« تعيين تركيز البروتين الخلوي وتعريفه بالفصل الكهربي»

مقرر البيولوجيا الجزيئية

٢٥١ حدق

العام الجامعي ١٤٣٥-١٤٣٦ هـ

أمـــل الغـــامدي

٢٠١٤

« تعيين تركيز البروتين الخلوي وتعريفه بالفصل الكهربي»

- يتم تعريف ودراسة البروتينات المختلفة في الخلية باستخدام طريقة SDS-PAGE

- PAGE from

(Poly Achrelamyde Gel Electrophoresis)

المرجع: Lammli (1970)

الأدوات:

- مزرعة سائلة بكتيريا نقيه *E. coli* أو أي بكتيريا سالبة الجرام عمرها ٢٤ ساعه على بيئة LB ومزرعة خميره نقيه عمرها ٢٤ ساعه على بيئة دكستروز البطاطس او تشابكس دوكس .
- ديتول وقطن وكبريت للتعقيم.
- ٠,١ عياري من محلول الفوسفات المنظم (Phosphate buffer) (140mM NaCl; 2.7mM KCL; 10mM Na_2HPO_4; 1.8mM KH_2PO_4; pH 7.3 **(PBS)**
- ١٠% من $(NH_4)_2S_2O_8$ **Ammonium persulfate**
- جهاز الطرد المركزي على البارد ٤° م
- الإيثانول MeOH٩٠%

الأدوات:

- حمض orthophosphoric acidبتركيز ٨٥%
- الماء المقطر DDW.
- صبغة الكوماسين الأزرق Coomassie Brilliant Blue G-250 dye
- وعاء قاتم (معتم) أو دورق مغطى بالقصدير لحفظ المحلول Bradford Reagent.
- جليسرول
- Bromophenol blue
- جليسين Glycin
- مادة SDS (sodium dodecyl sulphate)
- مادة **Tetramethylethylenediamine (TMEDA or TEMED** $(CH_3)_2NCH_2CH_2N(CH_3)_2$

الأدوات:

- مادة Tris base
- كحول ميثانول methanol
- حمض الخليك acetic acid
- حمض الخليك الثلجي glacial acetic acid
- حمض الكربوكسيل الثلاثي TCA Trichloroacetic ***acid*** (also known as trichloroethanoic ***acid***)
- أسيتون مثلج Chilled aceton
- ماصات دقيقة (١ ميكرولتر- ١٠٠ ميكرولتر)
- نهايات الماصات الدقيقة بحجمين صغير (أصفر) وكبير(أزرق)./ قفازات / حاويات للتخلص من النهايات المستخدمه.

الأدوات:

- أكريلاميد 30% Acrylamide
- بروتين ماركر Protein ladder (marker)
- ورق ترشيح رقم ١ Whatman filter paper no.1
- هيدروكسيد الصوديومNaOH (٠،١ عياري)
- حمام ثلجي
- حمام مائي١٠٠ °م.
- جهاز الرج vortex mixer
- جهاز الطرد المركزي الدقيق Cooling Microfuge.

طريقة العمل:

أولاً: استخلاص البروتين:

- توضع أنبوبة Eppendorf سعة ٢ مل في حمام ثلجي.
- ينقل ١،٥ مل من المزرعة الى انبوبة ٢مل ثم ترسب بالطرد المركزي ثم تعاد الى الحمام الثلجي.
- يضاف الى الراسب ١,٥ مل من المحلول المنظم (الفوسفات ٠,١ عياري) ٧يرسب بالطرد المركزي البارد ٤°م بسرعة ١٠,٠٠٠ لفة/دقيقة لمدة ١٠ دقائق.
- يقسم الرائق الى قسمين، يستخدم احدهما لتقدير البروتين في العينه بطريقة برادفورد والآخر يستخدم للتحميل على جيل الفصل الكهربي SDS-PAGE او الـ western blotting.

مبدأ عمل BRADFORD ASSAY:

سميت تيمنا بالعالم Bradford(١٩٧٦).

يعتمد على درجة امتصاص صبغة الكوماسين (لونها بني محمر في الوسط الحمضي) التي تتحول إلى صورة كيميائية ذات لون أزرق(في الوسط القاعدي) أي عند ارتباطها مع البروتين (المراد قياسه في العينه) لتعطي مركب متأين معقد شديد الثبات.

خلال تكون هذا المركب المعقد يحدث تكوين لنوعين من الروابط:

١- في الشكل ذو اللون الأحمر من الصبغة تفقد الكترون حر وينتقل إلى المجموعات القابلة للتأين في البروتين مما يغير من طبيعة البروتين ويحولها إلى صورة كارهة للماء.

٢- يرتبط الجزء الكاره للماء في التركيب المعقد للبروتين أيونياً مع المنطقة غير القطبية من الصبغة.

تزيد قوة الرابطة الأيونية بزيادة الارتباط مع البروتين مما يزيد ثبات اللون الأزرق للصبغة ولهذا فكمية المركب المعقد الذي يتكون في المحلول (العينة) يعد مقياسا لتركيز البروتين ويمكن تحديده بقراءة الكثافة الضوئية للمحلول.

تمتص الرابطة بين البروتين والصبغة الأشعة الضوئية عند الطول الموجي ٥٩٥ نانومتر. أما جزيئات الصبغة الغير مرتبطة فتعطي لون أخضر أو احمر.

طريقة العمل: أ- تحضير المحاليل:

تحضير محلول برادفورد5X Bradford's Reagent:

- يخلط ٥٠ مل من الإيثانول ٩٠% مع ١٠٠ مل من حمض orthophosphoric acid بتركيز ٨٥%.
- يضاف ١٠٠ ملجم من صبغة الكوماسين الأزرق Coomassie Brilliant Blue G-250 dye إلى الخليط ثم ثم يكمل الحجم النهائي إلى ١ لتر من الماء المقطر DDW.
- يتم ترشيح المحلول في ورق ترشيح رقم ١ Whatman filter paper no.1. يتخذ لون أحمر داكن وله درجة حموضه pH -0.01.
- يجب تحضيره بعيداً عن الضوء المباشر ويحفظ في زجاجة معتمه او دورق مغلف بالقصدير عند ٤ °م.
- عند الاستخدام يجي تخفيفه بنسبة ١:٤ (1X) باستخدام الماء المقطر DDW فيصبح لونه بني عند pH 1.1.

