الفصل الكهربي للبروتين
SDS-PAGEباستخدام

SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis

Amal Alghamdi
2011

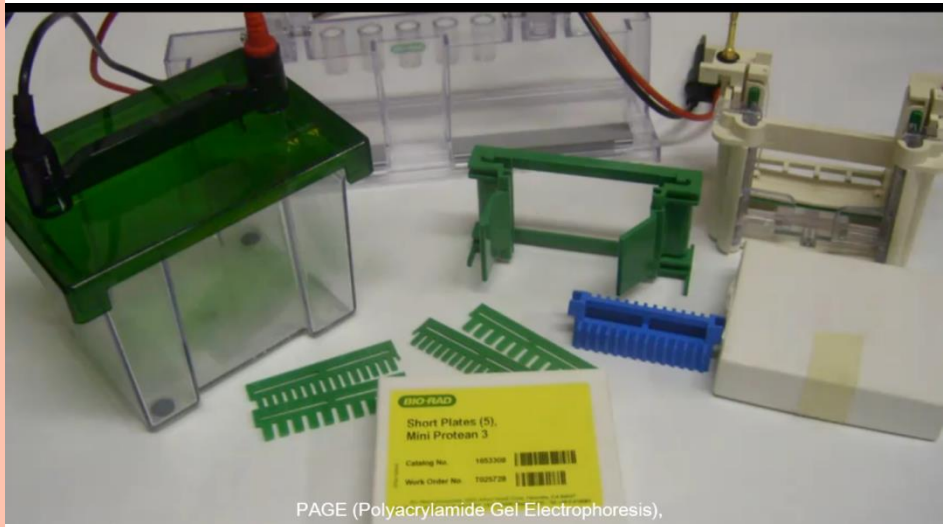
SDS-PAGE(PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)

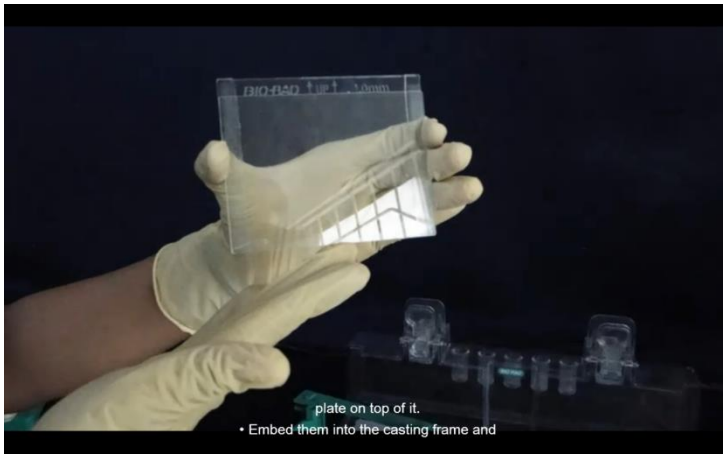
- من أهم تقنيات الأحياء الجزيئية لفصل خليط من البروتينات تبعاً لحجمها.
- من طرق التحليل التي يمكن استخدامه أيضاً لفصل جزيئات الأحماض النووية DNA و RNA.
- جزيئات البروتين مختلفة في الشكل والحجم، ويتم تغييرطبيعتها في البداية.
- ويمكن تغيير الشكل الثانوي والثلاثي والرباعي باستخدام مادة SDS.
- تغطى البروتينات المشحونه بالشحنة السالبة بواسطة الـ SDS.
- وعند تحميل خليط البروتينات في مادة الجل وتتعرض للحقل الكهربي تهاجر البروتينات باتجاه القطب الموجب (الانود anode).
- ثم تفصل يعدها بواسطة الغربلة الجزيئية molecular sieving تبعاً للحجم (الوزن الجزيئي).
- بعد تظهير الجزيئات باستخدام تقنية خاصة لصبغ البروتين وتظهر على شكل أشرطة bands ويمكن معرفة حجم البروتين بمقارنة المسافة التي يقطعها الجزيء على جل الفصل مع أشرطة من الجزيئات البروتينية معلومة الوزن الجزيئي

Amal Alghamdi
2011

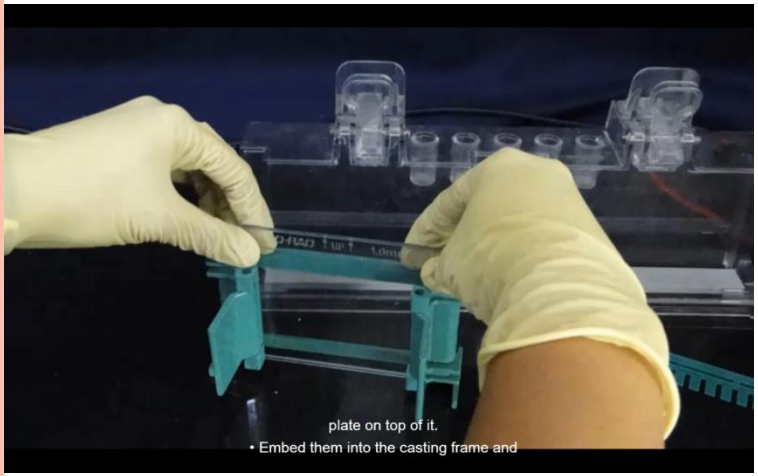
أولاً: تجميع الأجزاء الخاصة بالفصل الكهربي (BIO-RAD)

