS در دامنه PH بین ۱۰-۷ تغییر چندانی نمی کند و حرکت پروتئین ها در این دامنه نیز تفاوت محسوسی ندارد.

بافر تریس گلیسین پر استفاده ترین سیستم بافری ناپیوسته در SDS-PAGE می باشد. در سیستم بافری ناپیوسته ترکیب یونی، PH بافر در نمونه، ژل و مخازن با یکدیگر متفاوت می باشد. درسیستم بافری ناپیوسته حتی ژل نیز غالبا شامل دو قسمت (ژل بالا و ژل پایین) می باشد. در سیستم بافری ناپیوسته کارآیی الکتروفورز خیلی وابسته به حجم نمونه نمی باشد.
در سیستم بافری پیوسته غلظت و ترکیب یون ها و PH در سراسر مسیر الکتروفورز یکسان می باشد.

سیستم بافری لاملی متداول ترین سیستم بافری ناپیوسته در الکتروفورز می باشد. در این سیستم نمونه پروتئین و ژل بالا حاوی بافر تریس هیدروکلرید با PH=٦,٨ و ژل پایین حاوی بافر تریس هیدروکلرید با PH=٨,٨ و بافر مخازن (بافر الکترودها) شامل تریس گلیسین با PH=٨,٣ می باشد.

آماده سازی نمونه

برای آماده سازی نمونه در SDS-PAGE بافر نمونه را با نسبت خاصی به نمونه می افزایند، سپس برای دقایقی در آب جوش قرار می دهند. در این شرایط پروتئین ها به واسطه اثر SDS و ماده احیا کننده (در حالت الکتروفورز احیایی) کاملا دناتوره می شوند. میزان SDS در بافر نمونه باید بارها بیشتر از میزان پروتئین باشد (میزان ۳ به ۱) تا کاملا از اشباع شدن پروتئین با SDS اطمینان حاصل شود.

وجود گلیسرول یا ساکارز در بافر نمونه باعث سنگین شدن نمونه و قرار گرفتن آن در ته چاهک می شود. این موضوع خصوصا زمانی اهمیت بالایی پیدا می کند که مدت زمان نمونه گذاری زیاد طول بکشد.

در SDS-PAGE معمولا بعد از افزودن بافر نمونه به پروتئین و قبل از نمونه گذاری، مخلوط آنها را دقایقی (۲۰ -۱۵ دقیقه بسته به نوع پروتئین) در آب جوش قرار می دهند.

حرارت موجب جداشدن زیرواحدهای پروتئین های چند زیرواحدی و تسهیل اشباع شدن زنجیرهای پلی پپتیدی با استفاده از SDS می شود. بعلاوه، این کار موجب غیر فعال شدن بسیاری از پروتئازها شده و امکان تجزیه پروتئین ها توسط آنها را از بین خواهد برد. اما با این وجود بسیاری از پروتئازها در این شرایط سالم باقی می مانند و لازم است مهار کننده پروتئاز به نمونه ها افزوده شود.

بعضی پروتئین ها تحت تاثیر SDS تنها، رفتاری مشابه با حالت تحت تاثیر SDS و حرارت دارند ولی بعضی پروتئین ها در هر حالت رفتار متفاوتی از خود بروز می دهند.

مواد لازم جهت انجام SDS-PAGE

محلول استوک اکریل آمید (۳۰,۸ درصد): ۳۰ گرم آکریل آمید و ۰,۸ گرم بیس اکریل آمید را زیر هود وزن کنید و در آب مقطر تا حجم نهایی ۱۰۰ میلی لیتر حل نمایید. محلول را با کاغذ واتمن شماره ۱ صاف کنید و در ظرف تیره بریزید. این محلول تا ۳ ماه در یخچال قابل استفاده است.

نکته: از استنشاق پودر اکریل آمید و بیس اکریل آمید در هنگام توزین و تماس با محلول آنها خودداری نمایید.

