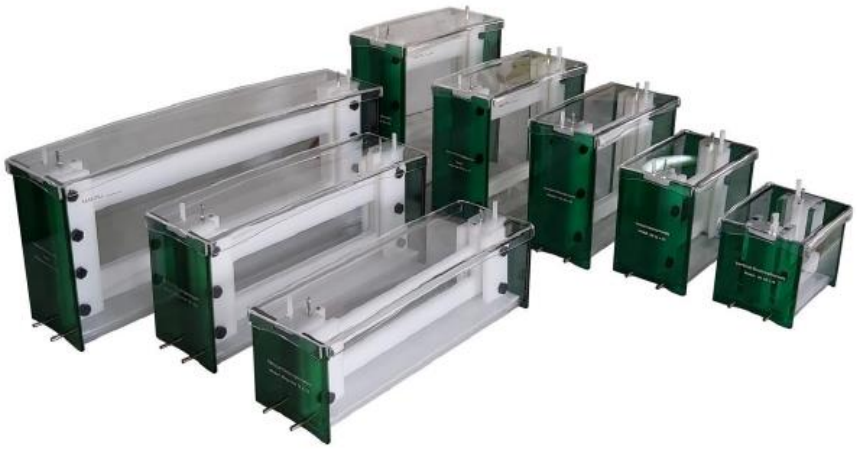
شرکت آرش طب پیشرو پارس

راهنمای استفاده الکتروفورز عمودی



موارد امنیتی

هنگامی که دستگاه به درستی مورد استفاده قرار میگیرد، 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.

هیچگاه 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.

اکریلآمید در حالت مونومر یک نوروتوکسین بسیار خطرناک میباشد. حتی ژلهای پلیمریزه شده نیز حاوی مقداری مونومر اکریلآمید میباشند. 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 میشود. 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.

اطلاعات دستگاه.

دستگاه تانک الکتروفورز عمودی 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 میباشد.

مادول ران کننده ژل بگونهای میباشد که به صورت مستقیم ژل ریزی صورت میگیرد و دستگاه جهت جداسازی مولکولها در تانک قرار میگیرد.

جهت راحتی عمل تهیه ژل اسپیسر دستگاهها 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، میتواند 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 استتفاده در آزمایشگاه قابلیت اتصال دارند؛ توصیه متیشتود جهت گرفتن نتایج بهتر از دستگاه منبع تغذیه مناسب 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 تانکهای الکتروفورز عمودی میباشد. اما در صورت نیاز به کامب سفارشی و یا کامب های بیشتر لازم است قبل از فرستادن دستگاه ، با شرکت هماهنگ کنید.

مشخصات فنی

مدل	Mini VD 10x10	Midi VD 15x15	Maxi VD 20x20	Maxi VD 22x23	Mega 10x33	Mega 16x33	Mega Gel
ابعاد پلیت	10x10 cm	15x15 cm	20x20 cm	22x23 cm	10x33 cm	16x33 cm	22x50 cm
ابعاد ژل	8x8.5 cm	13x13.5 cm	18x18cm	20x21 cm	8x30 cm	14x30 cm	20x48 cm
تعداد ژل	2	2	2	2	2	2	2
حجم ژل	2x6.5 ml	2x16.9 ml	2x32.4 ml	2x44.1 ml	2x24 ml	2x42 ml	2x96 ml
ابعاد تانک	17x12.5x14 cm	21x12.5x18 cm	26x12.5x23 cm	30x12.5x25 cm	40x12.5x14 cm	40x12.5x20 cm	57x15x28 cm
حجم بافرداخلی	80 ml	230 ml	500 ml	750 ml	800 ml	1200 ml	1800 ml
حجم بافر خارجی	1000 ml	2000 ml	3600 ml	4000 ml	4000 ml	6000 ml	10000 ml
حداکثر نمونه	2x16	2x24	2x32	2x35	2x70	2x70	2x100

جدول ۱. مشخصات فنی انواع مدل الکتروفورز عمودی

3

ـنگهداری و مراقبت

جهت تمیز کردن دستگاه از آب گرم و دترجنت متوسط استفاده گردد. آب با دمای بالاتر از ٦٠ درجه سانتیگراد میتواند به دستگاه صدمه بزند. قسمت مادول ران کننده ژل، باید با دقت با آب گرم شسته شود تا از تجمع نمکها جلوگیری شود اما دقت شود که به الکترودهای دستگاه صدمه وارد نشود.