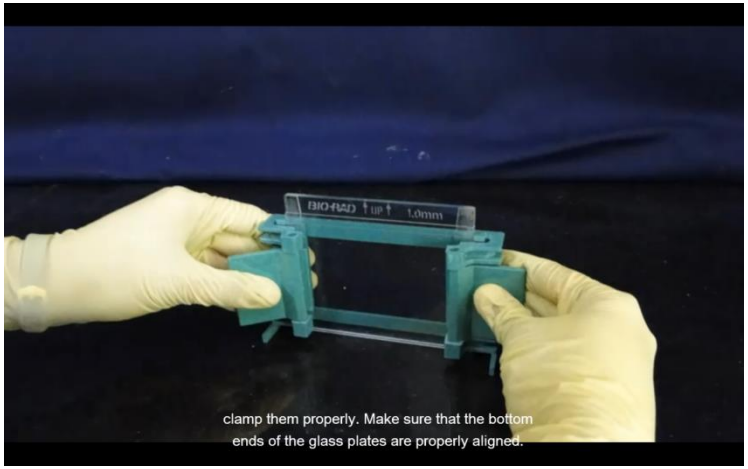
- الأطباق الزجاجية والبلاستيكية
- ترتب على سطح معقم ويوضع الطيق الزجاجي الاطول(يحتوي فاصل) اولا ويوضع فوقه الطبق الزجاجي الاقصر أعلاه.



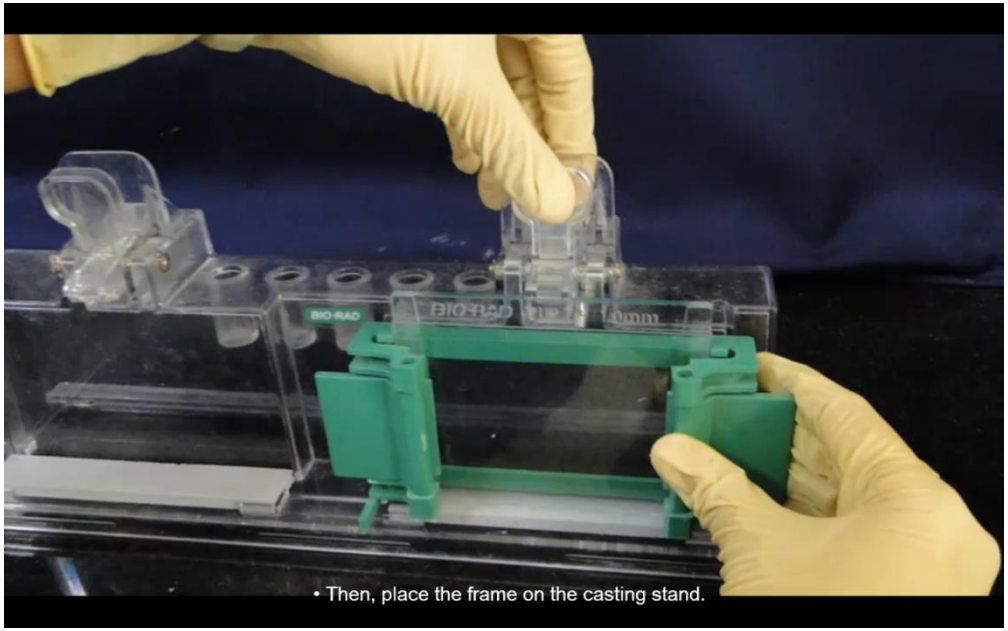


- يتم التاكد من ثبيتهما بمحاذاة بعضهما البعض عند القاعدة بحيث لا تسمح بمرور الماء من قاعدة الطبقين المتراكبين.
- يتم تثبيت الطبقين داخل إطار الصب casting frame ، وتثبت باحكام باستخدام الملاقط الجانبية.





يثبت الإطار على الحامل عن طريق الملقط العلوي ثم يصب الجل داخل الفراغ بين الطبقين الزجاجيين.