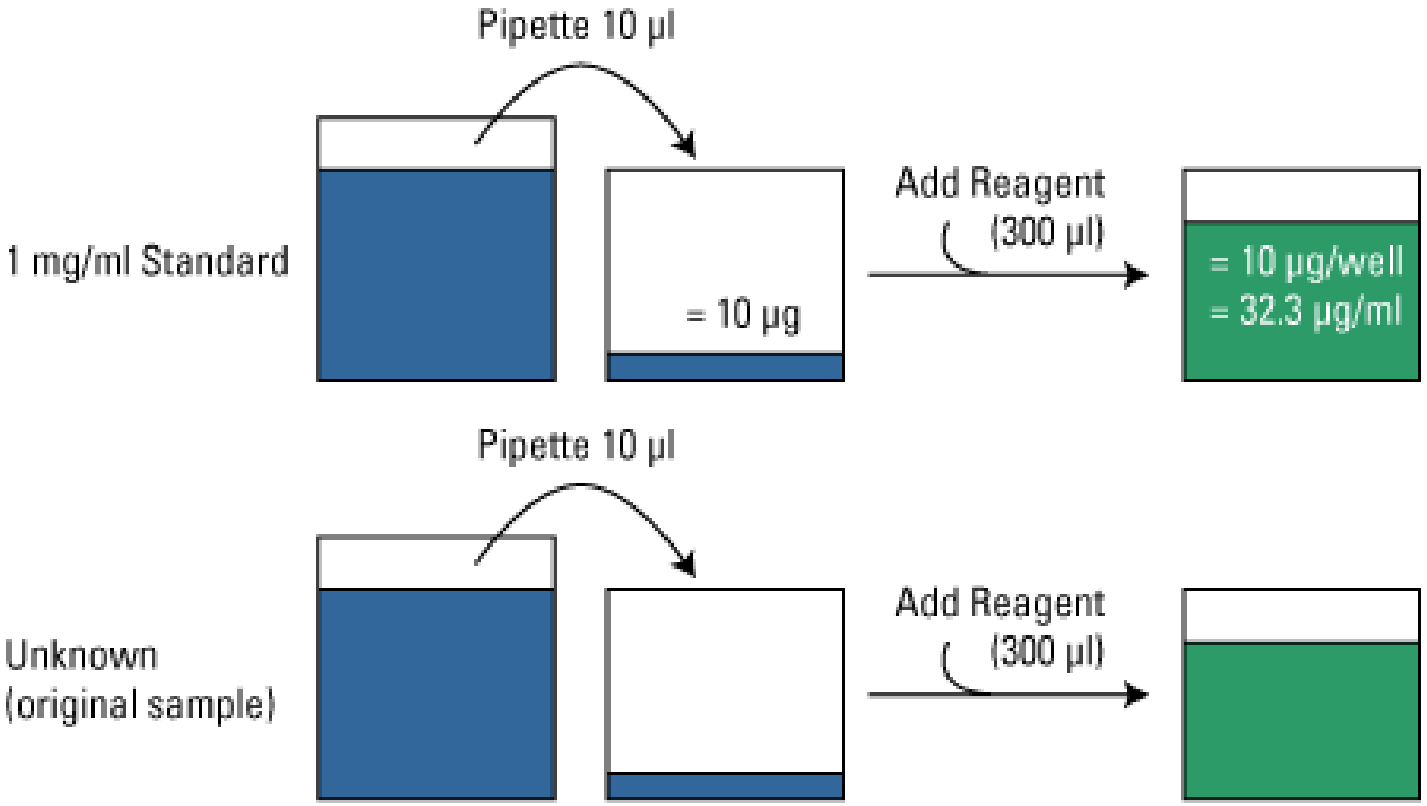
على اليمين أنبوبة تحتوي على صبغة الكوماسين (لون بني أحمر) وعلى اليسار الصبقه ذاتها مضافاً إليها انزيم LYSOZYME (لون أزرق)

أمـــــل الغـــــامدي
٢٠١٤

أولا: تقدير تركيز البروتين الخلوي باستخدام BRADFORD'S REAGENT

- يعالج الرائق المتبقي بإضافة حجم مماثل من حمض TCA (تركيز ١٠%)ويرسب الخليط بالطرد المركزي على سرعة ٥٠٠٠ لفة/دقيقة لمدة ١٠ دقائق.
- يرسب مره أخرى بالطرد المركزي ٣٣٠٠ لفة/ دقيقة لمدة ١٠ دقائق.
- نتخلص من الرائق، ويغسل الراسب في الأسيتون المثلج ثم يذاب في ١ مل من هيدروكسيد الصوديوم ٠،١ عياري من NaOH.

أولا: تقدير تركيز البروتين الخلوي باستخدام Bradford's Reagent



تحضير المنحنى القياسي BSA وتقدير تركيز العينة
Bovine Serum Albumin Standard Curve

- يتم تحضير عدة تركيزات من BSA بحجم ١ مل.
- تحضر خمس تركيزات ٠ ، ١٠ ، ٢٠ ، ٣٠ ، ٤٠ و ٥٠ ميكروجرام /مل.
- يضاف لأنابيب Quartz cuvette (سعة ١,٤ مل):

٠,٢ مل من محلول برادفورد

٠,٨ مل من العينة أو التركيز القياسي

تغطى بالبارافيلم وتقلب وتترك ليتم التفاعل ثم تقاس عند ٥٩٥ نانومتر ويرسم خط قياسي بين نقطتين على الأقل لعلاقة بين الكثافة الضوئية O.D. و تركيز البروتين القياسي وبالمقارنة يتم تحديد تركيز البروتين في العينة.

تحضير المنحنى القياسي BSA وتقدير تركيز العينة
Bovine Serum Albumin Standard Curve

ثانياً: تعريف البروتين الخلوي

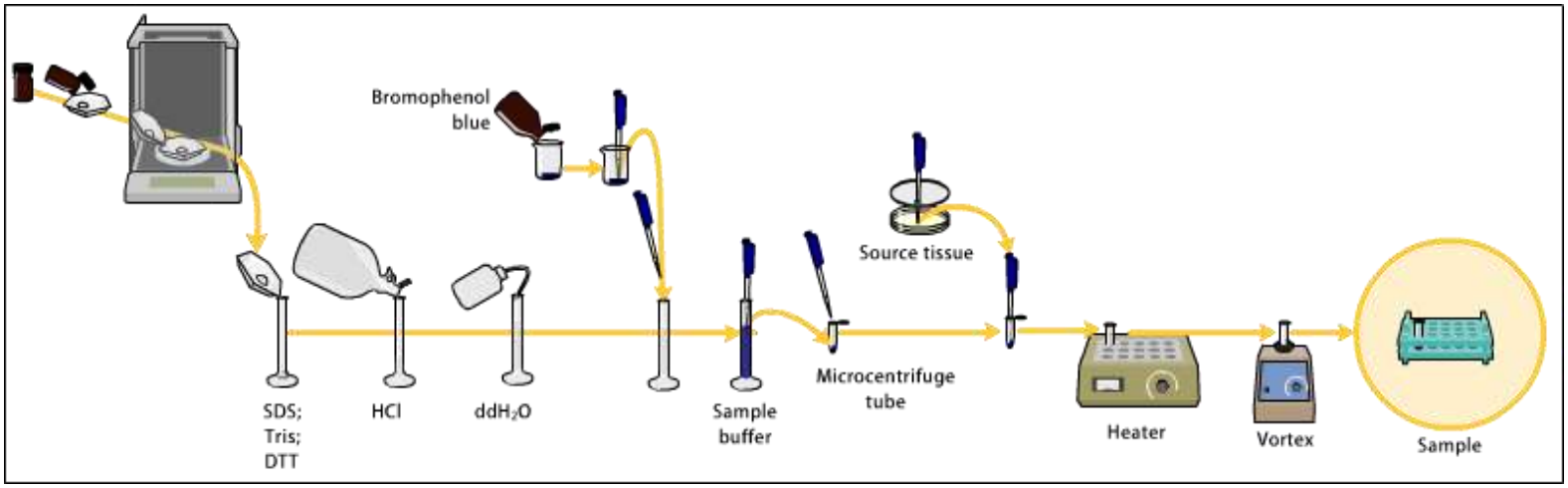
باستخدام الفصل الكهربي SDS-PAGE .