هیدروکربنهای آلیفاتیک، هگزان و مایع ظرفشویی جهت تمیز نمودن دستگاه بسیار مناسب می باشند. بیش از ٣٠ دقیقه دستگاه را در دترجنتها قرار ندهید.

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

استون، فنول، کلروفرم، تتراکلرید کربن، متانول، اتانول، ایزوپروپیل الکل و آلکالینها.

از بین بردن RNase را میتوان طبق پروتکل زیر انجام داد:

ابتدا همانگونه که قبلا گفته شد، با استفاده از یک دترجنت معمولی دستگاه را تمیز نمایید.

سپس با استفاده از هیدروژن پراکسید ٣ (٪ ٢)O_2Hبه مدت ١٠ دقیقه دستگاه را بشویید.

سپس دستگاه را با آب DEPC Treated با رقت ٠,١ ٪ شستوشو دهید.

7

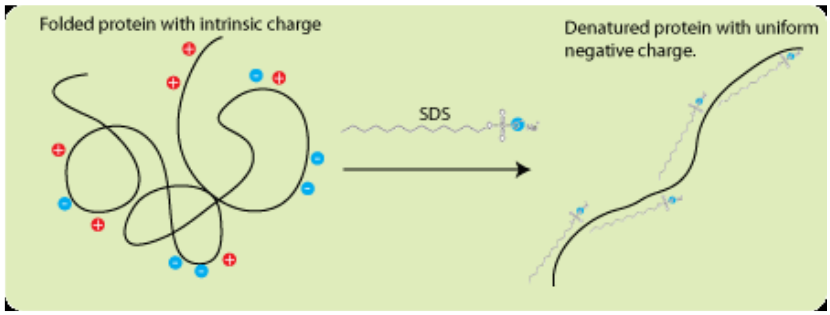
توجه شود که DEPC یک ماده سرطانزا میباشد. همیشه در هنگام استفاده از آن کلیه مراقبتهای ایمنی را رعایت کنید.

به صورت ماهانه، دستگاه را در محلهای به هم اتصال یافته جهت هر گونه نشتی چک نمایید. برای این کتار 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 .

محل الکترودهای پلاتینی معمولا جهت محافظت به طور نسبی پوشیده شدهاند. در هنگام تمیز نمودن تانک از براشهای تمیز کننده در ناحیه الکترود استفاده ننمایید. معمولا کر دادن با آب مقطر کافی میباشد.

ـتوضیح کامل تکنیک**SDS-PAGE**

تکنیک SDS-PAGE یک روش کم هزینه سریع و تکرار پذیر جهت مطالعه پروتئین ها میباشد. این روش به طور معمول برای بررسی مراحل خالصسازی، محاسبه مقدار نسبی و تعیین وزن مولکولی پروتئینها بکار میرود. در تکنیتک SDS-PAGEبه دلیل استفاده از ماده سدیم دودسیل سولفات SDS و همچنین ویژگیهای عالی ژل پلی اکریل آمید قدرت تفکیک پروتئینها بسیار خوب میباشد SDS یک دترجنت آنیونی میباشد که با اتصال به نواحی هیدروفوب پروتئینها آنها را دناتوره میکند. در واقع مولکول SDS با اتصال به پروتئینها بار طبیعی آنها را میپوشاند و توزیع یکنواختی از بارهای منفی بر روی آن ایجاد مینماید. در نتیجه این اتفاق، جداسازی پتروتئینها تنها بر اساس وزن مولکولیشان صورت میگیرد. جهت خطی نمودن مولکولهای پروتئینی، آنها را در مقدار کافی SDS و ماده احیا کننده مرکاپتو اتانول جهت از بین بردن باندهای دی سولفیدی و نیز دقایقی حرارت قترار میدهند. مقتدار SDS لازم جهت اتصال به پروتئین ها، ۱,٤ گرم SDS به ازای هر گرم پروتئین میباشد. حالا در هنگام ران نمودن الکتروفورز جداسازی پروتئینها تنها بر اسان وزن مولکولیشان خواهد بود. بدین معنا که هرچه اندازه مولکول بزرگتر باشد، حرکت آن به دلیل اصطکاک با محیط اطراف کمتر خواهد بود.