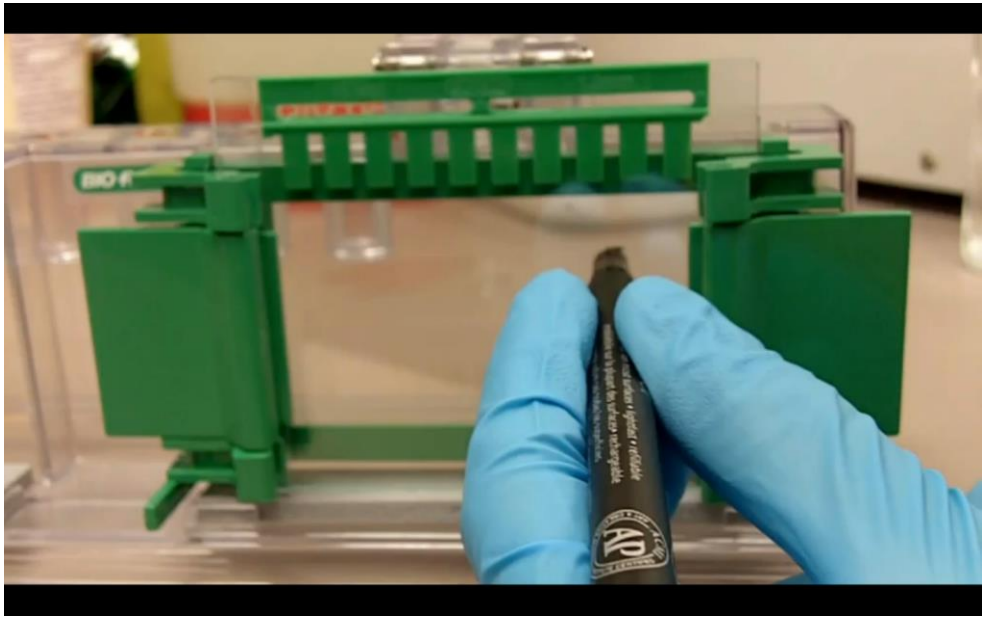
- ثانياً: تحضير الجل Gel preparation:

المادة	Resolving Gel 10%	Stacking Gel 4.5%
الماء DDW	4مل	5.65 مل
خليط الأكريلاميد 30%	3.3مل	1.65 مل
Tris pH 8.81.5M	2.5مل	---
1M Tris pH 8.8	---	2.5 مل
SDS10%	0.1مل	0.1 مل
10% Ammonium persulphate (APS)	0.1مل	0.1 مل
TEMED	0.004مل	0.004 مل

يتم تحضير الجل بنوعيه بدون إضافة المادتين APS و TEMED الا قبل صب الجل بين الطبقين مباشرة ويخلط جيدا بالتقليب.