أمـــل الغـــامدي

طريقة العمل: أ- تحضير المحاليل:

- المحلول المنظم للعينة:
- يحضر بإضافة ٢,٥مل من ١ عياري من Tris HCl (pH=6.8) إلى ١ جم من SDS و ٢,٥ مل من β-mercaptophenol ثم يكمل الحجم النهائي الى ٤٠ مل باستخدام الماء المقطر DDW.

- صبغة العينة:
- تحضر بإذابة ٥ جم من البروموفينول الأزرق في ٥,٨ مل من الجليسرول ويكمل الحجم الى ١٠ مل بإضافة ١٠ مل من الماء المقطر منزوع الأيونات DDW.

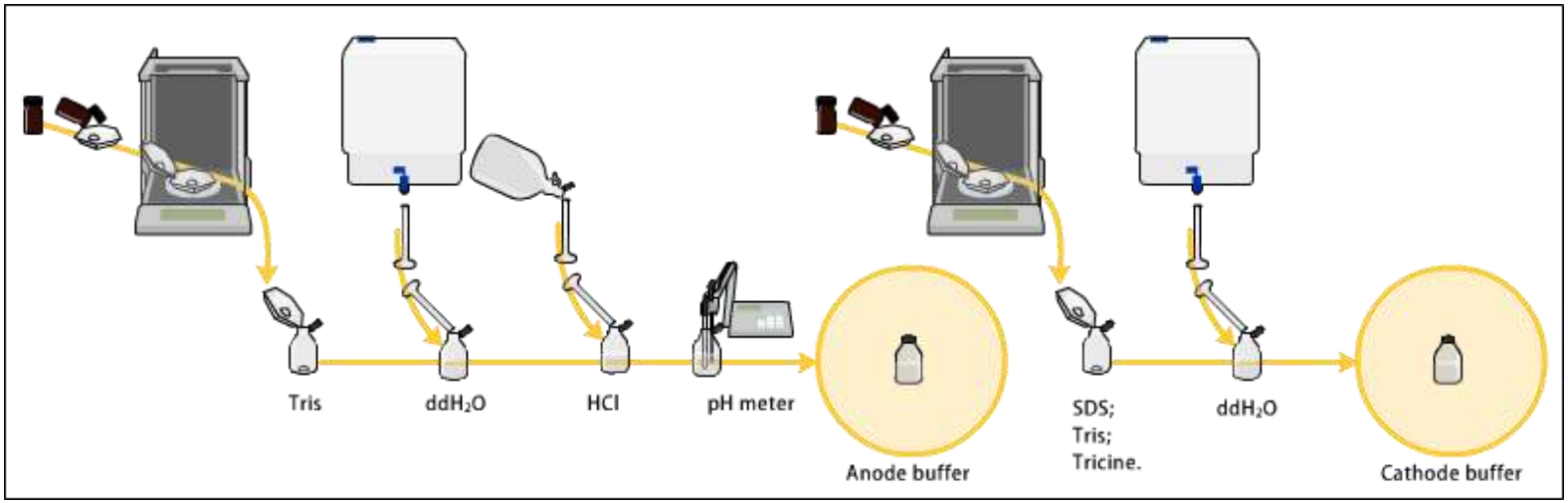

Bromophenol blue
Source tissue
SDS; Tris; DTT
HCl
ddH2O
Sample buffer
Microcentrifuge tube
Heater
Vortex
Sample

طريقة العمل: أولاً: تحضير المحاليل:

- المحلول المنظم للجيل Electrode buffer:
- يحضر بإذابة ٣ جم من Tris base و ١٤,٤٢جم من الجليسين و ١ جم من SDS ويكمل الحجم الى ١٠٠٠ مل من الماء DDW.

- محلول صبغ الجل:
- يحضر بإذابة ١ جم من صبغة الكوماسين الازرق Coomassic brilliant blue R لخليط من ١٨٠ مل من الميثانول مع ١٨٠ مل من الماء DDW و ٤٠ مل من حمض الخليك.

- محلول ازالة صبغ الجل:
- يحضر بخلط ١٠٠ مل من حمض الخليك الثلجي الى ٤٠٠ مل من الميثانول MeOH و ٤٠٠مل من الماء DDW. يتم خلط المزيج جيداً قبل استخدام المقلب المغناطيسي magnetic stirrer.


Tris
ddH2O
HCl
pH meter
Anode buffer
SDS;
Tris;
Tricine.
ddH2O
Cathode buffer

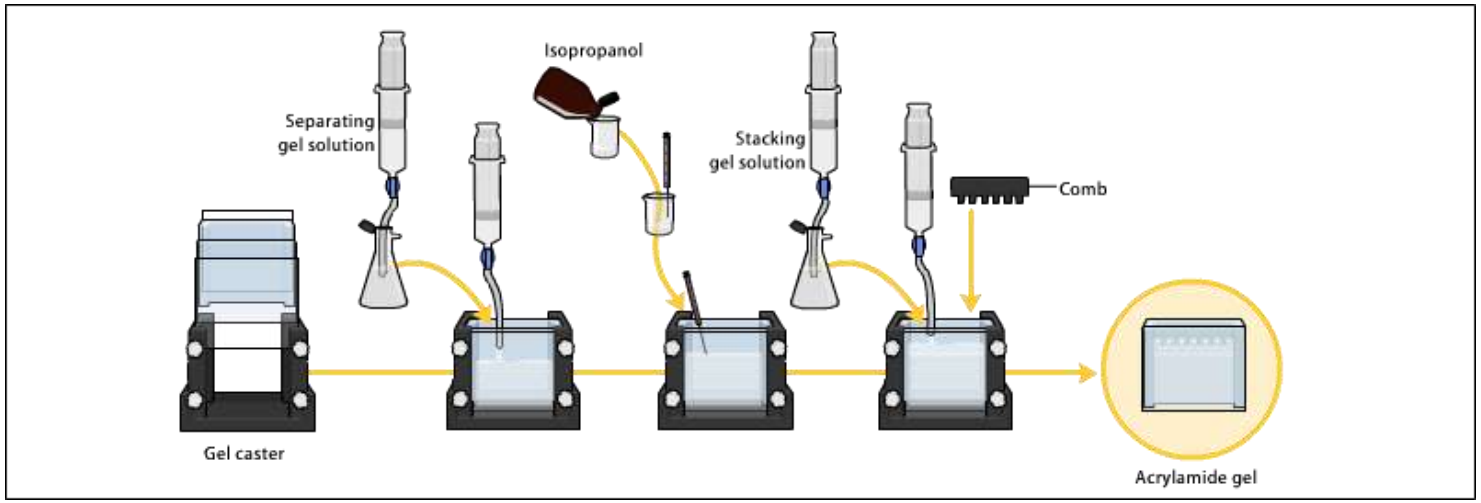
طريقة العمل: أولاً: تحضير المحاليل:

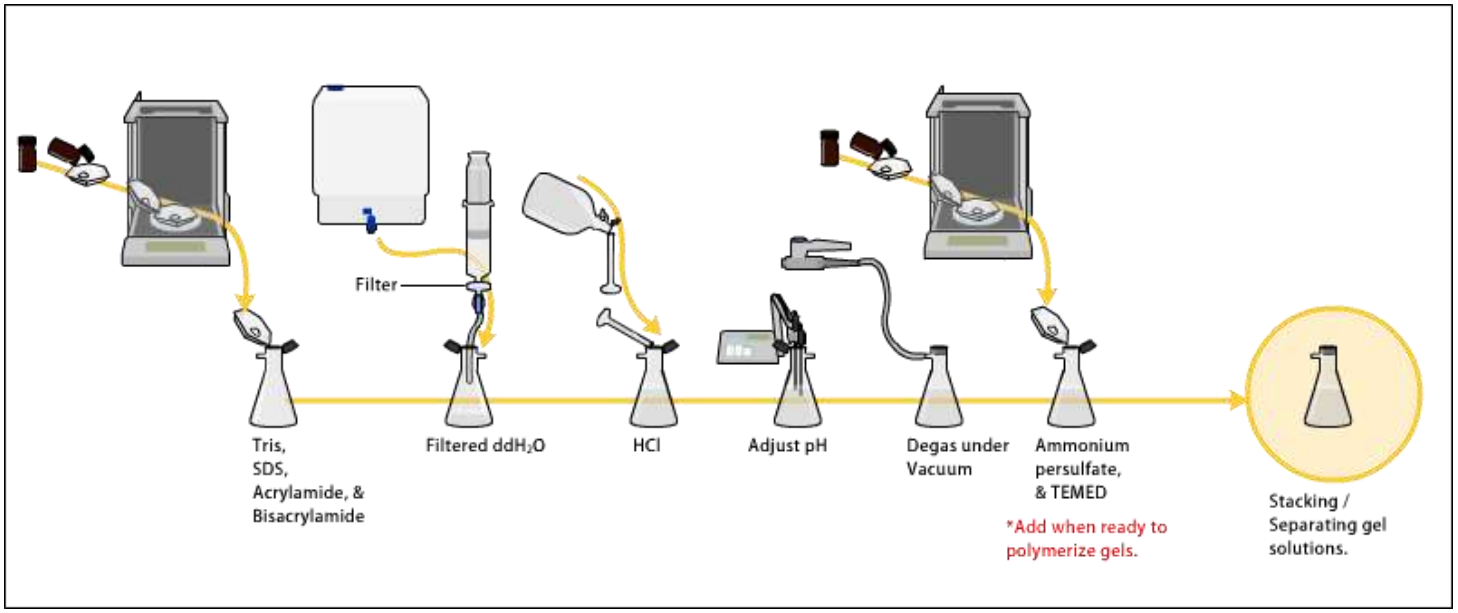
- تحضير محلول الجيل:
- باستخدام ١٢% من محلول A و ٤ % من محلول B

المادة	محلول A (ml)	محلول B (ml)
H2O	9.90	6.80
30% Acrylamide	12.00	1.70
1.5 M Tris (pH 8.8)	7.50	-
1.0 M Tris (pH 6)	-	1.25
10% SDS	0.40	0.10
10% APS	0.40	0.10
TEMED	0.016	0.12

ثانياً: تعريف البروتين الخلوي باستخدام الفصل الكهربي

- طريقة العمل:
- بعد صب محاليل الجل A وB في صندوق الفصل، وبعد ان يتصلب، يضاف حجم مماثل من بروتين العينه في كل عين well.
- يضاف ايضا الماركر في عين اخرى لنفس الجل
- ن يترك البروتين ليجري في الجل لمدة ١٠ ساعات ، حيث تعتبر الصبغة الزرقاء هي صبغة التتبع tracking dye.
- عندما تصل الصبغة الى قاعدة الجيل يتم فصل التيار الكهربي.
- ينقل الجل الى محلول الصبغ لمدة ٨ ساعات ، بعدها ينقل الجل الى محلول نازع الصبغة وينقل منه الى أخر حتى يتحول خلفية الجل الى لون شفاف وتصبح اشرطة bands البروتين مرئية.
- يتم مقارنة الوزن الجزيئي للبروتينات المفصولة بالمقارنه مع البروتين معلوم التركيز marker المستخدم





Separating gel solution
Isopropanol
Stacking gel solution
Comb
Gel caster
Acrylamide gel

Filter
Tris, SDS, Acrylamide, & Bisacrylamide
Filtered ddH₂O
HCl
Adjust pH
Degas under Vacuum
Ammonium persulfate, & TEMED
*Add when ready to polymerize gels.
Stacking / Separating gel solutions.

الفصل الكهربي للبروتين باستخدامSDS-PAGE

SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis

أمـــــل الغــــامدي

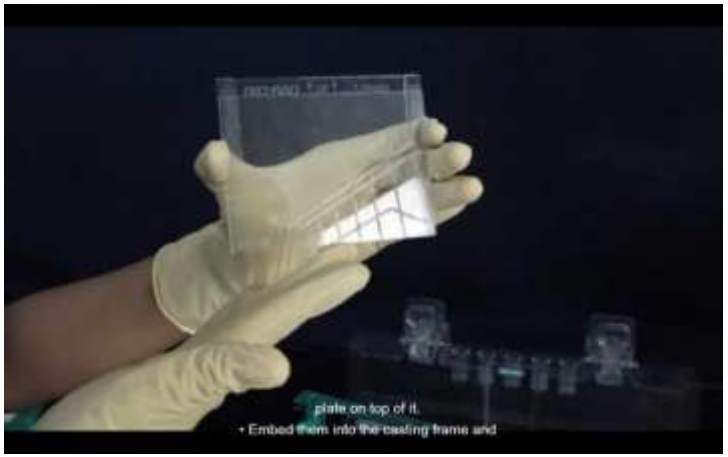
SDS-PAGE(PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)