- بافر ژل پایین:۱۸,۲ گرم تریس باز و ۰,٤ گرم SDS را در ۷۰ میلی لیتر آب مقطر حل نمایید. PH محلول را با اسید کلریدریک ۲ مولار به ۸,۸ برسانید. سپس آب مقطر تا حجم نهایی ۱۰۰ میلی لیتر اضافه کنید. غلظت تریس در این بافر ۱,۵ مولار است.
بافر ژل بالا: ٦,۱ گرم تریس باز و ۰,٤ گرم SDS را در ۵۰ میلی لیتر آب مقطر حل نمایید. با اسید کلریدریک ۲ مولار PH آن را به ٦,۸ برسانید. سپس آب مقطر تا حجم نهایی ۱۰۰ میلی لیتر اضافه کنید. غلظت تریس در این بافر ۰,۵ مولار است.

- بافر الکترود (بافر مخازن): ۳ گرم تریس باز، ۱٤,٤ گرم گلیسین و ۱ گرم SDS را در ۱ لیتر آب مقطر حل کنید، PH این بافر حدود ۸,۳ می باشد و نیاز به تنظیم ندارد.

- بافر نمونه (۵X): ۱۰ میلی لیتر بافر ژل بالا، ۵ میلی لیتر گلیسرول، ۱ گرم SDS، ۰,۲ میلی لیتر محلول برموفنل بلو (۰,۵ درصد در اتانول) و ۱ میلی لیتر ۲-مرکاپتواتانول را در یک ظرف مخلوط نمایید. سپس با آب مقطر به حجم نمایی ۲۰ میلی لیتر برسانید.

- پرسولفات آمونیوم ۱۰ درصد: ۰/۱ گرم پرسولفات آمونیوم در ۱ میلی لیتر آب مقطر حل کنید. این محلول باید تازه تهیه شود.

- TEMED ۱۰ درصد: ۰/۱ میلی لیتر TEMED در ۰/۹ میلی لیتر آب مقطر حل کنید. این محلول باید به صورت تازه تهیه شود.

- مارکرهای وزن مولکولی نیز آماده باشند.

انجام آزمایش

انجام آزمایش

ابتدا قبل از انجام هر گونه آزمایش باید پلیت ها، اسپیسرها و شانه ها در یک دترجنت آزمایشگاهی شسته شوند. دقت شود که از مواد خورنده جهت شستوشو استفاده نشود.

در صورتی که ژل برای مراحل بعد مانند رنگ آمیزی با نقره مورد نیاز باشد، توصیه می شود که شیشه ها را به صورت شبانه در کرومیک اسید انکوبه نمایید و سپس با آب مقطر شسته و در نهایت با اتانول، استون و اتانول به ترتیب شستوشو دهید.

هیچ گاه اجازه ندهید کرومیک اسید و یا حلال های آلی با ترکیبات پلاستیکی تماس داشته باشند. در نهایت شیشه ها را با دستان پوشیده شده با دستکش تمیز بردارید.