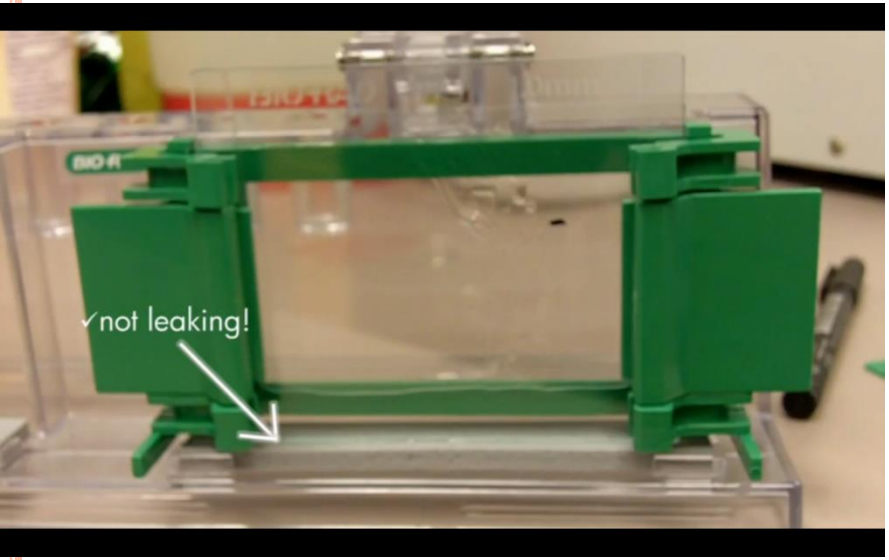
Amal Alghamdi
2011

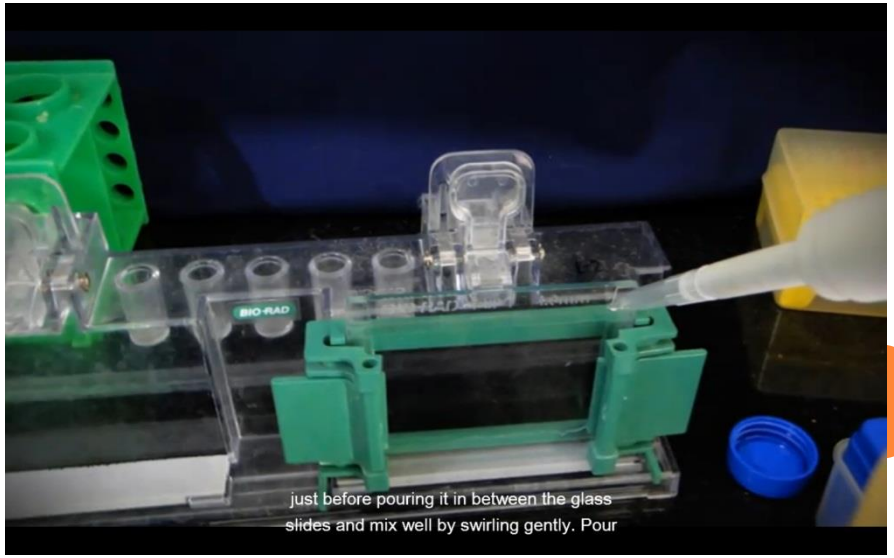
- يتم صب محلول الحل resolving حتى الخط الظاهر على الطبق الزجاجي الذي يمكن تحديده بوضع المشط قبل الصب وتحديد خط أسفله بمسافة 1 سم.



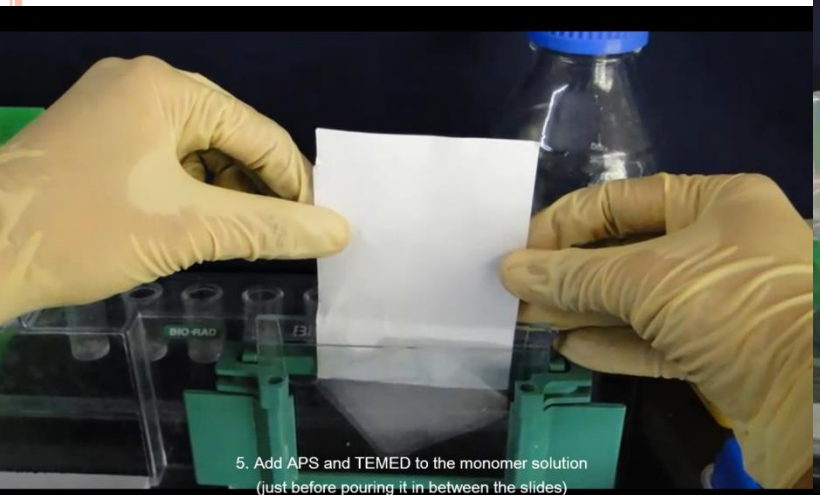
- يمكن التخلص من الفقاعات الهوائية بعد الانتهاء من الصب باستخدام طبقة الأيزوبروبانول أو الماء المقطر على سطح الجل حتى مستوى الجل.
- يترك الجل ليتصلب 20 -30 دقيقة.