- 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 لللحقل الكهربي تهاجر البروتينات باتجاه القطب الموجب (الانود anode).
- ثم تفصل بعدها 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

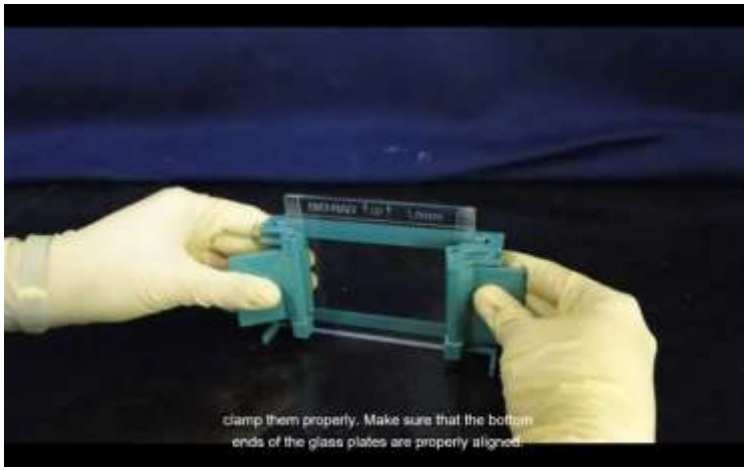
أمـــل الغـــامدي ٢٠١٤

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.

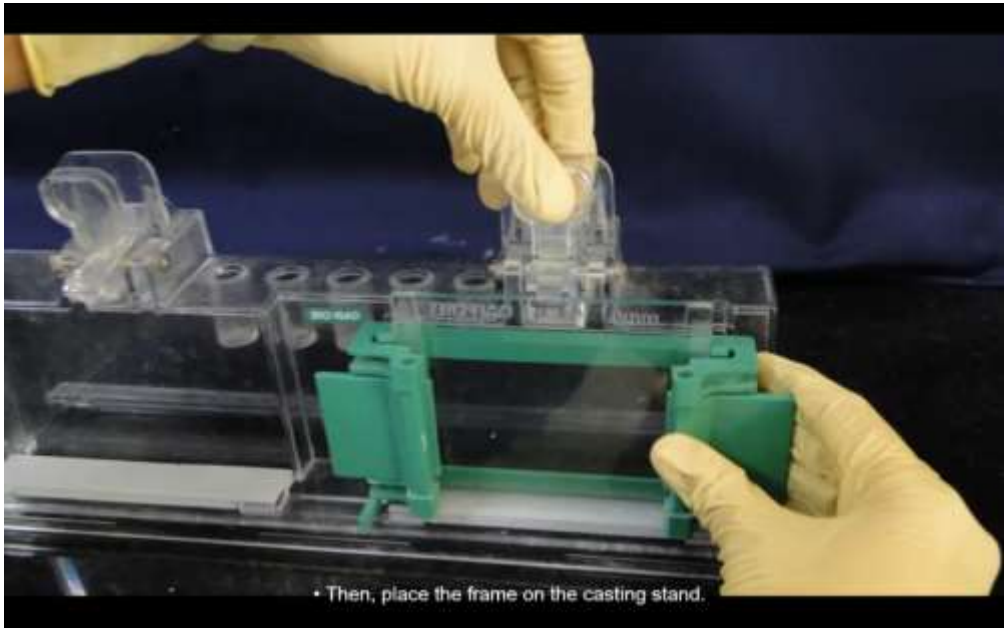


* يتم التاكد من ثبيتهما بمحاذاة بعضهما البعض عند القاعدة بحيث لا تسمح بمرور الماء من قاعدة الطبقين المتراكبين.
* يتم تثبيت الطبقين داخل إطار الصب casting frame ، وتثبت باحكام باستخدام الملاقط الجانبية.



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

أمـــــل الغـــــامدي ٢٠١٤



- 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.

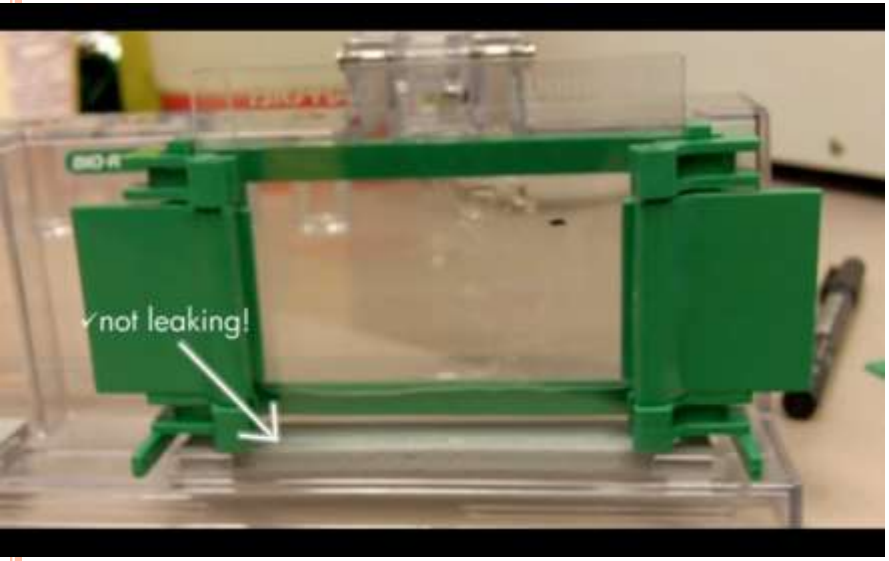
أمل الغامدي ٢٠١٤

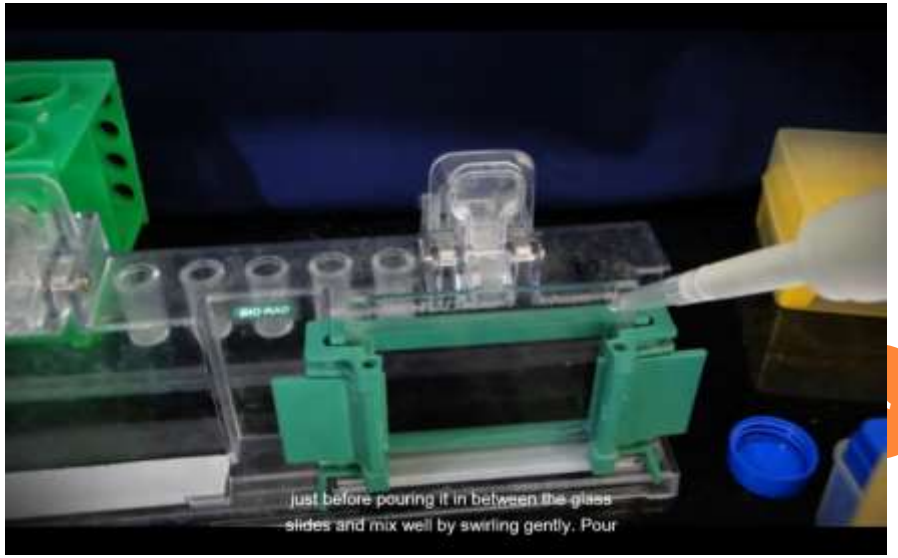
- يتم صب محلول الحل resolving حتى الخط الظاهر على الطبق الزجاجي الذي يمكن تحديده بوضع المشط قبل الصب وتحديد خط أسفله بمسافة ١ سم.