شکل ۱ . مکانیسم عملSDS

معمولا مولکول SDS به قندها متصل نمیگردد، از این رو پروتئینهایی که بخش قندی آنها بزرگ است، نسبت به وزن مولکولی خود SDS کمتری میگیرند. با کاهش اتصال مولکولهای SDS در آنها، حرکت کندتری بر روی ژل خواهند داشت. این امر موجب تخمین وزن آنها بیش از وزن طبیعیشان میشود. جهت حل این مشکل، میتوان SDS-PAGE را در ژلهای دارای شیب غلظتی یا در سیستمهای 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 SDSجبران خواهد شد.

5

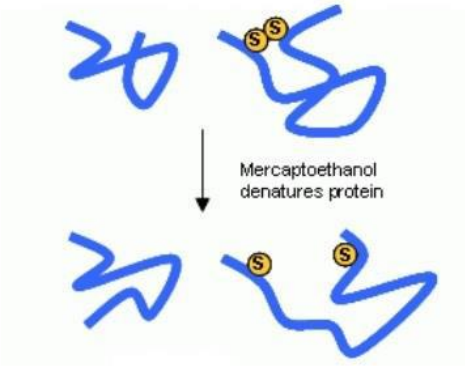
۔اثر ژل پلی اکریل آمید

ژل پلی اکریل آمید نقش بسیار موثری در تفکیک پروتئینها در SDS-PAGE دارا میباشد. قطر منافذ موجود در ژل پلی-اکریل آمید که متاثر از غلظت دو جزء سازنده آن میباشد (C % , T %) دامنه وزنی قابتل تفکیتک در SDS-PAGE را مشخص میکند. به عنوان مثال در ژل با غلظت ۵ ، ۱۰ و یا ۱۵ ٪ (با فرض C معادل ۲,٦ درصد) به ترتیتب میتوان پروتئینهای در محدوده ۲۰ ـ ۳۰۰ ، ۱۵ ـ ۲۰۰ و ۱۲ ـ 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 میباشد. به منظور افزایش میزان این رابطه خطی، باید الکتروفورز را در شیبی از غلظت ژل پلی اکریل آمید انجام داد.

6

تکنیک **SDS-PAGE** ـ در شرایط احیایی و غیراحیایی

پیوندهای دی سولفیدی درون زنجیرهای یا بین زنجی ه های نقش عمده ای در شکل گیری ساختمان سوم و چهارم پروتئینها دارند. احیای این پیوندها با استفاده از مواد تیولدار (مانند ۲ مرکاپتو اتانول) منجر به از بین رفتن ساختمان- ـ های سوم و چهارم پروتئینها خواهد شد. پروتئینهای دارای پیوند دیسولفیدی، دارای حرکت متفتاوتی در شرایط احیایی و غیر احیایی الکتروفورز میباشند. احیا شدن این پیوندهای دیسولفیدی موجب جدا شدن زیرواحدهای پروتئینی در پروتئینهای چند زیر واحدی و همچنین خطی شدن کلیه پروتئینها میشود که این اتر موجب اتصال یکنواخت SDS به پروتئین خواهد شد. بنابراین میتوان با مقایسه الگوی الکتروفورز احیایی و غیر احیایی تک پتروتئین اطلاعات زیادی راجع به ساختار سوم آن بدست آورد DTT .و ۲ مرکاپتو اتانول رایجترین احیا کنندهتای پیوند دی- ـ سولفیدی میباشند.



شکل ۲ . مکانیسم عمل مرکاپتو اتانول

7

ـسیستم 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 میباشد. در ژل متراکم کننده به دلیل تراکم یکسان بار الکتریکی کلیه پروتئینها حرکت آنها با سرعت یکسانی میباشد و به صورت یک لایه نازک در میآیند. اما با رسیدن مجموعه پروتئینی به ابتدای ژل جداکننده، جداسازی آنها بر اسان وزن مولکولی شروع میشود. بار خالص پروتئین SDS - در دامنه PH بین ۷ - ۱۰ تغییر چندانی نمیکند و حرکت پروتئینها در این دامنه نیز تفاوت محسوسی ندارد.