سر هم کردن پلیت ها

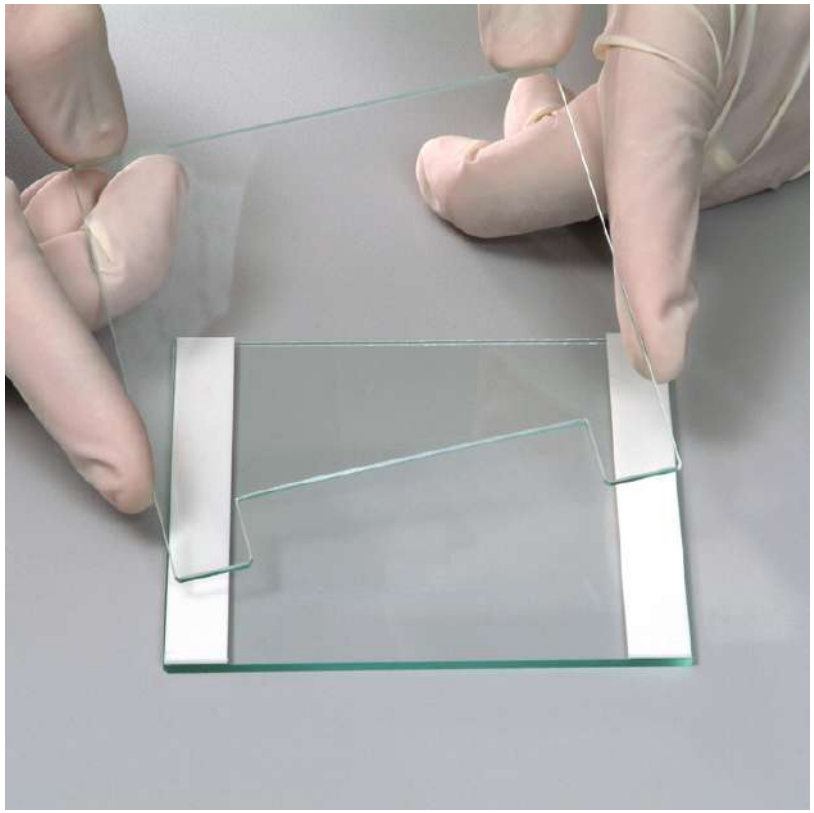
ابتدا قبل از انجام هر گونه آزمایش باید پلیت ها، اسپیسرها و شانه ها در یک دترجنت آزمایشگاهی شسته شوند. دقت شود که از مواد خورنده جهت شستوشو استفاده نشود.

در صورتی که ژل برای مراحل بعد مانند رنگ آمیزی با نقره مورد نیاز باشد، توصیه می شود که شیشه ها را به صورت شبانه در کرومیک اسید انکوبه نمایید و سپس با آب مقطر شسته و در نهایت با اتانول، استون و اتانول به ترتیب شستوشو دهید.

هیچ گاه اجازه ندهید کرومیک اسید و یا حلال های آلی با ترکیبات پلاستیکی تماس داشته باشند. در نهایت شیشه ها را با دستان پوشیده شده با دستکش تمیز بردارید.

پلیت های تمیز را با دست های تمیز و دستکش دار بردارید (هرگونه اثر را نیز با استون پاک نمایید).

با قرار دادن قسمت مقعر اسپیسر در پایین شیشه ها و زدن مقدار کمی وازلین به محل مشخص شده مطابق شکل زیر از نشتی تانک جلوگیری می شود.

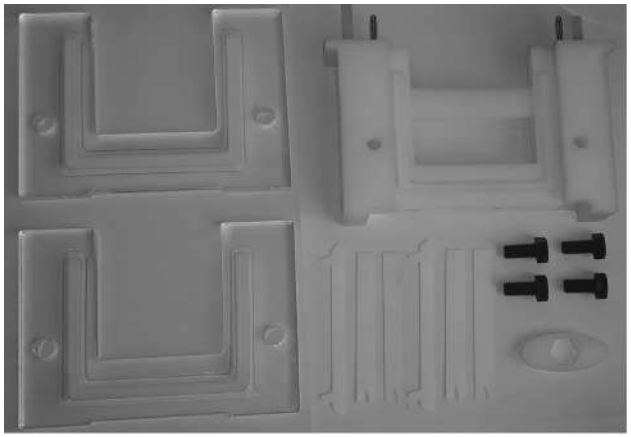


بدین جهت ابتدا محفظه داخلی را روی سطح تمیز قرار داده و شیشه U شکل را در محل مورد نظر گذاشته و دو اسپیسر در کناره های شیشه قرار داده می شود؛ سپس شیشه تخت روی آنها گذارده می شود.

