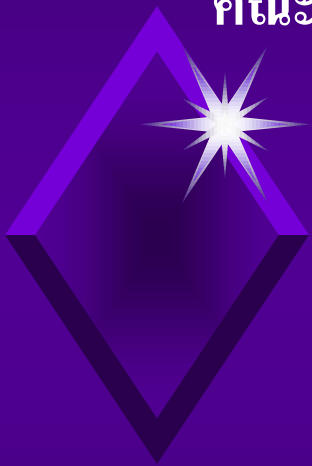


สไลด์สาธิตการทำ SDS-PAGE

คณะผู้จัดทำ :



1. รศ. ดร. อภัสสร่า ชูเทศะ¹

2. นายสมหมาย หอมสวาท¹

3. ผศ. ดร. น. ศพ. จตุพร หनुต²

¹ ภาควิชาสรีรวิทยา ² ภาควิชาเวชศาสตร์คลินิกสัตว์เลี้ยง

คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



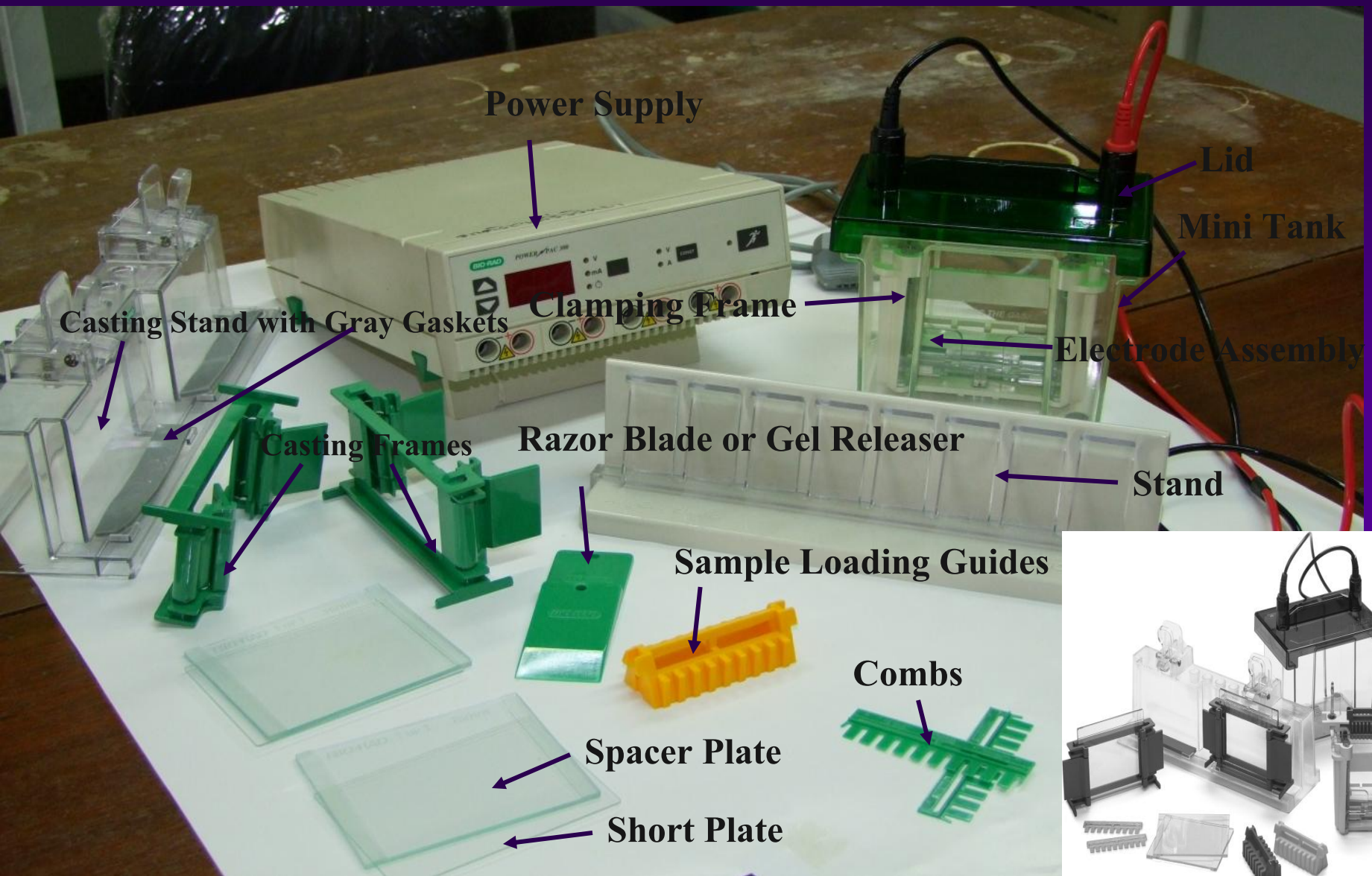
อุปกรณ์การทำ SDS-PAGE :

