

کیت کامل ژل الکتروفورز پروتئین

SDS-PAGE Kit

(Cat-No: □ S1118-25, □ S1117-50)

الف) مقدمه

الکتروفورز یک روش آنالیزی در بیوشیمی و سایر علوم زیستی می باشد که برای جداسازی مولکول های باردار در یک میدان الکتریکی به کار می رود. الکتروفورز ژل سدیم دودسیل سولفات پلی آکریلامید (Sodium Dodecyl Sulphate- Polyacrylamide Gel Electrophoresis) نوعی الکتروفورز است که در آن از سدیم دودسیل سولفات استفاده می شود تا تاثیر ساختار و بار مولکول های پروتئین حذف گردیده و پروتئین ها تنها بر اساس طول زنجیره یا وزن مولکولی تفکیک شوند. در این روش مولکول های کوچک به دلیل مقاومت کمتر ماتریکس ژل سریع تر از مولکول های بزرگتر حرکت می کنند و در نتیجه مسافت بیشتری را در ژل طی می کنند. SDS-PAGE یک سیستم الکتروفورزی ناپیوسته است که توسط لاملی ابداع شده است و توانایی تفکیک پروتئین ها با وزن مولکولی حدود ۵ الی ۲۵۰ کیلوالتون را دارد. در سیستم ناپیوسته ژل دارای دو بخش ژل متراکم کننده (Stacking gel) با pH 6.8 و ژل جداکننده (Resolving gel) با pH 8.8 می باشد که در ژل متراکم کننده دارای منافذ بزرگتر، پروتئین های بارگذاری شده تغلیظ و آماده تفکیک بر اساس وزن مولکولی در ژل جداکننده می شوند.

با وجود اینکه SDS-PAGE به دستگاه گران قیمت نیاز ندارد و روش انجام آن به نسبت آسان است، ولی، اهداف و کاربردهای آنالیزی گسترده ای دارد. از جمله کاربردهای تحقیقاتی آن می توان به تعیین درجه خلوص یک پروتئین، بررسی الگوی پروتئینی یک سلول، بررسی بیان یک پروتئین نوترکیب، تعیین وزن مولکولی نسبی یک پروتئین، اثبات حضور پیوندهای دی سولفیدی در پروتئین های چند زیرواحدی، حتی تفکیک الیگونوکلوئوتیدها و همچنین مرحله اول وسترن بلاتینگ اشاره کرد.

کیت حاضر برای الکتروفورز رایج پروتئین یعنی الکتروفورز در شرایط دناتوره احیایی تهیه شده است. محتوای کیت برای ۲۵ و یا ۵۰ مینی ژل کافی است. صرفه جویی در زمان و هزینه های خرید مواد سازنده کیت، صرفه جویی در زمان تهیه و آماده سازی محلول های سازنده، حذف هزینه آنالیز نمونه توسط شرکت های مربوطه و انجام الکتروفورز نمونه توسط خود محقق به خاطر روش کار ساده کیت از امتیازات ویژه کیت حاضر می باشد.

ب) محتوای کیت

ردیف	نام ماده	مقدار (برای ۲۵ ژل)	مقدار (برای ۵۰ ژل)
۱	مخلوط آکریلامید	۵۰ میلی لیتر	۱۰۰ میلی لیتر
۲	بافر ژل جدا کننده	۵۰ میلی لیتر	۱۰۰ میلی لیتر
۳	بافر ژل متراکم کننده	۵ میلی لیتر	۱۰ میلی لیتر
۴	SDS 10%	۵/۲ میلی لیتر	۵ میلی لیتر



۵	APS	۲۵۰ میلی گرم	۵۰۰ میلی گرم
۶	TEMED	۵/۰ میلی لیتر	۱ میلی لیتر
۷	بافر نمونه ۶X	۵/۲ میلی لیتر	۵ میلی لیتر
۸	ایزوپرانول	۱۵ میلی لیتر	۳۰ میلی لیتر
۹	بافر تانک 5X	۲۵۰ میلی لیتر	۵۰۰ میلی لیتر
۱۰	محلول رنگ آمیزی	۱۰۰ میلی لیتر	۲۰۰ میلی لیتر

نگهداری کیت:

نکته: محلول ۱۰٪ آمونیوم پرسولفات بهتر است به مقدار کم و تازه تهیه شود، به عنوان مثال می توان ۵۰ mg از آنرا در ۵ ml آب دوبار تقطیر حل کرد.