أمـــل الغـــامدي ٢٠١٤

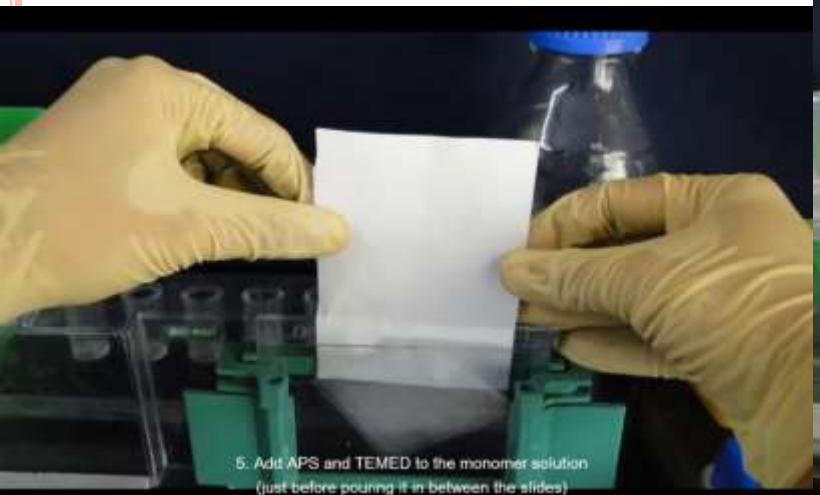
- يمكن التخلص من الفقاعات الهوائية بعد الانتهاء من الصب باستخدام طبقة الأيزوبروبانول أو الماء المقطر على سطح الجل حتى مستوى الجل.
- يترك الجل ليتصلب ٢٠ ـ ٣٠ دقيقة.

أمـــل الغـــامدي
٢٠١٤

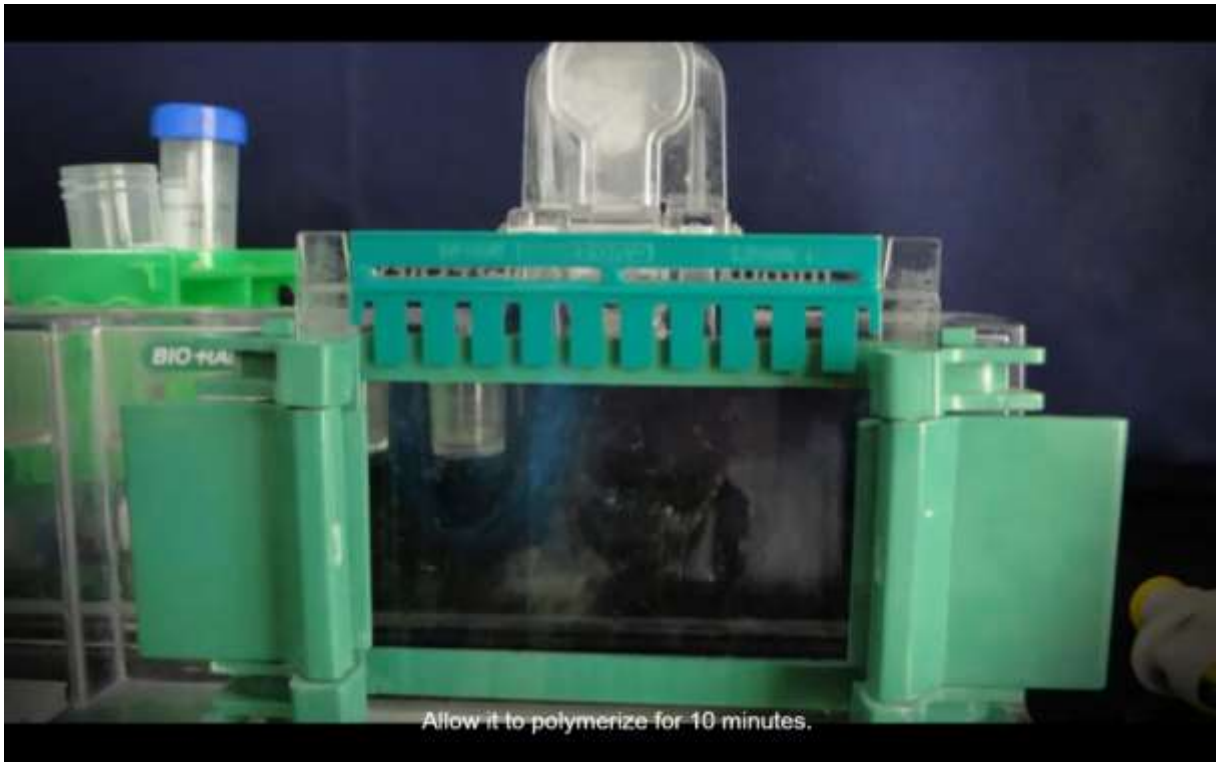




- يجهز جل التجميع stacking gel باضافة جميع المحاليل ماعدا مادتي APS و TEMED. ويتم إضافتها قبل الصب مباشرة.
- يجفف الايزوبروبانول باستخدام ورق الترشيح .
- يضاف الجل الثاني stacking gell



- ثم يضاف المشط داخل الفراغ بين الشريحتين .
- يترك ليتصلب لمدة ١٠ دقائق.



تجهيز العينة:

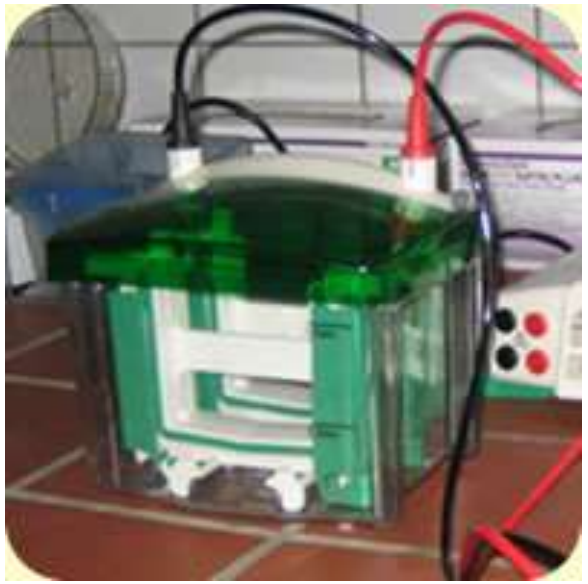
- يخلط البروتين مع المحلول المنظم للعينة بنسبة ٤ :١
- يسخن الخليط في حمام مائي عند درجة حرارة ٣٧°م لمدة ٣٠ دقيقة.