- Mini-PROTEAN[®] 3 Cell

บริษัท Bio-Rad U.S.A.



Mini-PROTEAN 3 System Components



Mini-PROTEAN 3 System Components



Glass Plate:

1. Spacer Plate

glass plates with permanently bonded gel spacers

2. Short Plate

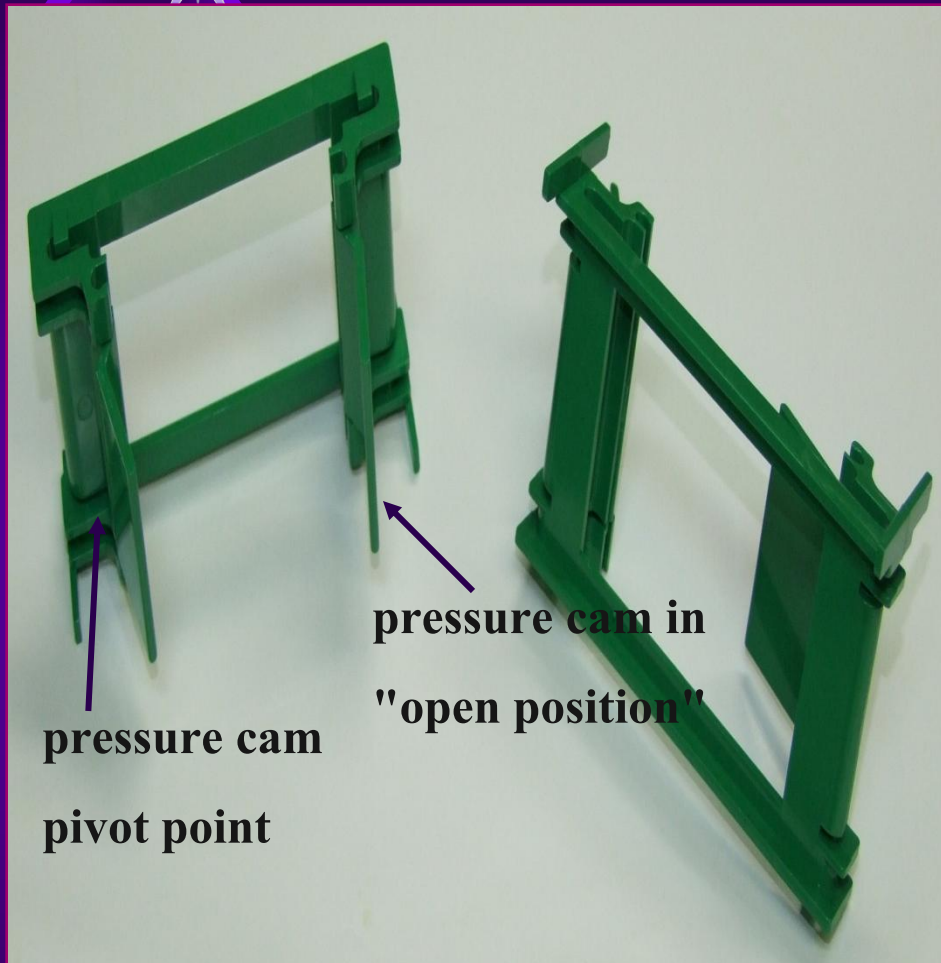
Combs:

Combs

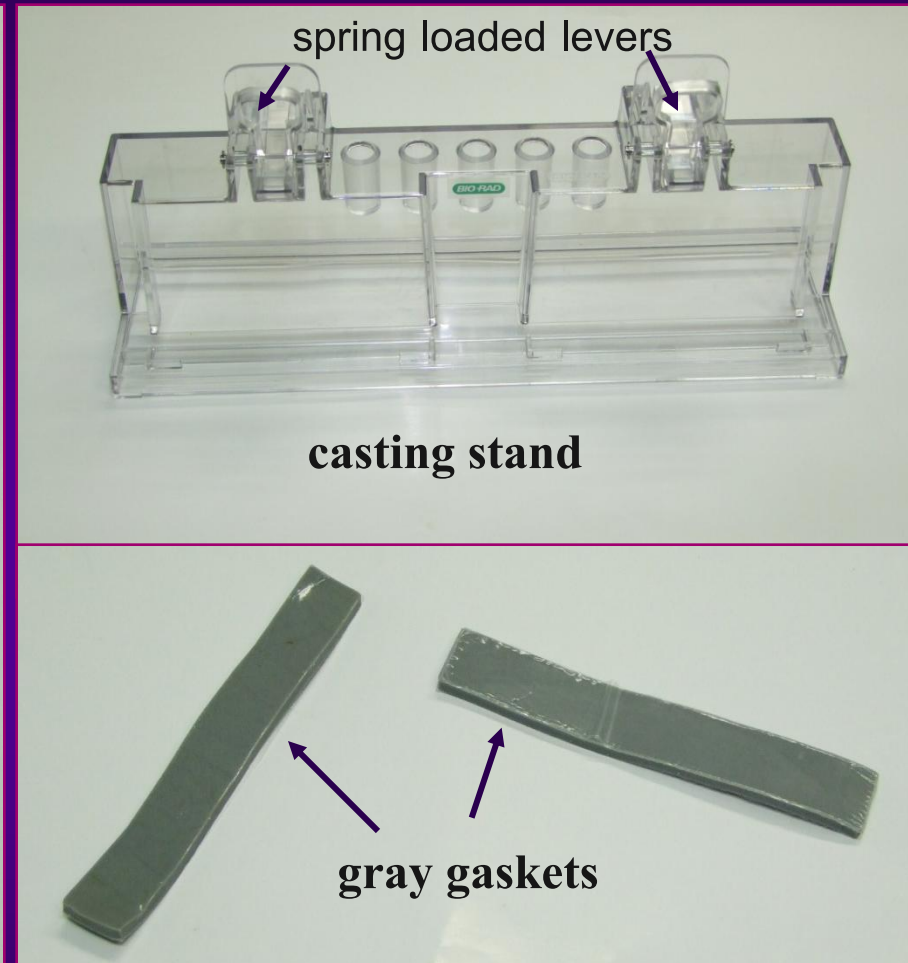
อุปกรณ์ในการเตรียมแผ่น gel



Casting Frames

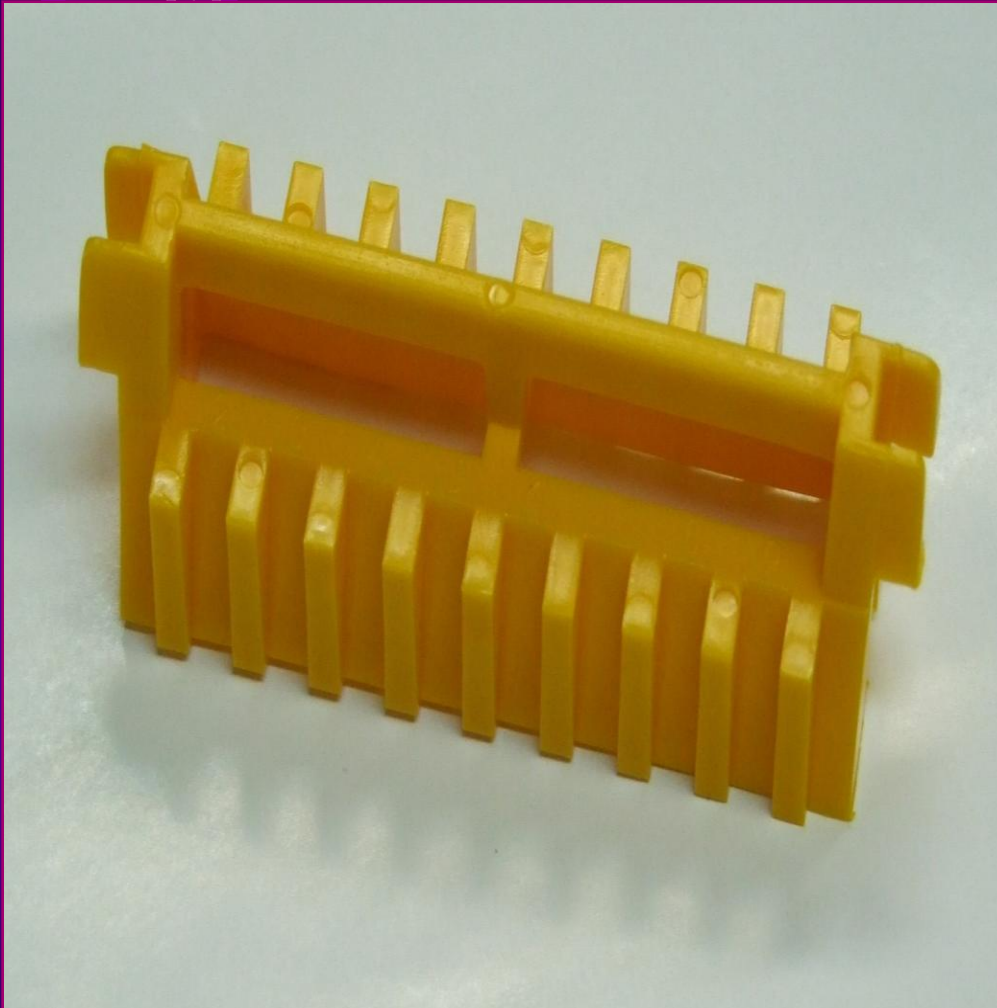