موارد مورد نیاز که در داخل کیت موجود نیست:

- ۱- تانک الکتروفورز
- ۲- منبع تغذیه
- ۳- سرنگ همیلتون
- ۴- مارکر یا نردبان پروتئینی
- ۵- محلول رنگبری

ج) مراحل انجام آزمایش

۱) آماده سازی ژل:

أ. ابتدا بر اساس مدل دستگاه الکتروفورز، شیشه ها و فاصله اندازه ها را سرهم کرده و به نگهدارنده مخصوص متصل کنید. دقت شود که قبل از سرهم کردن شیشه ها آنها را کامل شسته و سپس با اتانول تمیز کنید. توجه شود که شیشه ها کاملاً روی هم قرار گرفته باشند.

ب. نکته: پس از سرهم کردن شیشه ها، برای اطمینان از عدم نشتی می توانید از آب مقطر استفاده نمایید. در صورت نیاز، برای درزگیری می توان از آگار ۱٪ استفاده کرد



ت. برای تهیه محلول ژل جداکننده ابتدا درصد ژل بر اساس جدول ۱ تعیین شده و سپس بر اساس جدول ۲ مقادیر مشخص شده از هر محلول بجز TEMED را در یک ظرف تمیز ریخته و کاملاً هم زده شود. درست قبل از زمانی که می‌خواهید محلول ژل را به فضای بین شیشه‌ها منتقل کنید TEMED را افزوده، به هم زده و بلافاصله به فضای بین شیشه‌ها بریزید.

جدول ۱: راهنمای انتخاب درصد ژل جداکننده بر اساس وزن مولکولی پروتئین‌های مورد مطالعه

وزن مولکولی پروتئین(های) مورد مطالعه (kDa)	درصد ژل پیشنهادی (%)
> ۱۰۰	۸
۳۰-۱۰۰	۱۰
۱۰-۷۰	۱۲
< ۱۰	۱۵

جدول ۲: مقادیر مورد نیاز برای تهیه ژل جداکننده با درصدهای متفاوت در حجم ۱۰ میلی‌لیتر. در صورتی که حجم ژل کمتری نیاز باشد می‌توانید مقادیر آن را به یک نسبت کم کنید (ژل مورد استفاده در اغلب آزمایشگاه‌ها ۱۲٪ می‌باشد).

درصد ژل				
۸٪	۱۰٪	۱۲٪	۱۵٪	
۴/۶	۴	۳/۳	۲/۳	محلول‌ها
۲/۷	۳/۳	۴	۵	
۲/۵	۲/۵	۲/۵	۲/۵	
۰/۱	۰/۱	۰/۱	۰/۱	
۰/۱	۰/۱	۰/۱	۰/۱	
۶	۴	۴	۴	
۱۰				حجم کلی (میلی لیتر)

ث. در حین انعقاد ژل جداکننده، مقادیر محلول ژل متراکم کننده به جز TEMED را مطابق جدول ۳ درون یک بشر ریخته و کاملاً هم زده شود. بعد از انعقاد کامل ژل جداکننده، سطح آن را با آب دوبار تقطیر شسته تا ایزوپروپانول آن حذف شود. پس از افزودن TEMED طبق جدول ۳ به محلول ژل متراکم کننده و مخلوط کردن آن، به آرامی محلول ژل را به فضای بین شیشه‌ها اضافه کرده و بلافاصله شانه تمیز را در داخل آن فرو کنید. بهتراست بعد از انعقاد ژل و قبل از در آوردن شانه، انتهای دندانهای آن را روی شیشه با مازیک مشخص کنید تا نمونه‌گذاری و تشخیص چاهک‌ها راحت باشد.