بافر تریس گلیسین پر استفاده ترین سیستم بافری ناپیوسته در SDS-PAGE - میباشد. در سیستم بافری ناپیوسته ترکیب یونی، PHبافر در نمونه، ژل و مخازن با یکدیگر متفاوت میباشد. درسیستم بافری ناپیوسته حتی ژل نیز غالبا شامل دو قسمت (ژل بالا و ژل پایین) میباشد. در سیستم بافری ناپیوسته کارآیی الکتروفورز خیلی وابسته به حجم نمونه نمیباشد.

در سیستم بافری پیوسته غلظت و ترکیب یونها و PH در سراسر مسیر الکتروفورز یکسان میباشد.

سیستم بافری لاملی متداولترین سیستم بافری ناپیوسته در الکتروفورز میباشد. در این سیستم نمونه پروتئین و ژل بالا حاوی بافر تریس هیدروکلرید با PH=6.8 - و ژل پایین حاوی بافر تریس هیدروکلرید با PH=8.8 و بافر مخازن (بافر الکترودها) شامل تریس گلیسین با PH=8.3 - میباشد.

8

ـآماده سازی نمونه

برای آماده سازی نمونه در SDS-PAGE بافر نمونه را با نسبت خاصی به نمونه میافزایند، سپس برای دقایقی در آب جوش قرار میدهند. در این شرایط پروتئینها به واسطه اثر SDS و ماده احیاکننده (در حالت الکتروفورز احیایی) کاملا دناتوره میشوند. میزان SDS در بافر نمونه باید بارها بیشتر از میزان پروتئین باشد (میزان ۳ به) 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 میشود. این موضوع خصوصا زمانی اهمیت بالایی پیدا میکند 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 (۱۵ - ۲۰

دقیقه بسته به نوع پروتئین) در آب جوش قرار میدهند. حرارت موجب جداشدن زیرواحدهای پروتئینهای چند زیرواحدی و تسهیل اشباع شدن زنجیرهای پلی پپتیدی با استفاده از SDS میشود. بعلاوه، این کار موجب غیر فعال شدن بسیاری از پروتئازها شده و امکان تجزیه پروتئینها توسط آنها را از بین خواهد برد. اما با این وجود بسیاری از پروتئازها در این شرایط سالم باقی میمانند و لازم است مهار کننده پروتئاز به نمونه ها افزوده شود.

بعضی پروتئینها تحت تاثیر SDS تنها، رفتاری مشابه با حالت تحت تاثیر SDS و حرارت دارند ولی بعضی پروتئینها در هر حالت رفتار متفاوتی از خود بروز میدهند.

9

-مواد لازم جهت انجامSDS-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 تمان با محلول آنها خودداری نمایید.

بافر ژل پایین: ۱۸,۲ گرم تریس باز و ۰,٤ گرم SDS را در ۷۰ میلیلیتر آب مقطر حل نمایید PH .محلول را با اسید کلریدریک ۲ مولار به ۸,۸ برسانید. سپس آب مقطر تا حجم نهایی ۱۰۰ میلیلیتر اضافه کنید. غلظت تریس در این بافر ۱,٥ مولار است.

بافر ژل بالا: ٦,۱ گرم تریس باز و ۰,٤ گرم SDS را در ٥۰ میلی لیترآب مقطر حل نمایید. با اسید کلریدریک ۲ مولار PH آن را به ٦,۸ برسانید. سپس آب مقطر تا حجم نهایی ۱۰۰ میلیلیتر اضافه کنید. غلظت تریس در این بافر ۰,٥ 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 میباشد و نیاز به تنظیم ندارد.

بافر نمونه (5X) : ۱۰ میلیلیتر بافر ژل بالا، ٥ میلی لیتر گلیسرول، ۱ گرم SDS ، ۰,۲ میلیلیتر محلول بروموفنل بلو (۰,٥ درصد در اتانول) و ۱ میلیلیتر ۲ مرکاپتواتانول را در یک ظرف مخلوط نمایید. سپس با آب- مقطر به حجم نمایی ۲۰ میلیلیتر برسانید.

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

10TEMED درصد: ۱ / ۰ میلیلیتر TEMED در ۹ / ۰ میلیلیتر آب مقطر حل کنید. این محلول باید به صورت تازه تهیه شود.

مارکرهای وزن مولکولی نیز آماده باشند.