Casting Stand with Gray Gaskets



อุปกรณ์ในการเตรียมแผ่น gel

Sample Loading Guides

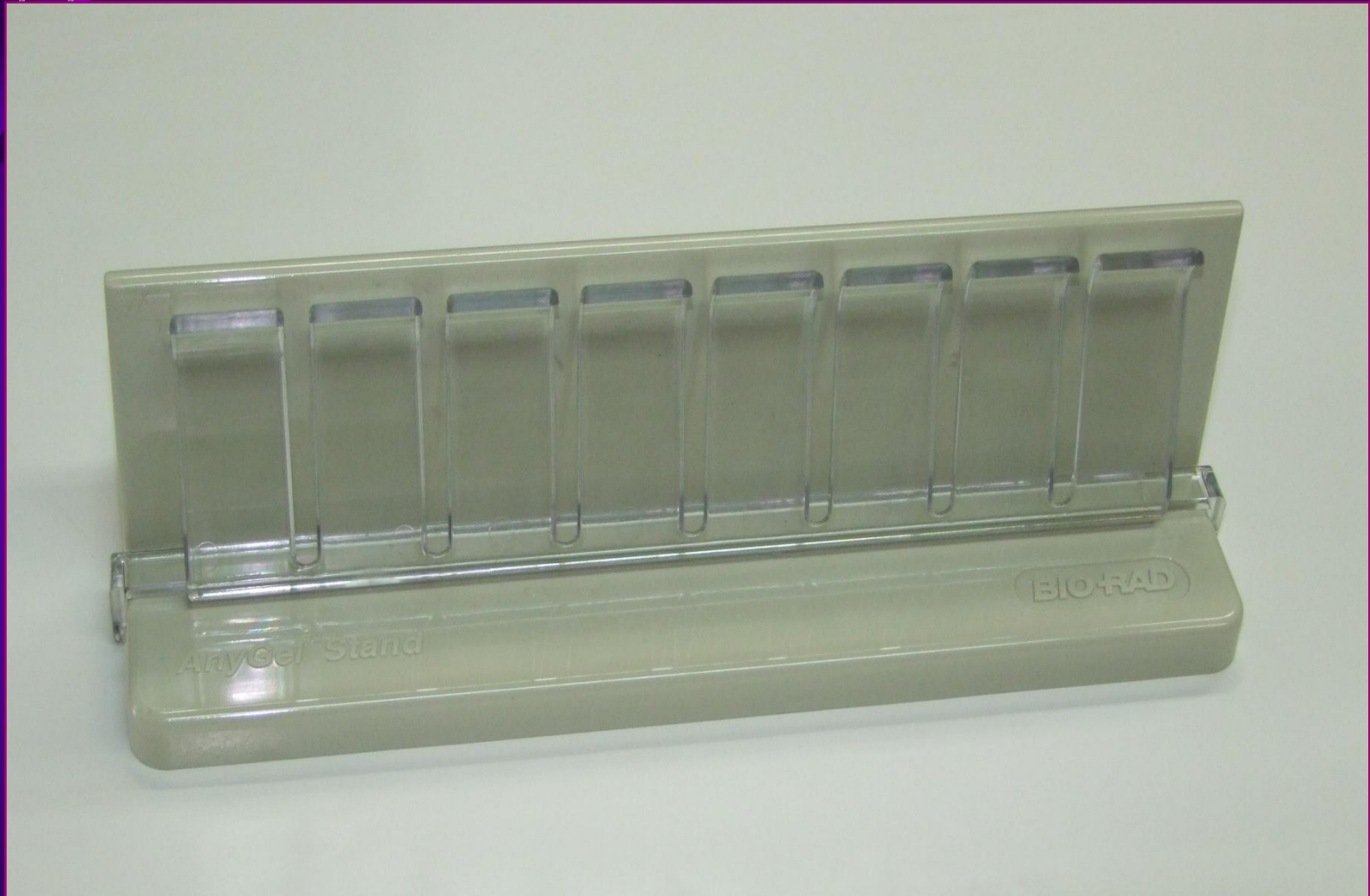