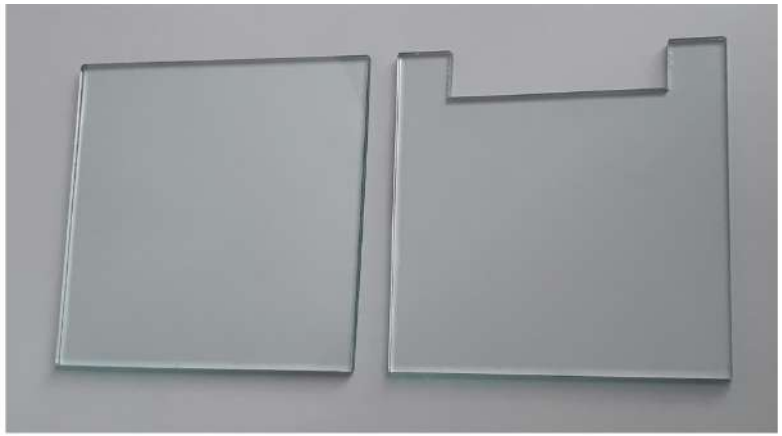
توجه شود که نباید پیچ ها را در آن حالت سفت کرد بلکه محفظه را به شکل عمود روی میز قرار داده و با فشار دادن شیشه ها و اسپیسر از بالا با انگشت اقدام به سفت کردن پیچ ها می شود.

در صورتی که این کار به درستی انجام شود، شیشه ها و اسپیسر با هم در یک راستا و هم سطح پایه های تانک قرار می گیرند. در این حالت کمی پیچ ها را محکم کرده و محفظه را به شکل افقی خوابانده و شروع به بستن کامل پیچ ها به کمک آچار آن می کنیم.

این عمل را برای طرف دیگر تانک نیز انجام می دهیم. سپس عمل ژل ریزی را انجام داده و شانه ها را برای ایجاد چاهک بین فضای دو شیشه قرار می دهیم.