10

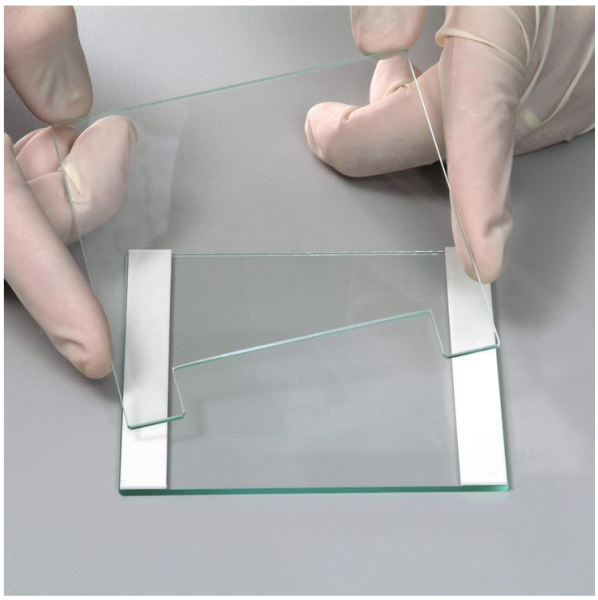
ـانجام آزمایش

ابتدا قبل از انجام هرگونه آزمایش باید پلیتها، 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 رنگآمیزی با نقره مورد نیاز باشد، توصیه میشود 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. هیچگاه اجازه ندهید کرومیک اسید و یا حلالهای آلی با ترکیبات پلاستیکی تماس داشته باشند. در نهایت شیشه ها را با دستان پوشیده شده با دستکش تمیز بردارید.

1

ـسر هم کردن پلیتها

ابتدا اسپیسرها و کامبها را در دترجنت معمولی آزمایشگاهی پاک نمایید. در صورت نیاز به تمیزکاری اختصاصی، شیشه ها میتوانند به صورت شبانه در کرومیک اسید بمانند؛ سپس با آب شستشو داده شوند و دوباره با اتانول، استون و دوباره اتانول شسته شوند. هرگز اجازه ندهید حلالهای ارگانیک و یا کرومیک اسید با اجزای پلاستیکی در تماس باشند.



پلیتهای تمیز را با دستهای تمیز و دستکشدار بردارید (هرگونه اثر را نیز با استون پاک نمایید.)
همانطور که در شکل زیر ملاحظه میکنید سرهای فضاساز (spacer) به دو شکل تخت و مقعر میباشد.

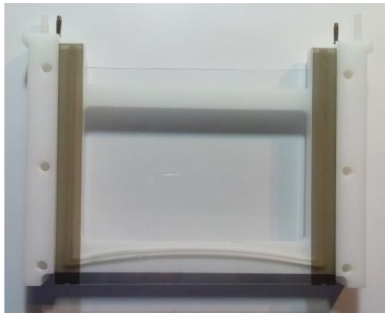
در صورتی که در دفعات ابتدایی به دلیل تراز نکردن درست شیشه ها و اسپیسر توسط کاربر، ژل از پایین اسپیسر و شیشه ها نشت کند میتوان با قراردادن قسمت مقعر اسپیسر در پایین شیشه ها و زدن مقدار کمی وازلین به محل مشخص شده مطابق شکل زیر از نشتی تانک جلوگیری کرد.
سر تخت اسپیسر بدون نیاز به وازلین، در مواردی که شخص به درستی شیشه ها و اسپیسر را با هم تراز کرده باشد مورد استفاده قرار میگیرد.