Amal Alghamdi
2011

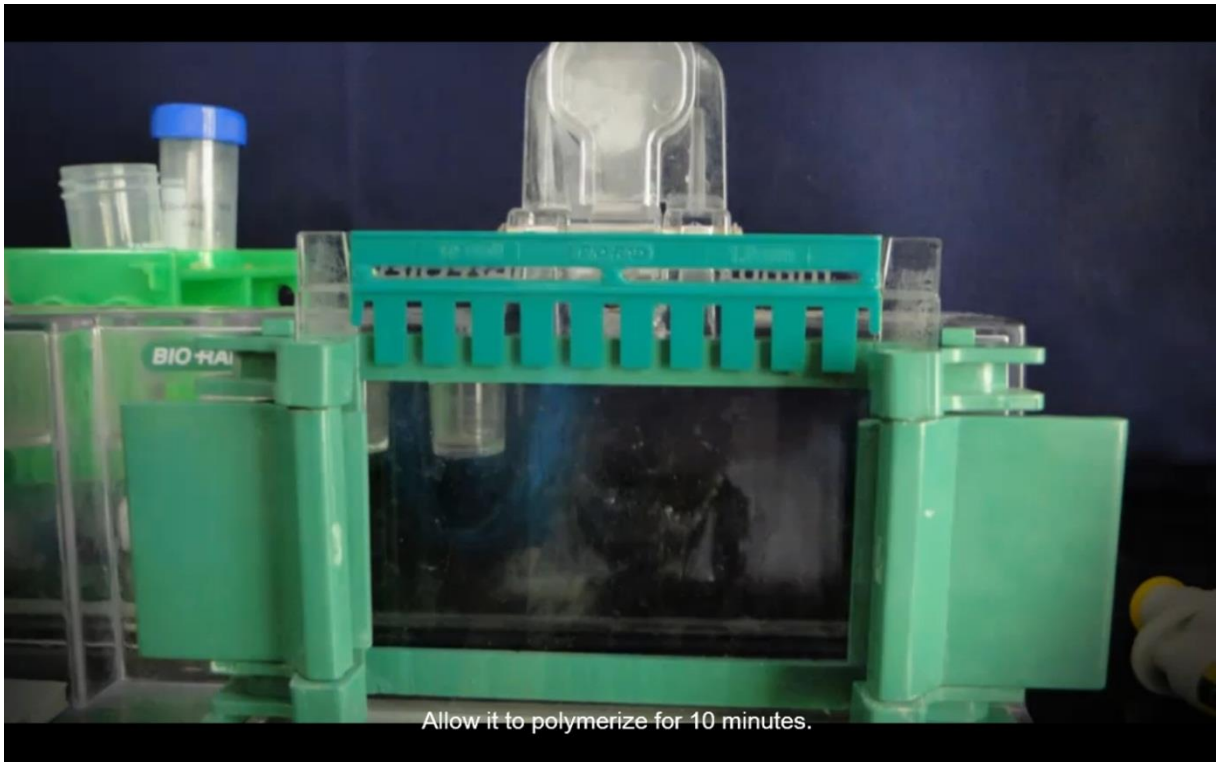




- يجهز جل التجميع stacking gel باضافة جميع المحاليل ماعدا مادتي APS و TEMED. ويتم إضافتها قبل الصب مباشرة.
- يجفف الايزوبروبانول باستخدام ورق الترشيح .
- يضاف الجل الثاني stacking gell



- ثم يضاف المشط داخل الفراغ بين الشريحتين .
- يترك ليتصلب لمدة 10 دقائق.



تجهيز العينة:

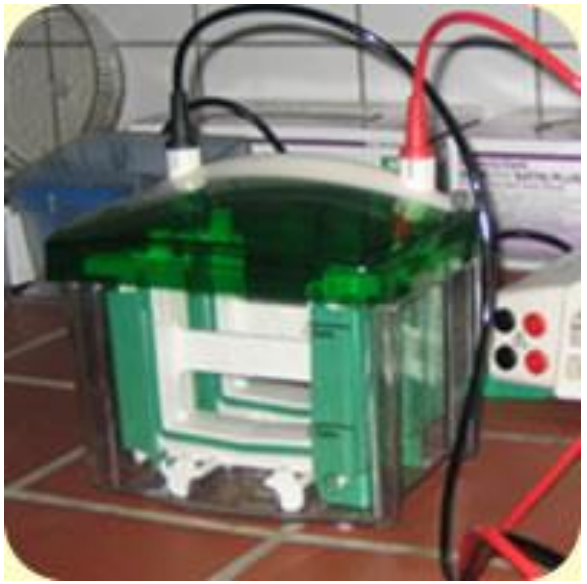
- يخلط البروتين مع المحلول المنظم للعينة بنسبة 4 :1
- يسخن الخليط في حمام مائي عند درجة حرارة 37°م لمدة 30 دقيقة.