أمـــل الغـــامدي
٢٠١٤

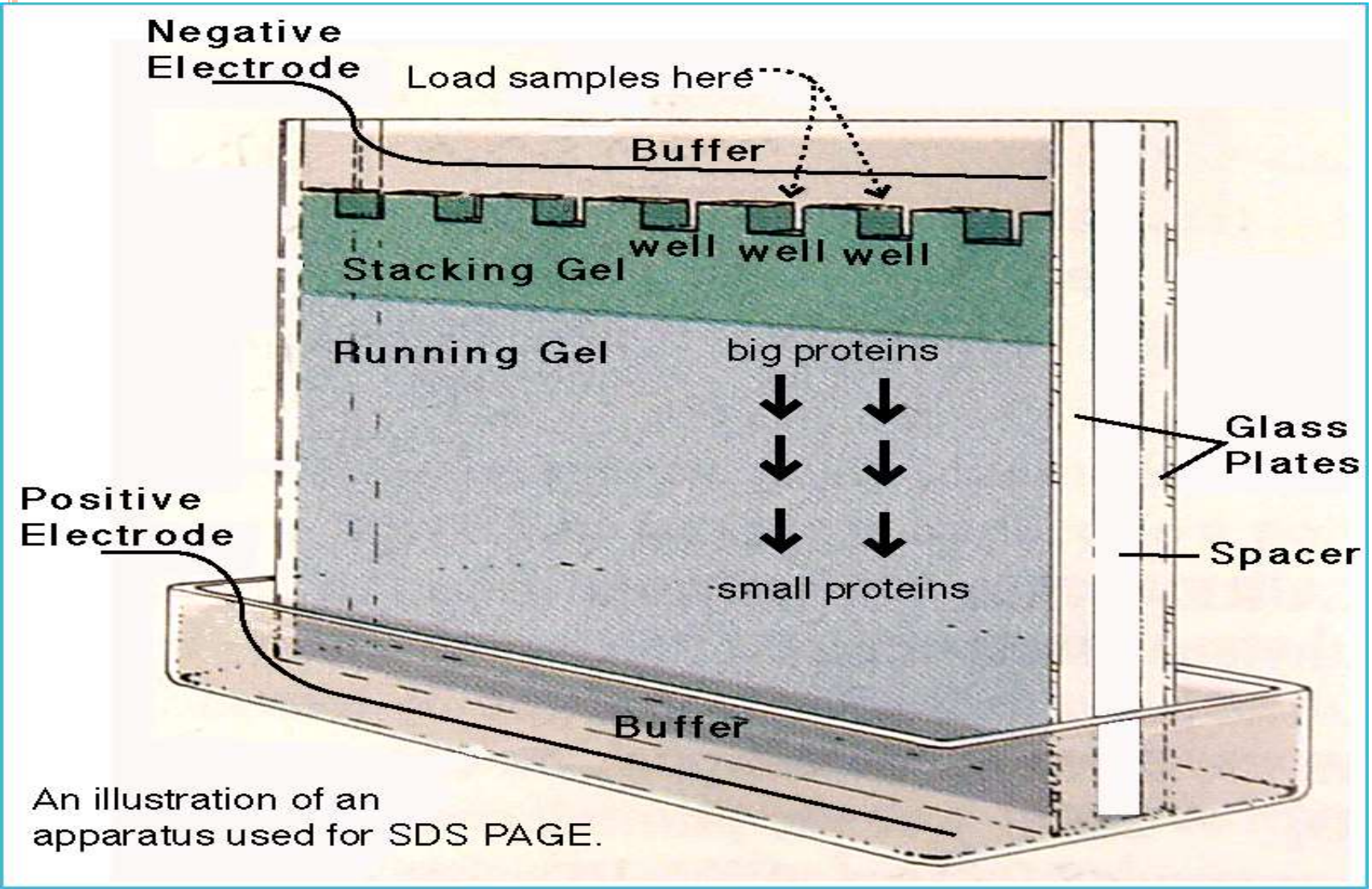
RUNNING THE GEL تحميل العينات في الجل

- 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 ١٨٠ فولت ويترك السريان لمدة ١ 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.