آماده سازی محفظه داخلی

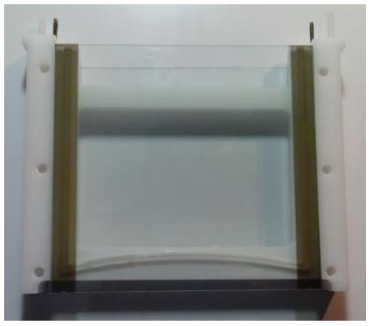
بدین جهت ابتدا محفظه داخلی را روی سطح تمیز قرار داده و شیشه U شکل را در محل مورد نظر گذاشته سپس دو اسپیسر در کناره های شیشه قرار داده میشود؛ سپس شیشه تخت روی آنها گذارده میشود و قطعات اورینگ با پیچهای پلاستیکی روی آن بسته میشود. توجه شود که نباید پیچها را در آن حالت سفت کرد بلکه محفظه را به شکل عمود روی میز قرار داده و با فشار دادن شیشه ها و اسپیسر از بالا با انگشت اقدام به سفت کردن پیچها میشود.
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 میگیرند انگشت نشانه خود را در طول لبه های پایینی شیشه ها حرکت دهید تا از تراز بودن آنها با لبه پایینی هر اسپیسر اطمینان حاصل نمایید. در این حالت کمی پیچها را محکم کرده و محفظه را به شکل افقی خوابانده و شروع به بستن کامل پیچها به کمک آچار آن میکنیم.
این عمل را برای طرف دیگر تانک نیز انجام میدهیم. در ادامه محفظه داخلی را به روی ژل کست قرار داده و پینهای ژل کست را بچرخانید (از سمت O به C همچنان که پینها را سفت میکنیم مقاومت زیادتر میشود. سپس عمل ژل ریزی را انجام داده و شانه ها را برای ایجاد چاهک بین فضای دو شیشه قرار میدهیم.