Amal Alghamdi
2011

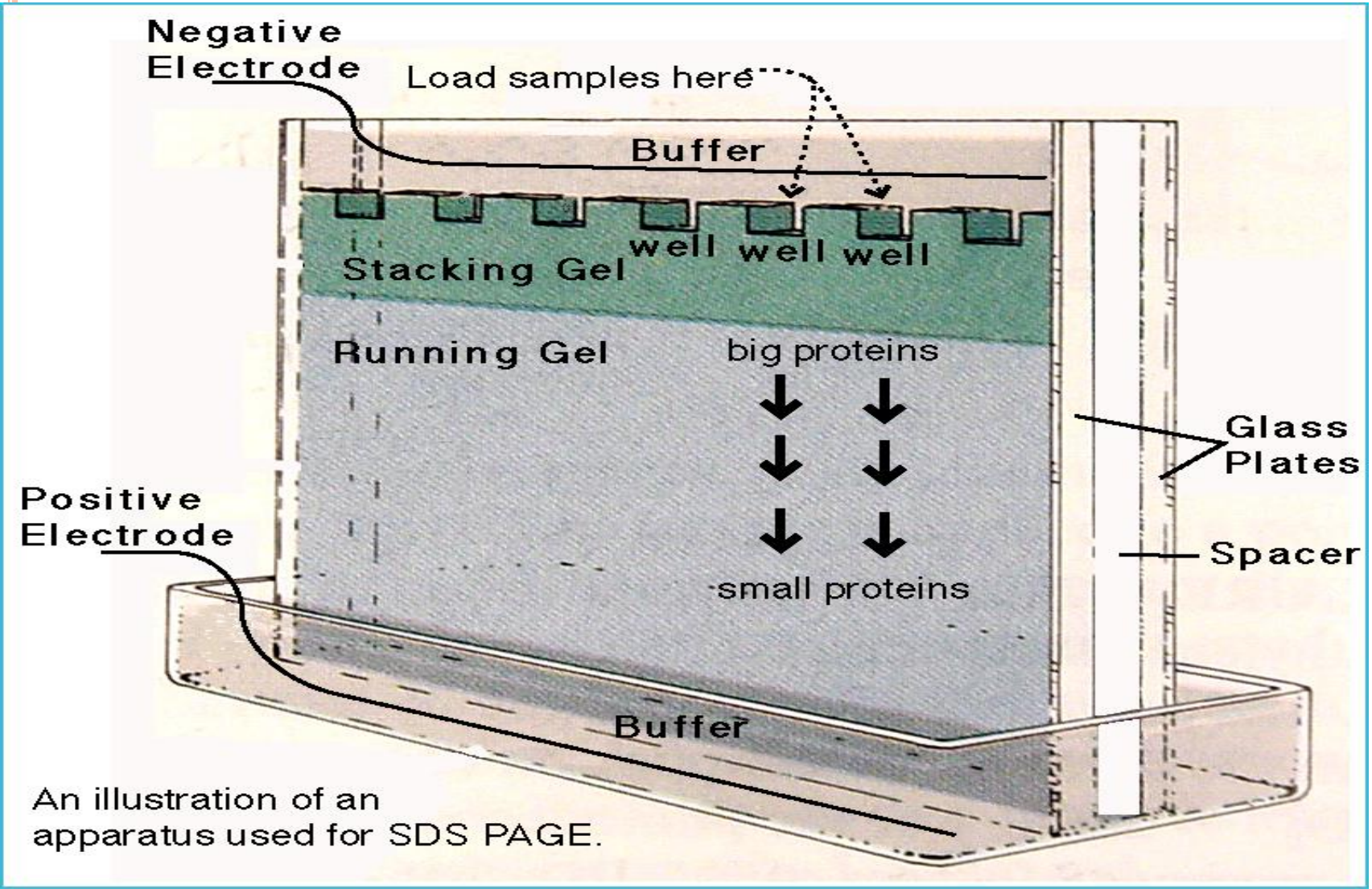
RUNNING THE GEL تحميل العينات في الجل

- يتم إخراج المشط من داخل الجل بحرص حتى لا تكسر العيون wells .
- ثم يفصل الجل من إطار الصب وتثبت الطبقين او الشريحتين داخل جهاز الجل، بحيث يكون الطبق الأقصر للداخل
- إذا كان هناك جل واحد فقط، يتم وضع الطبق المخصص المتوفر كموازنه للجل المحضر.
- يتم تامين الطبقين ويوضعوا داخل الحامل ويقفل بطريقة معينة بالمشابك.
- يوضع الحامل داخل خزان الفصل Bio-Rad tank
- يملأ الفراغ داخل الحامل بمحلول السريان 10X SDS running buffer (pH 8.3)
- يصبح الجل جاهز للاستخدام وتحميل العينات .
- يتم غسل نهاية الماصة بالمحاول المنظم
- يتم تسحب العينة باستخدام الماصة الدقيقة ثم تدخل حتى بضعة ملمترات للعين well.

- يتم توصيل مصدر الطاقة باغلاق الخزان وتوصيل الأقطاب الموجبة والسالبة في أماكنها الصحيحة.
- الأسود للأسود والاحمر للأحمر.
- يتم ضبط التيار على 180 فولت ويترك السريان لمدة 1 ساعه .
- يتم الانتباه لعدم خروج الصبغة خارج الجل.