۱



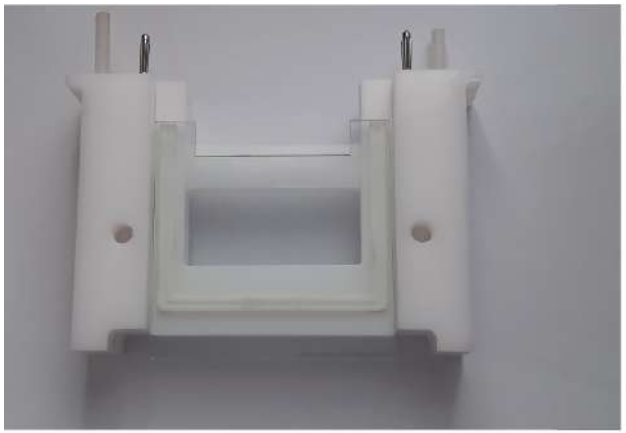
۲

۳

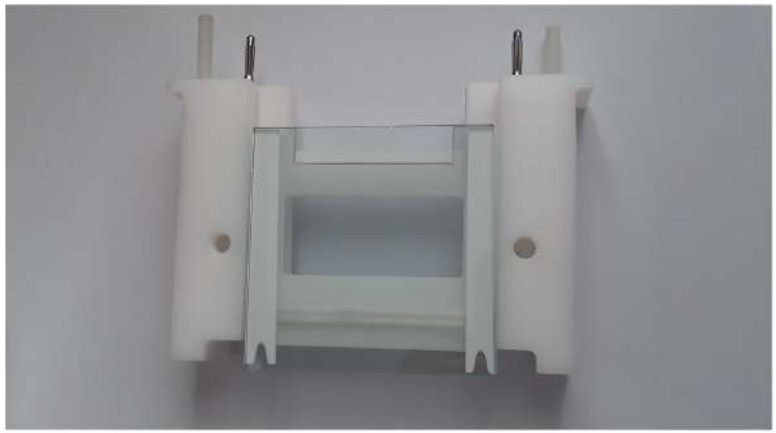
٤

٥

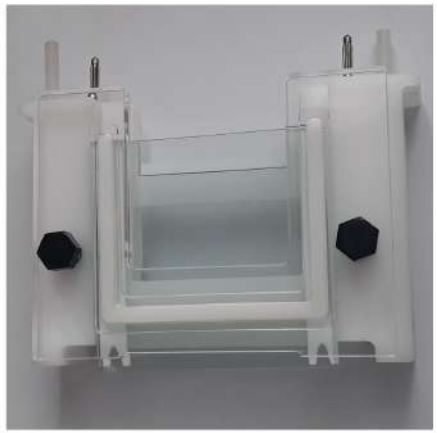
٦



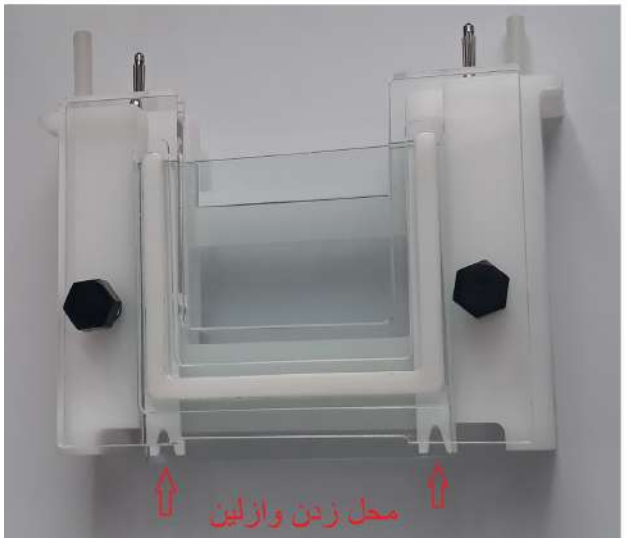
۷



۸



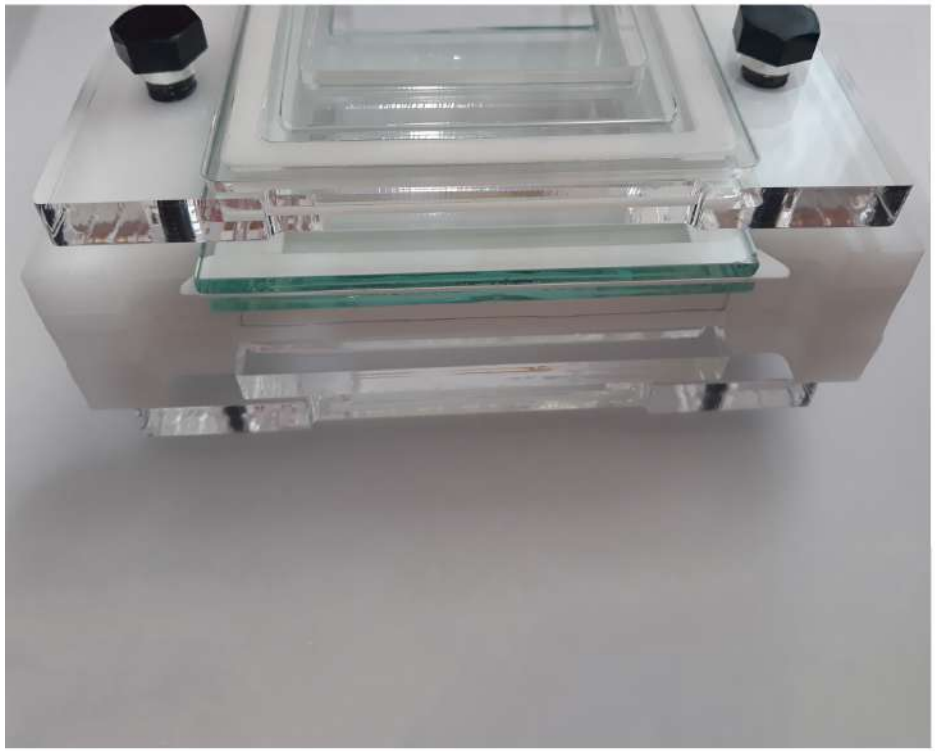
۹



۱۰

۱۱

۱۲



۱۳

۱۴

درب دستگاه را روی آن قرار دهید و کابل های پاور به طور صحیح وصل نمایید. ابتدا مطمین شوید که دستگاه پاور سوپلای خاموش می باشد؛ حالا سیستم جهت ران شدن آماده است.