1

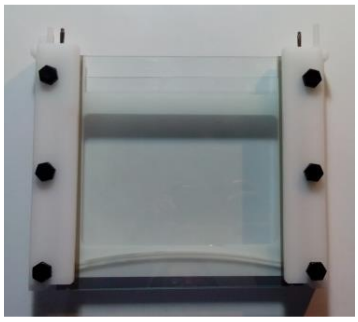
2



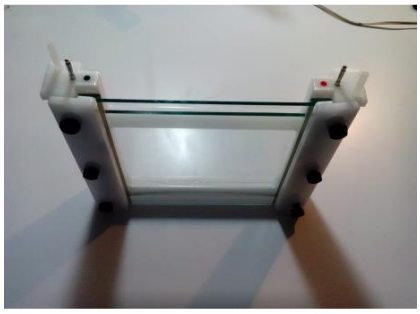
3



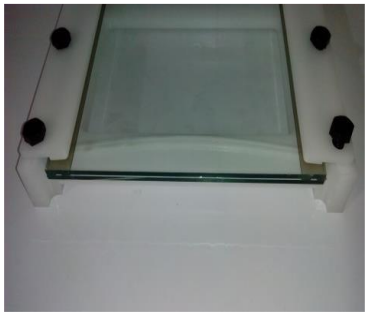
4



5



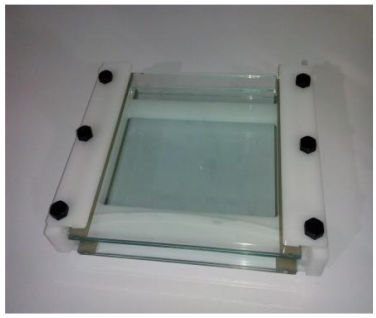
6



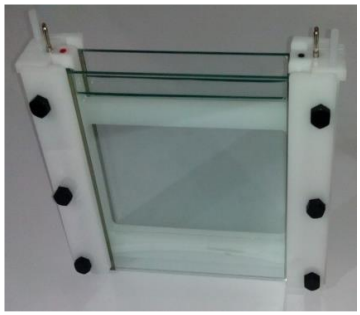
7

8

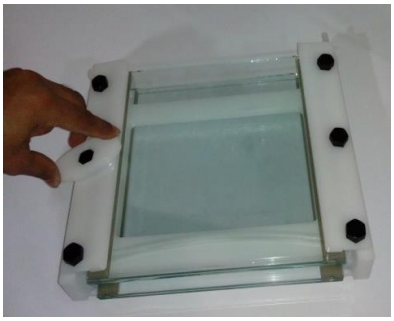
9



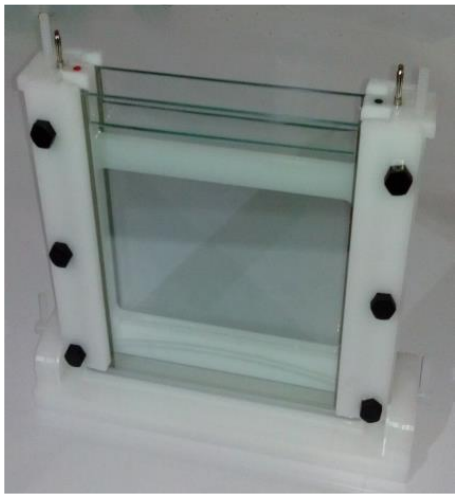
10



11



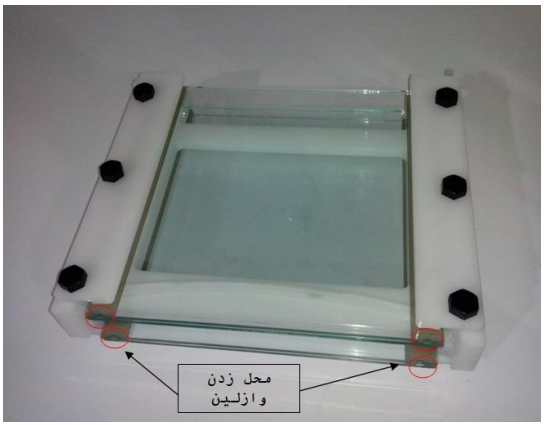
12



13

14

15



16

۔ریختن ژل پایین (ژل جدا کننده)

محلول ژل پایین را از اجزای آن با توجه به درصد آن تهیه نمایید. نحوه تهیه ۱۲ میلیلیتر از محلول ژل پایین در جدول زیر آمده است.

اجزای ژل پایین	درصد T					
	7.5 %	10 %	12.5%	15%	17.5%	20%
بافر ژل پایین	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml
محلول استوک اکریل آمید	2.9%	3.9%	4.9 %	5.9 %	6.8 %	7.8 %
آب مقطر	6.1%	5.1%	4.1%	3.2%	2.2%	1.2%
پر سولفات آمونیوم 10 ٪	0.05%	0.05%	0.05%	0.05%	0.05%	0.05%
TEMED 10 ٪	0.05%	0.05%	0.05%	0.05%	0.05%	0.05%

جدول 2. تهیه 12 میلی‌لیتر محلول ژل پایین با غلظت‌های مختلف

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 میلیلیتر آب مقطر با سمپلر به آرامی از کنار شیشه روی سطح ژل بریزید، به نحوی که با ژل مخلوط نگردد. انعقاد ژل پایین معمولا ۱۵ ـ ٤٥ 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.

ژل بالا (ژل متراکم کننده)

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

اجزای ژل بالا	درصد T		
	٪ 3	٪ 4	٪ 5
بافر ژل بالا	1.25 ml	1.25 ml	1.25 ml
محلول استوک اکریل آمید	0.5 ml	0.65 ml	0.81 ml
آب مقطر	3.2 ml	3.05 ml	2.9 ml
پرسولفات آمونیوم	0.05 ml	0.05 ml	0.05 ml
٪ 10 TEMED	0.015 ml	0.015 ml	0.015 ml

جدول 3. تهیه 5 میلی لیتر محلول ژل بالا با غلظت های 3 ، 4 و یا 5 درصد

معمولا غلظت این ژل ۳ ، ٤ و یا ٥ ٪ 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 میلیلیتر 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 دندانههای آن حدود ۱,٥ سانتیمتر از سطح ژل فاصله داشته باشند. معمولا ژل بالا در کمتر از ۱٥ دقیقه میبندد (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 چاهکها راحت باشد.

13

۔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.

14

۔افزودن نمونه ها

یک حجم بافر نمونه (5X) را به ٤ حجم نمونه پروتئین اضافه نمایید. اگر پروتئین به صورت پودر است، مقدار مورد نیاز آن را در بافر نمونه که ٥ بار با آب مقطر رقیق شده (بافر ۱ X) ، حل کنید. نمونه و بافر نمونه را در یک ظرف کوچک دربدار ریخته و به مدت ٥ دقیقه در ظرف آب جوش قرار دهید. در صورت کدورت نمونه و یا وجود ذرات نامحلول، آن را به مدت ۱۰ دقیقه در دور 10.000 gسانتریفیوژ نمایید. سپس با سرنگ هامیلتون یا سمپلر مناسب ۱۰ ـ ۲۰ میکرولیتر از هر نمونه را به دقت در چاهک بریزید. به دلیل وجود گلیسرول، نمونه در ته چاهک قرار میگیرد. مقدار پروتئین موجود در هر چاهک به میزان خلوص نمونه و روش رنگآمیزی بستگی دارد.