جدول ۳: مقادیر مورد نیاز برای تهیه ژل متراکم کننده (۵ درصد)

مقدار	محلول‌ها
۳/۴۳	آب مقطر (ml)
۰/۸۳	محلول آکریلامید (ml)
۰/۶۳	بافر ژل متراکم کننده (ml)
۵۰	SDS 10% (μl)
۵۰	APS 10% (μl)
۵	TEMED (μl)
۵	حجم کلی (میلی لیتر)

۲) آماده سازی نمونه‌های پروتئینی

ا. نمونه‌های پروتئینی که می‌توانند بر روی ژل بارگذاری شوند می‌توانند مخلوط پروتئینی حاصل از لیزات سلولی، بافت یا پروتئین خالص از منابع گوناگون جانوری، گیاهی، قارچی، باکتریایی و ویروسی باشند. مقدار پروتئینی که می‌توان بر روی ژل SDS-PAGE بارگذاری کرد مقدار ۱ الی ۵ میکروگرم برای پروتئین خالص و ۲۰ الی ۵۰ میکروگرم پروتئین ناخالص می‌باشد.

ب. برای شروع کار بهتر است در یک میکروتیوب غلظت و حجم مشخصی از پروتئین‌های خود را با بافر 6X مخلوط کرده (به عنوان مثال برای حجم ۲۵ میکرولیتر از نمونه ۵ میکرولیتر بافر نمونه 6X) و نمونه‌ها را به مدت ۵-۱۰ دقیقه در بن ماری با دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد قرار دهید. در این فاصله می‌توانید ژل را به تانک متصل کرده و بافر الکتروود تانک را تا پوشاندن سطح ژل و چاهک‌ها به داخل تانک بالا و پایین بریزید. بعد از خنک شدن نمونه‌ها آنها را با سرنگ همیتون و یا سمپلر در چاهک‌های ژل بارگذاری نمایید. از آنجایی که بافر نمونه دارای گلیسرول است نمونه در ته چاهک قرار می‌گیرند. توصیه می‌شود حجم یکسانی از تمامی نمونه‌ها در چاهک‌ها بارگذاری شود. در صورت غلیظ بودن نمونه‌ای آن را با آب مقطر رقیق کنید.

۳) انجام الکتروفورز

بعد از اتمام بارگذاری نمونه‌ها سیم‌های رابط را به منبع تغذیه و تانک متصل کرده و الکتروفورز را در ولتاژ ثابت با شدت ۳۰-۴۰ ولت برای ژل متراکم کننده انجام داده و پس از رسیدن نمونه‌ها به خط مرزی دو ژل، ولتاژ دستگاه را به ۷۰-۵۰ ولت تغییر دهید. دقت شود که ولتاژ برای هر سانتی‌متر طول ژل باید ۱۰ الی ۱۵ ولت باشد که در این صورت برای مینی‌ژل‌ها حداکثر ۱۰۰ و برای ژل‌های متوسط و بزرگتر حداکثر ۲۰۰ ولت خواهد بود.



۴) رنگ آمیزی و رنگبری

بعد از رسیدن رنگ آبی به انتهای ژل، الکتروفورز را متوقف کرده و با احتیاط ژل را از بین شیشه‌ها جدا کنید و بعد از شستشو با آب مقطر آن را در یک ظرف درب‌دار داخل محلول رنگ کوماسی بلو قرار داده و به مدت ۱۵-۳۰ دقیقه رو شیکر قرار دهید. بعد از اینکه ژل کاملاً رنگ آمیزی شد محلول رنگ را خالی و برای رنگ آمیزی‌های بعدی نگهداری کنید. ژل را با آب مقطر شستشو داده و سپس با اضافه کردن محلول رنگبر آن را به خوبی تکان دهید. باندهای پروتئینی به تدریج به رنگ آبی ظاهر شده در حالی که زمینه ژل بی‌رنگ خواهد شد. بعد از عکس‌برداری و ثبت ژل می‌توانید آن را در محلول ۱۰٪ اسید استیک در یک ظرف درپوش‌دار برای مدت طولانی نگهداری کنید.