ریختن ژل پایین (ژل جداکننده)

نحوه تهیه ۱۲ میلی لیتر از محلول ژل پایین در جدول زیر آمده است.

اجزای ژل پایین به غیر از TEMED را در یک ظرف مناسب مخلوط نمایید. محلول را حدود ۳۰ ثانیه با پمپ خلا از هوا تخلیه کنید. سپس TEMED را اضافه کنید.

پس از هم زدن سریع، محلول را در بین شیشه ها تا ارتفاع مناسب بریزید. باید دقت شود که حدود ۳ سانتیمتر فضا برای ژل بالا لازم میباشد.

حدود ۰,۵ میلی لیتر آب مقطر با سمپلر به آرامی از کنار شیشه روی سطح ژل بریزید، به نحوی که با ژل مخلوط نگردد. انعقاد ژل پایین

معمولا ۴۵-۱۵ دقیقه طول می کشد. ژل منعقد شده به وضوح از آب مقطر روی آن (به دلیل تفاوت در ظریب شکست نور) قابل تشخیص می باشد.

اجزای ژل پایین	درصد T					
	٪۷,۵	٪۱۰	٪۱۲,۵	٪۱۵	٪۱۷,۵	٪۲۰
بافر ژل پایین	۳ ml	۳ ml	۳ ml	۳ ml	۳ ml	۳ ml
محلول استوک اکریل آمید	٪۲,۹	٪۳,۹	٪ ۴,۹	٪ ۵,۹	٪ ۶,۸	٪ ۷,۸
آب مقطر	٪۶,۱	٪۵,۱	٪۴,۱	٪۳,۲	٪۲,۲	٪۱,۲
پر سولفات آمونیوم ٪۱۰	٪۰,۰۵	٪۰,۰۵	٪۰,۰۵	٪۰,۰۵	٪۰,۰۵	٪۰,۰۵
٪۱۰ TEMED	٪۰,۰۵	٪۰,۰۵	٪۰,۰۵	٪۰,۰۵	٪۰,۰۵	٪۰,۰۵

ریختن ژل بالا (ژل متراکم کننده)

بعد از انعقاد ژل پایین، مطابق جدول زیر ژل بالا را تهیه نمایید.

اجزای ژل پایین	درصد T		
	۳٪	٤٪	۵٪
بافر ژل بالا	۱,۲۵ ml	۱,۲۵ ml	۱,۲۵ ml
محلول استوک اکریل آمید	۰,۵ ml	۰,٦۵ ml	۰,۸۱ ml
آب مقطر	۳,۲ ml	۳,۰۵ ml	۲,۹ ml
پرسولفات آمونیوم	۰,۰۵ ml	۰,۰۵ ml	۰,۰۵ ml
٪۱۰ TEMED	۰,۰۱۵ ml	۰,۰۱۵ ml	۰,۰۱۵ ml

معمولا غلظت این ژل ۳، ٤ و یا ۵ ٪ است. اجزای ژل بالا غیر از TEMED را در ظرف مناسبی مخلوط کنید. آب روی ژل پایین را کاملا خالی کنید. برای حذف قطرات باقیمانده آب، حدود ۱ میلی لیتر محلول ژل بالا را در جدار داخلی شیشه بگردانید و مجددا تخلیه نمایید.

به بقیه محلول ژل بالا TEMED اضافه نمایید و پس از هم زدن سریعا تا ارتفاع مناسب روی ژل پایین بریزید؛ سپس شانه را با دقت در ژل بالا فرو کنید، به طوری که دندانه های آن حدود ۱,۵ سانتیمتر از سطح ژل فاصله داشته باشند. معمولا ژل بالا در کمتر از ۱۵ دقیقه می بندد (کناره دندانه های شانه از ژل منعقد شده قابل تشخیص است).

بهتر است قبل از دو آوردن شانه ، انتهای دندانه آن را روی شیشه با ماژیک مشخص کنید تا نمونه گذاری و تشخیص چاهک ها راحت باشد.