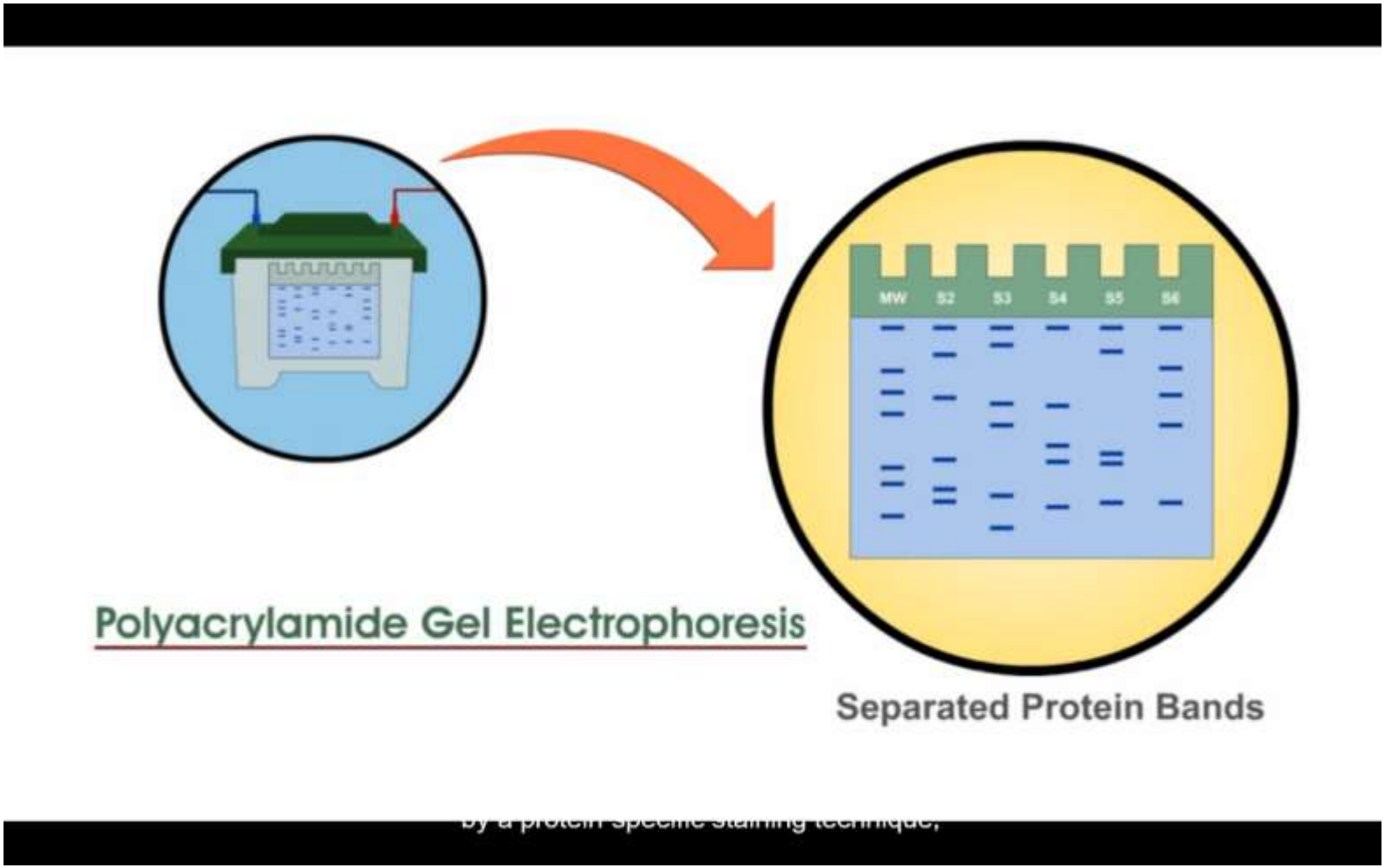
صبغ الجل

- 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 ٣٠ دقيقة.
- يتم وضع الجل على جهاز الهز ، في محلول نزع الصبغة لمدة ٨ 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 الـجل 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.

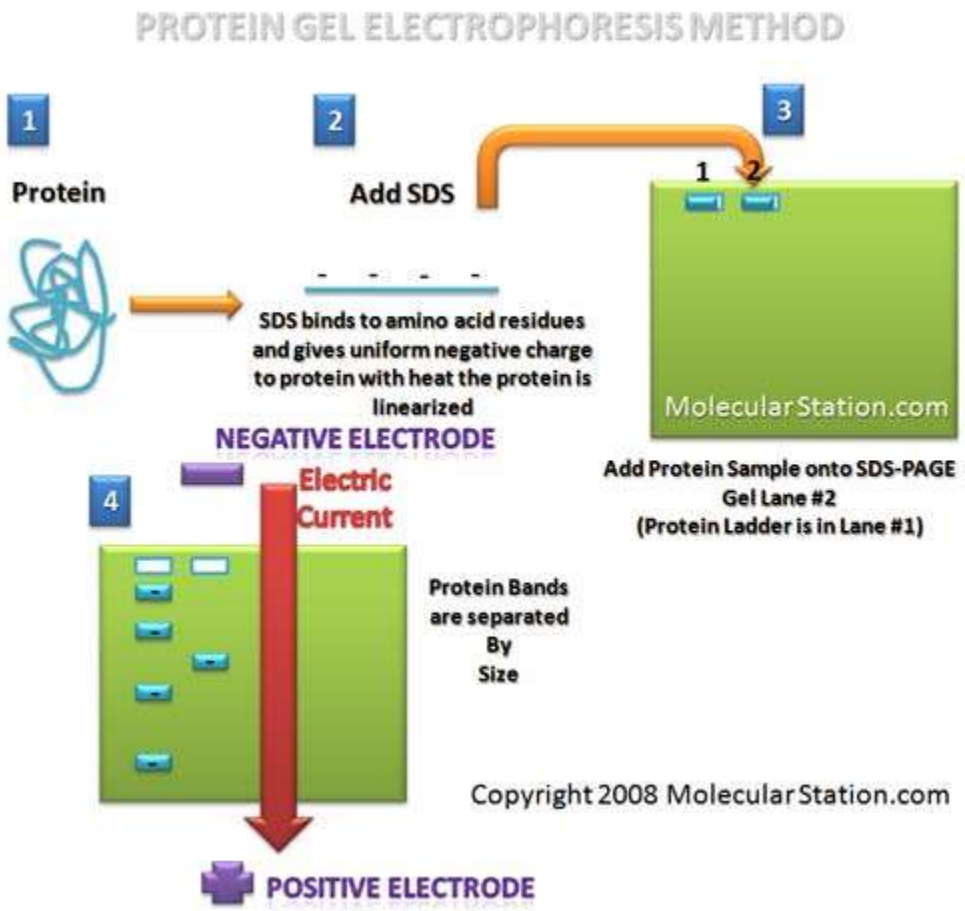
أمـــل الغـــامدي
٢٠١٤

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



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.

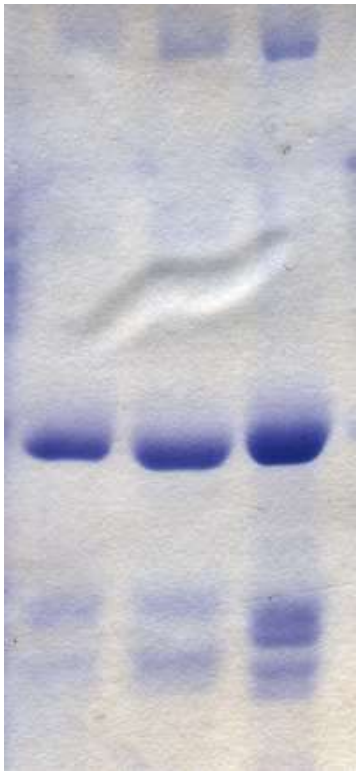


PROTEIN GEL ELECTROPHORESIS METHOD
1
Protein
2
Add SDS
SDS binds to amino acid residues and gives uniform negative charge to protein with heat the protein is linearized
3
1 2
MolecularStation.com
Add Protein Sample onto SDS-PAGE Gel Lane #2 (Protein Ladder is in Lane #1)
NEGATIVE ELECTRODE
4
Electric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

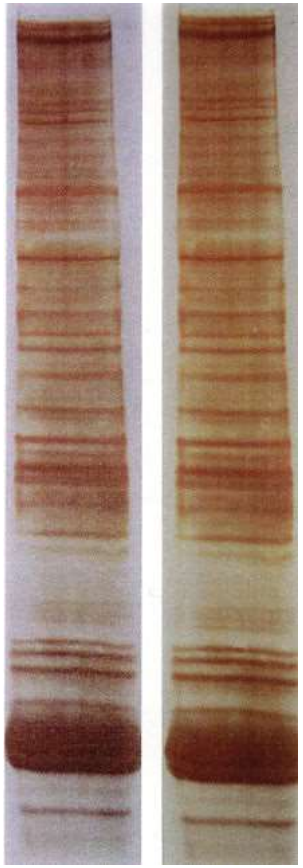
HTTP://WWW.JOVE.COM/SCIENCE-EDUCATION/5058/SEPARATING-PROTEIN-WITH-SDS-PAGE

http://www.youtube.com/watch?v=EDi_n_0NiF4

http://www.youtube.com/watch?v=XUjLO-ek2C8



PAGE of rotavirus proteins stained with Coomassie blue



Silver stained SDS Polyacrylamide gels