Razor Blade or Gel Releaser



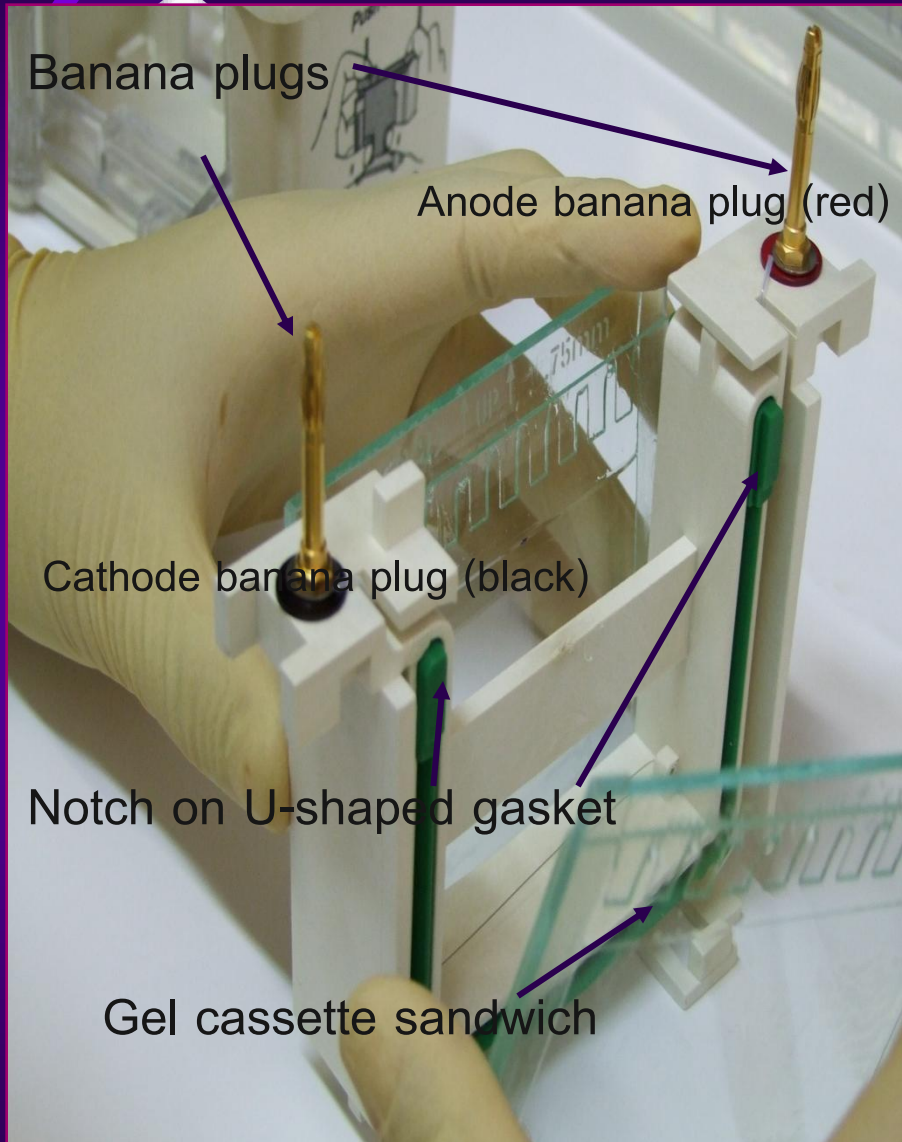
อุปกรณ์ในการเตรียมแผ่น gel

Stand

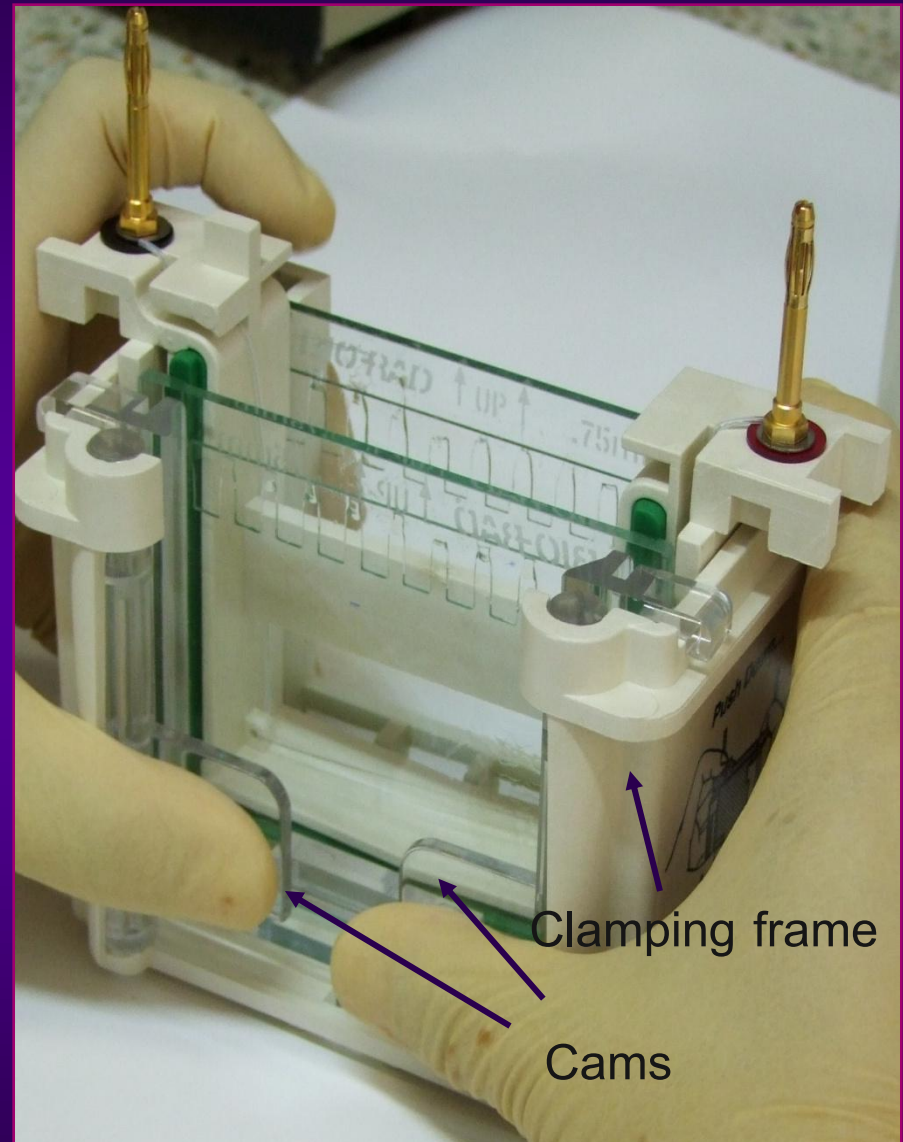