د) توصیه‌ها

- در صورتی که دمای اتاق پایین است می‌توان مقادیر TEMED و APS را تا دو برابر افزایش داد.
- حداقل ۳ سانتی‌متر از فضای بالای شیشه‌ها برای ژل متراکم کننده اختصاص داده شود.
- بلافاصله بعد از ریختن محلول ژل با یک سمپلر مقداری از محلول ایزوپروپانول به روی ژل اضافه کنید تا در موقع انعقاد ژل سطح آن صاف شود.
- از روی حجم کم باقیمانده محلول ژل در بشر می‌توان به انعقاد ژل در فضای بین شیشه‌ها پی برد. متوسط زمان انعقاد ژل ۱۵ الی ۴۵ دقیقه خواهد بود.
- توصیه می‌شود که در مینی‌ژل‌ها ولتاژ نصف ولتاژهای گفته شده در بند ۳ تنظیم شود تا بعد از رنگ آمیزی باندهای شفاف‌تری مشاهده شود.

۶) عیب‌یابی:

مشکل	احتمالات موجود	راه حل‌های پیشنهادی
عدم پلیمریزاسیون ژل	APS کهنه بودن	تازه تهیه شود APS
	کهنه بودن محلول آکریل-بیس آکریل	محلول تازه تهیه شود
	سرد بودن محلول‌ها	نیم ساعت قبل از کار محلول‌ها از یخچال به دمای اتاق منتقل شود
عدم پلیمریزاسیون بخشی از ژل در بین شیشه‌ها	مخلوط نشدن پرسولفات آمونیوم در محلول ژل	مخلوط کردن یکنواخت ژل با به هم زدن آن قبل از ریختن ژل بین شیشه‌ها
چاهک‌های بی‌نظم در ژل متراکم کننده	خارج ساختن شانه قبل از انعقاد کامل	زمان کافی به انعقاد ژل داده شود تا پلیمریزاسیون کامل گردد.
قرار نگرفتن نمونه در ته چاهک‌ها	نبود گلیسرول در بافر نمونه	افزودن گلیسرول به بافر نمونه
باندهای نامنظم و موج پروتئینی	وجود حباب‌های هوا در ژل	محلول ژل را هواگیری کنید
	تشکیل منافذ متفاوت در ژل	قبل از ریختن ژل بین شیشه‌ها آنرا به طور کامل بهم بزنید
	بالا بودن غلظت نمکی بالا در نمونه	نمونه را در بافر ۱X رقیق کنید.



وجود باندهای نامشخص و یا اسمیر در ژل	پروتئولیز در حین استخراج ژل	در استخراج نمونه از مهارکننده‌های پروتئازی استفاده شود و همچنین استخراج در دمای پایین صورت گیرد
وجود باند قوی در ابتدای ژل جداکننده	وجود رسوبات یا تجمعات پروتئینی یا لیپوپروتئینی نامحلول	نمونه به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۵۰۰g سانتریفوژ شود
	غلظت پایین SDS ی ماده احیاکننده	غلظت SDS و DTT افزایش یابد

در صورت بروز هر گونه ابهام، مشکل یا اشتباه با کارشناسان پشتیبانی فنی آرسام فرازیست در میان بگذارید. کارشناسان ما با شماره تلفن ۰۹۱۴-۷۱-۵۷۴-۷۱ از طریق واتساپ/تلگرام برای ارائه راهنمایی و رفع مشکل حاضر هستند.