رسم توضيحي لعملية سريان العينة(البروتين) داخل الجل



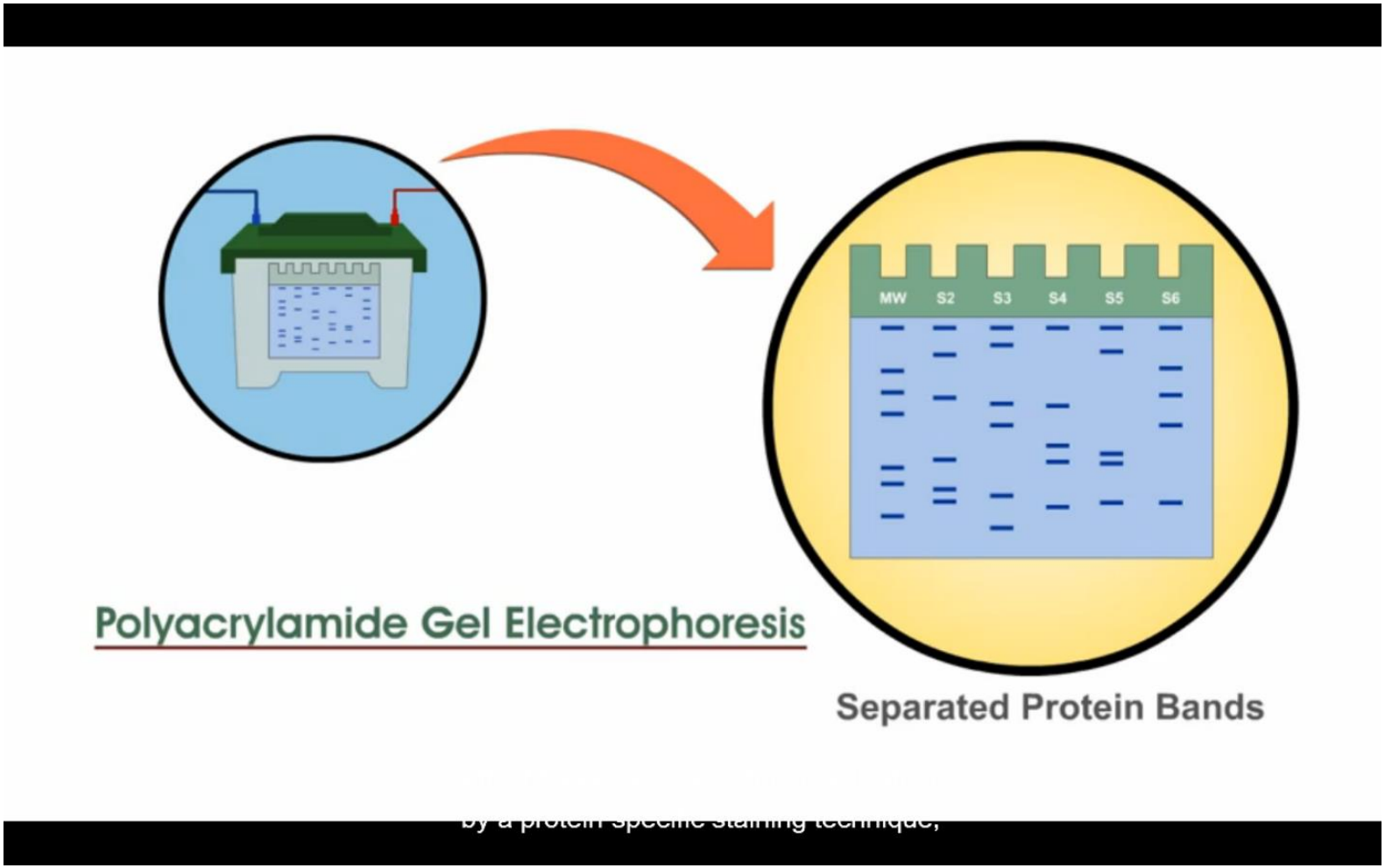
An illustration of an apparatus used for SDS PAGE.

صبغ الجل

- بعد انتهاء وقت السريان، يتم إخراج الحامل من خزان الفصل ثم إخراج الجل من بين أطباق الجل.
- يتم فصل الجل عن الطبقين او الشريحتين الزجاجيتين
- يوضع الجل في محلول الصبغ لمدة 30 دقيقة.
- يتم وضع الجل على جهاز الهز ، في محلول نزع الصبغة لمدة 8 ساعات أو حتى ظهور الأشرطة bands.
- يتم تقدير الوزن الجزيئي للبروتينات المفصولة تقريبيا بالمقارنة مع الأوزان الجزيئية المعلومة protein markers.

- يجب ارتداء القفازات أثناء التعامل مع الجل SDS-PAGE.
- للتأكد من صحة المحاذاة والصب للأطباق الجزازية والفواصل والمشط، يجب ان تكون أطواق الصب نظيفة وجافة تماما.
- يجب اتخاذ الحيطة والحذر عند استخدام الاكريلاميد Acrylamide لانه سم عصبي neurotoxin.