آماده سازی جهت ران

- پس از بسته شدن ژل بالا، شانه ها را از آن خارج نموده و دستگاه را به دورن تانک قرار دهید.
- مخازن تانک و دستگاه را تا ارتفاع مناسب به ترتیب با بافر الکترود و بافر نمونه پر کنید.
- هر گونه حباب در انتهای ژل را با تزریق بافر توسط سرنگ خارج نمایید.

افزودن نمونه ها

یک حجم بافر نمونه (X ۵) را به ٤ حجم نمونه پروتئین اضافه نمایید. اگر پروتئین به صورت پودر است، مقدار مورد نیاز آن را در بافر نمونه که ۵ بار با آب مقطر رقیق شده (بافر ۱X) ، حل کنید. نمونه و بافر نمونه را در یک ظرف کوچک درب دار ریخته و به مدت ۵ دقیقه در ظرف آب جوش قرار دهید.

در صورت کدورت نمونه و یا وجود ذرات نامحلول، آن را به مدت ۱۰ دقیقه در دور g ۱۰/۰۰۰ سانتریفیوژ نمایید. سپس با سرنگ هامیلتون یا سمپلر مناسب ۲۰-۱۰ میکرولیتر از هر نمونه را به دقت در چاهک بریزید. به دلیل وجود گلیسرول، نمونه در ته چاهک قرار می گیرد. مقدار پروتئین موجود در هر چاهک به میزان خلوص نمونه و روش رنگ آمیزی بستگی دارد.

حالا سیم های رابط را به الکتروفورز وصل نمایید و برای الکتروفورز در جریان الکتریکی ثابت، شدت جریان ۳۰-۲۰ میلی آمپر را تنظیم نمایید. در این حالت رنگ نشان گر (بروموفنل بلو) طی مدت ۱,۵ تا ۲ ساعت به انتهای ژل می رسد.

پس از اتمام عمل الکتروفورز، جریان را قطع نمایید و دستگاه را از تانک بیرون آورید. سپس پیچ های آن را شل نمایید و شیشه های حاوی ژل را با دقت بردارید. با استفاده از کاردک همراه دستگاه به آرامی شیشه ها را از هم جدا کنید و ژل را برداشته. در صورت لزوم ژل را رنگ آمیزی کنید.

رنگ آمیزی

رنگ آمیزی پروتئین ها در ژل پلی اکریل آمید با روش های متنوعی امکان پذیر است. کوماسی بلو (انواع R و G) و نقره از پر استفاده ترین مواد برای رنگ آمیزی پروتئین ها هستند. در اینجا رنگ آمیزی با کماسی بلو که بسیار متداول می باشد، توضیح داده می شود.

کوماسی بلو R-۲۵۰ معمول ترین رنگ برای رنگ آمیزی پروتئین ها است. سادگی رنگ آمیزی، هزینه کم، ثبات رنگ برای مدت طولانی و حساسیت نسبتا بالا از مزایای آن می باشند. حساسیت این روش ۰,۲-۰,۵ میکروگرم پروتئین در هر باند می باشد. در این روش مراحل تثبیت و رنگ آمیزی پروتئین ها به طور هم زمان صورت می گیرد.

حمام رنگ جهت رنگ آمیزی پروتئین ها در ژل اکریل آمید

مواد

- محلول رنگ آمیزی: ۰٫۲۵ گرم کوماسی بلو R-۲۵۰ را در ۱۲۵ میلی لیتر متانول حل کنید. سپس ۲۵ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال و ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه نمایید.

غلظت رنگ در این محلول حدود ۰٫۱ درصد وزنی/حجمی است. قبل از استفاده محلول رنگ را با کاغذ واتمن شماره ۱ صاف کنید. این محلول می تواند به عنوان تثبیت کننده پروتئین ها نیز عمل کند.

- محلول رنگ بر: ۲۰۰ میلی لیتر متانول، ۱۰۰ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال و ۷۰۰ میلی لیتر آب مقطر را به هم بیفزایید.