حالا سیمهای رابط را به الکتروفورز وصل نمایید و برای الکتروفورز در جریان الکتریکی ثابت، شدت جریان ۲۰ ـ ۳۰ میلی آمپر را تنظیم نمایید. در این حالت رنگ نشانگر (بروموفنل بلو) طی مدت ۱,٥ تا ۲ ساعت به انتهای ژل میرسد.

پس از اتمام عمل الکتروفورز، جریان را قطع نمایید و دستگاه را از تانک بیرون آورید. سپس پیچ های آن را شل نمایید و شیشههای 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.

15

۔رنگ آمیزی

رنگ آمیزی پروتئینها در ژل پلی اکری لآمید با روشهای متنوعی امکانپذیر است. کوماسی بلو (انواع R و) G و نقره از پر استفاده ترین مواد برای رنگ آمیزی پروتئینها هستند. در اینجا رنگ آمیزی با کماس ییلو که بسیار متداول میباشد، توضیح داده میشود.

16

۔رنگ آمیزی با کوماسی بلو**R-250**

کوماسی بلو R-250 معمولترین رنگ برای رنگ آمیزی پروتئینها است. سادگی رنگ آمیزی، هزینه کم، ثبات رنگ برای مدت طولانی و حساسیت نسبتا بالا از مزایای آن میباشند. حساسیت این روش ۰,۵ - ۰,۲ میکروگرم پروتئین در هر باند میباشد. در این روش مراحل تثبیت و رنگآمیزی پروتئینها به طور همزمان صورت میگیرد.

17

۔مواد

۰ محلول رنگ آمیزی: ۰,۲۵ گرم کوماسی بلو R-250 را در ۱۲۵ میلی لیتر متانول حل کنید. سپس ۲۵ میلیلیتر اسید استیک گلاسیال و ۱۰۰ میلیلیتر 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 میتواند به عنوان تثبیتکننده پروتئینها نیز عمل کند.

محلول رنگبر: ۲۰۰ میلیلیتر متانول، ۱۰۰ میلیلیتر اسیداستیک گلاسیال و ۷۰۰ میلیلیتر آب مقطر را به هم بیفزایید.

18

۔روش رنگ آمیزی

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

10 ٪ 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.

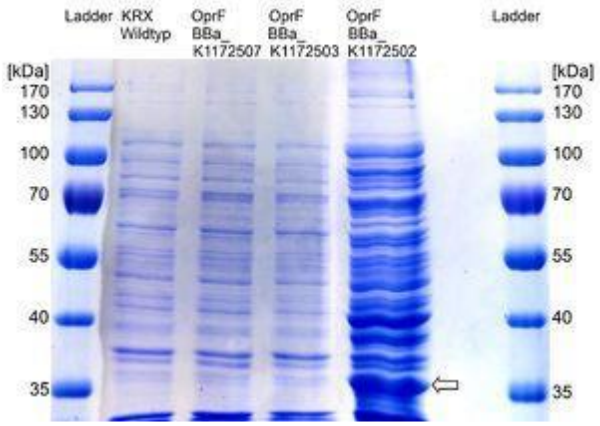
۰ ژل را در محلول ۷ درصد اسیداستیک قرار دهید و در ظرف را ببندید. ژل در این حالت برای مدت طولانی قابل نگهداری است.

19

ـتعیین وزن

در تکنیک SDS-PAGE مولکولهای پروتئینی با استفاده از سدیم دودسیل سولفات به صورت خطی در می آیند و حرکت آنها بر اسان وزن میباشد. همانگونه که پیشتر نیز ذکر شد، مسافت طی شده پروتئینها 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 چاهکها مارکر پروتئینی نیز اضافه میکنند. مارکرهای پروتئینی متشکل از چندین پپتید با وزن مولکولی مشخص میباشند. با مقایسه نمودن میزان حرکت پروتئین مورد نظر بر روی ژل با مارکرهای پروتئینی با استفاده از رسم نمودار حرکت نسبی میتوان وزن مولکول هدف را تخمین زد.



شکل ۸ . مارکر مورد استفاده در تکنیک SDS-PAGE به همراه پروتئینهای مورد بررسی