رسم توضيحي لأشرطة البروتين المفصول على الجل SDS-PAGE بعد عملية الصبغ

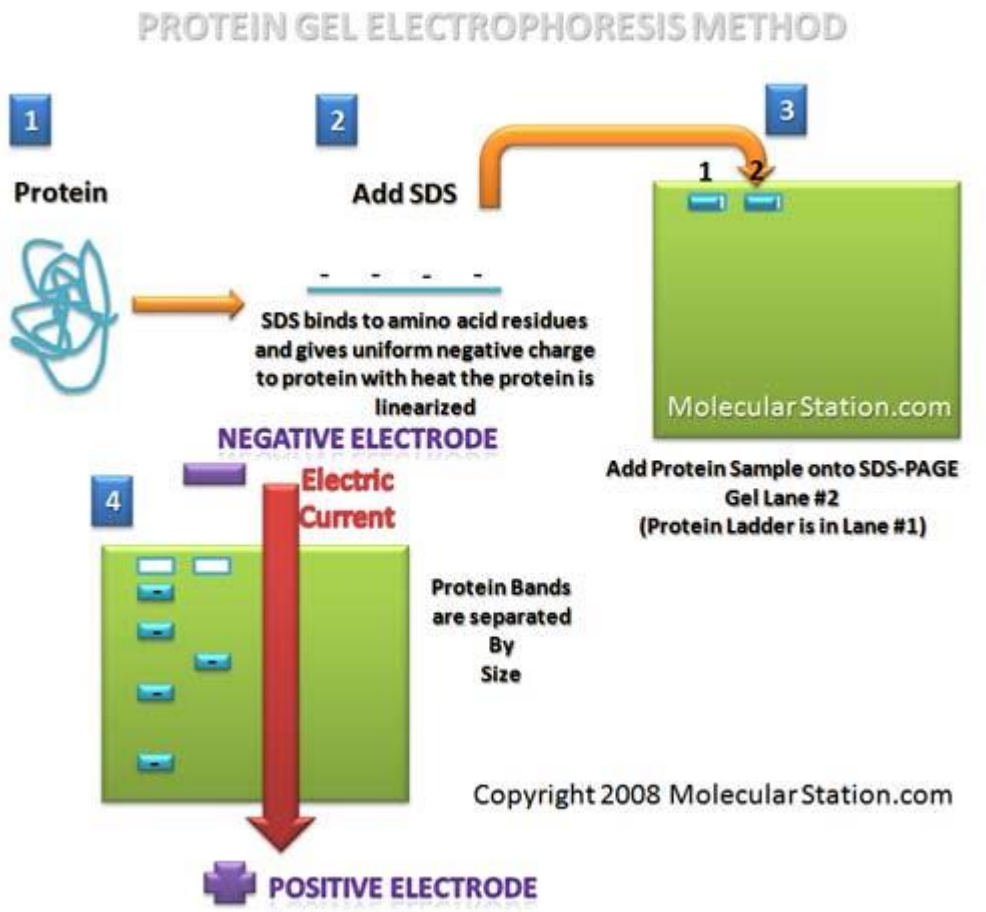


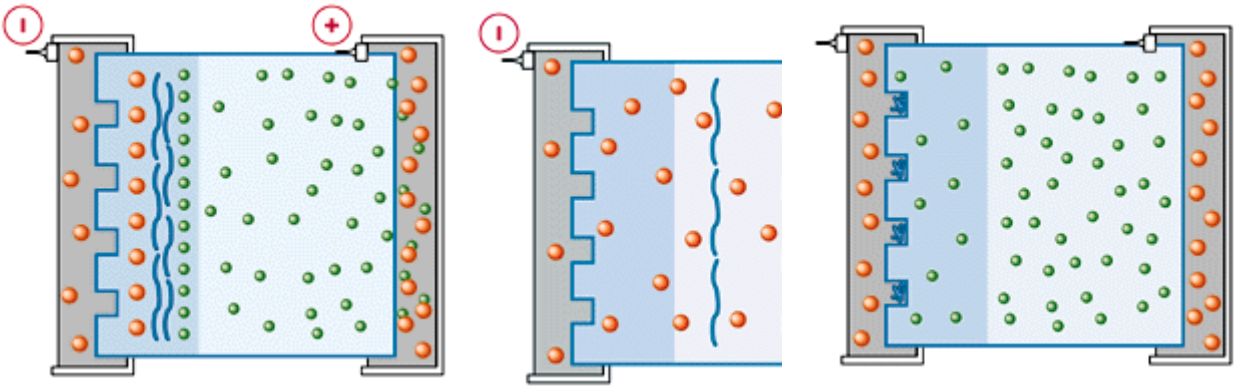
Amal Alghamdi
2011

دور مادة SDS (SODIUM DODECYL SULPHATE)

- هي مادة عالية التأين ذت شحنة سالبة
- ترتبط مع بقايا الأحماض الأمينية في جزيئات البروتين وتغطيه بشحنة سالبة.
- تقوم بتشويه (denature) للبروتين في العينة وتجعله في صورة سلاسل تسمى عديد الببتيد poly peptide (مايسمى بالتركيب الأولي primary structure).
- يلغي الاختلاف في شكل البروتين ويكون طول سلسلة الببتيد الذي يعكس كتلة الجزيء هو وجه المقارنه الوحيد لسريان البروتينات في جل الفصل SDS-PAGE.
- بالتالي يمكن معرفة الكتلة او الوزن الجزيئي بالمقارنة مع بروتينات معلومة الوزن الجزيئي Protein ladder على نفس الجل.

Amal Alghamdi
2011


PROTEIN GEL ELECTROPHORESIS METHOD
1
Protein
2
Add SDS
3
1
2
SDS binds to amino acid residues and gives uniform negative charge to protein with heat the protein is linearized
MolecularStation.com
NEGATIVE ELECTRODE
Add Protein Sample onto SDS-PAGE Gel Lane #2 (Protein Ladder is in Lane #1)
4
Electric Current
Protein Bands are separated By Size
Copyright 2008 MolecularStation.com
POSITIVE ELECTRODE


I
+
I