روش رنگ آمیزی

- ژل را در ظرف درب دار قرار دهید. حجم کافی از محلول رنگ (مثلا ۱۰۰ میلی لیتر برای یک ژل کوچک) اضافه کنید. در ظرف را بسته و آن را ۲-۱ ساعت روی شیکر قرار دهید. این مدت زمان برای رنگ آمیزی ژلی با غلظت ۱۰٪ و ضخامت ۱ میلی لیتر کافی است.

- محلول رنگ را تخلیه کنید. ژل را کاملا با آب معمولی شسته، سپس محلول رنگ بر اضافه کنید. در ظرف را بسته، آن را روی شیکر قرار دهید. پس از تیره شدن محلول رنگ بر، آن را با محلول تازه تعویض کنید. این عمل را چند بار تکرار کنید تا زمینه ژل شفاف گردد و باندهای پروتئینی به وضوح مشاهده شوند.

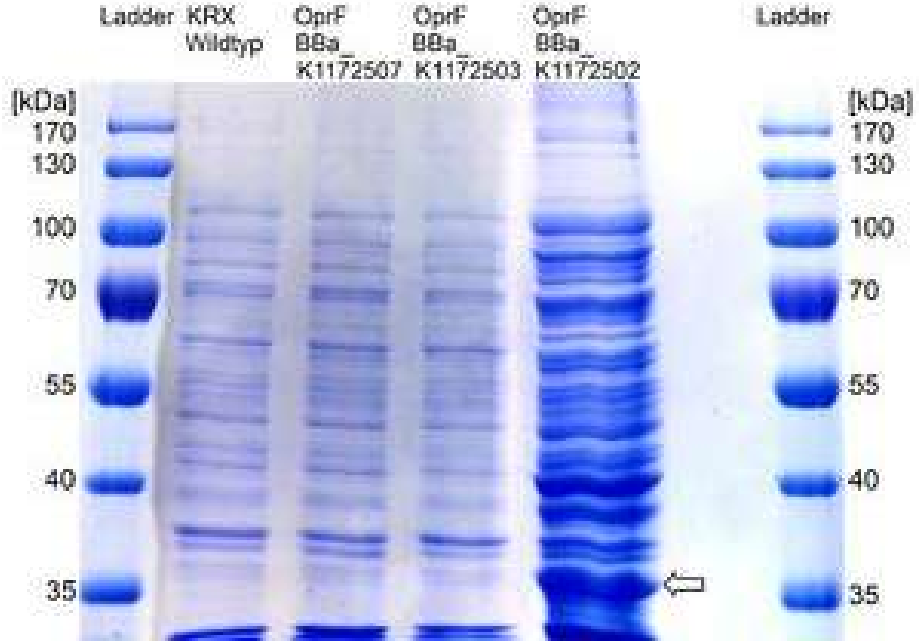
- ژل را در محلول ۷ درصد اسید استیک قرار دهید و در ظرف را ببندید. ژل در این حالت برای مدت طولانی قابل نگهداری است.

تعیین وزن

در تکنیک SDS-PAGE مولکول های پروتئینی با استفاده از سدیم دودسیل سولفات به صورت خطی در می آیند و حرکت آنها بر اساس وزن می باشد. همانگونه که پیش تر نیز ذکر شد، مسافت طی شده پروتئین ها با لگاریتم وزن مولکولی آنها رابطه خطی دارد.

پس هرچه پروتئین بزرگتر باشد مسافت طی شده کمتر خواهد بود.
به طور معمول در زمان بارگیری نمونه ها، در یکی از چاهک ها مارکر پروتئینی نیز اضافه می کنند. مارکرهای پروتئینی متشکل از چندین پپتید با وزن مولکولی مشخص می باشند.

با مقایسه نمودن میزان حرکت پروتئین مورد نظر بر روی ژل با مارکر های پروتئینی با استفاده از رسم نمودار حرکت نسبی می توان وزن مولکول هدف را تخمین زد.



مارکر مورد استفاده در تکنیک SDS-PAGE به همراه پروتئین¬های مورد بررسی

برای دریافت آخرین خدمات و اطلاعات پشتیبانی، به آدرس اینترنتی زیر مراجعه کنید