อุปกรณ์ในการเตรียมแผ่น gel

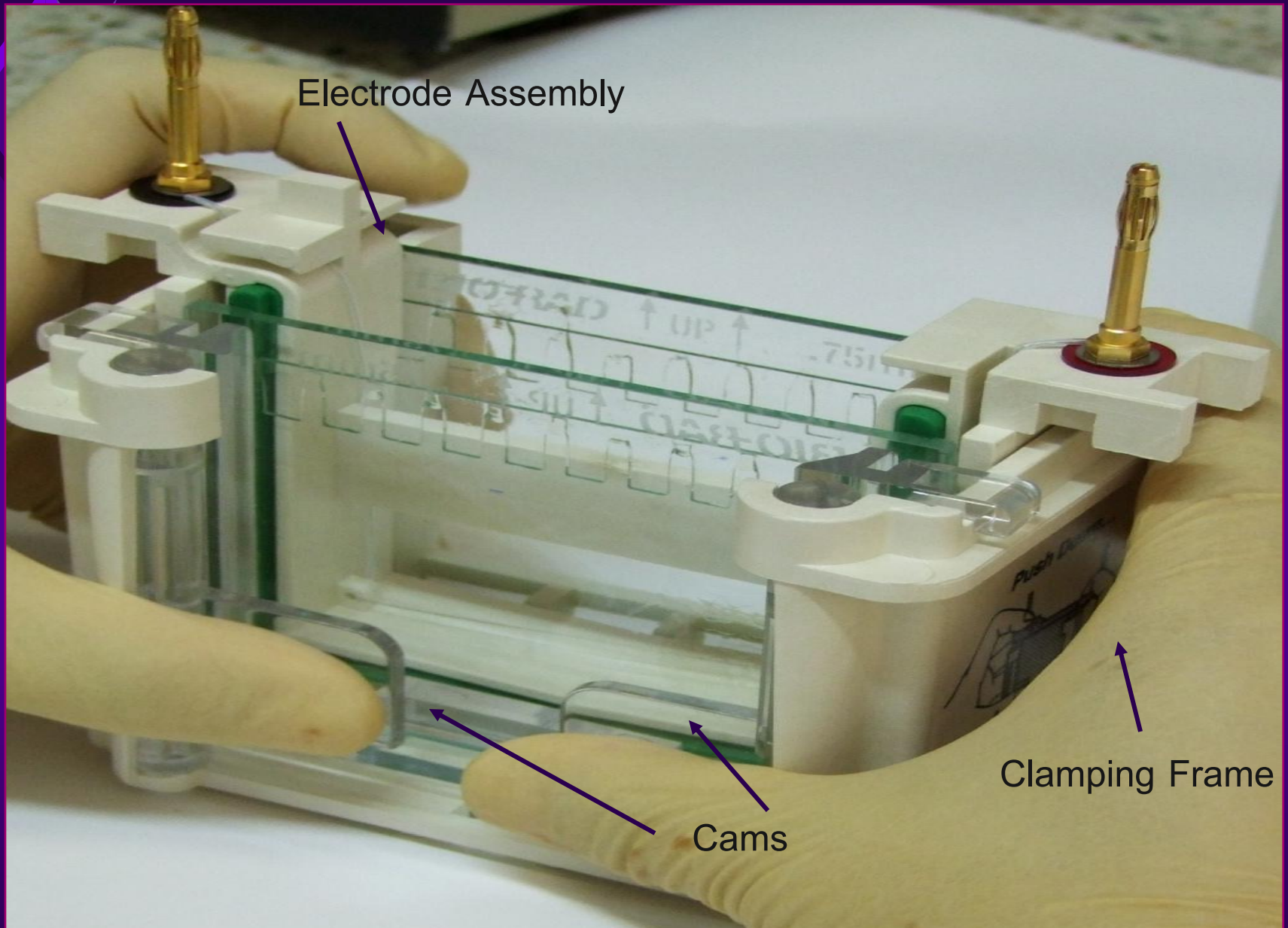
Electrode Assembly



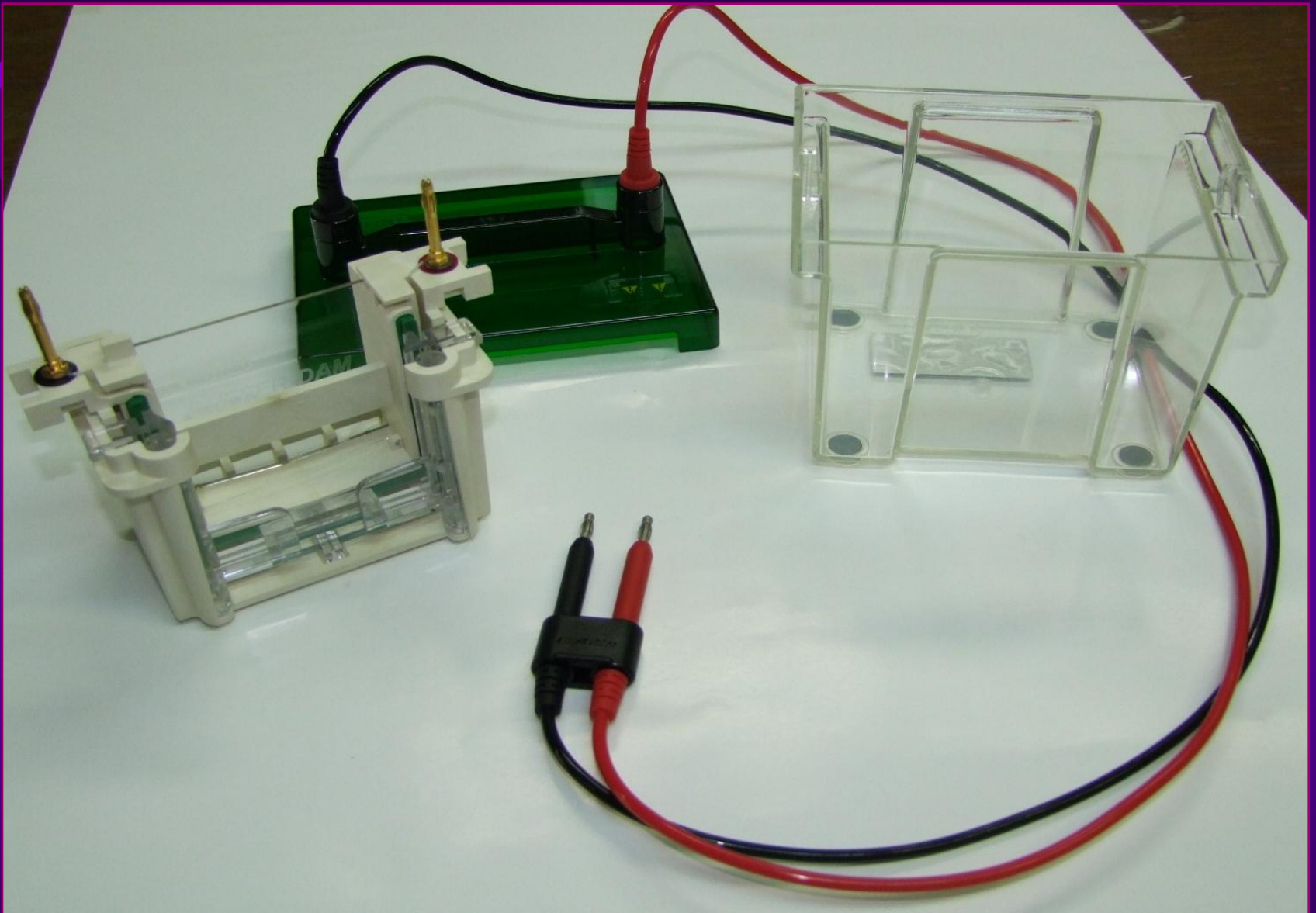
Clamping Frame



Inner Chamber Assembly



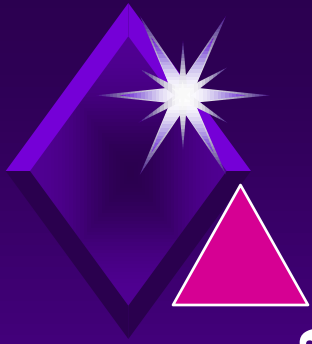
Inner Chamber Assembly



Inner Chamber Assembly และ Mini Tank



เครื่อง power supply



ขั้นตอนการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสสำหรับ

โปรตีนแบบ SDS (SDS-PAGE)

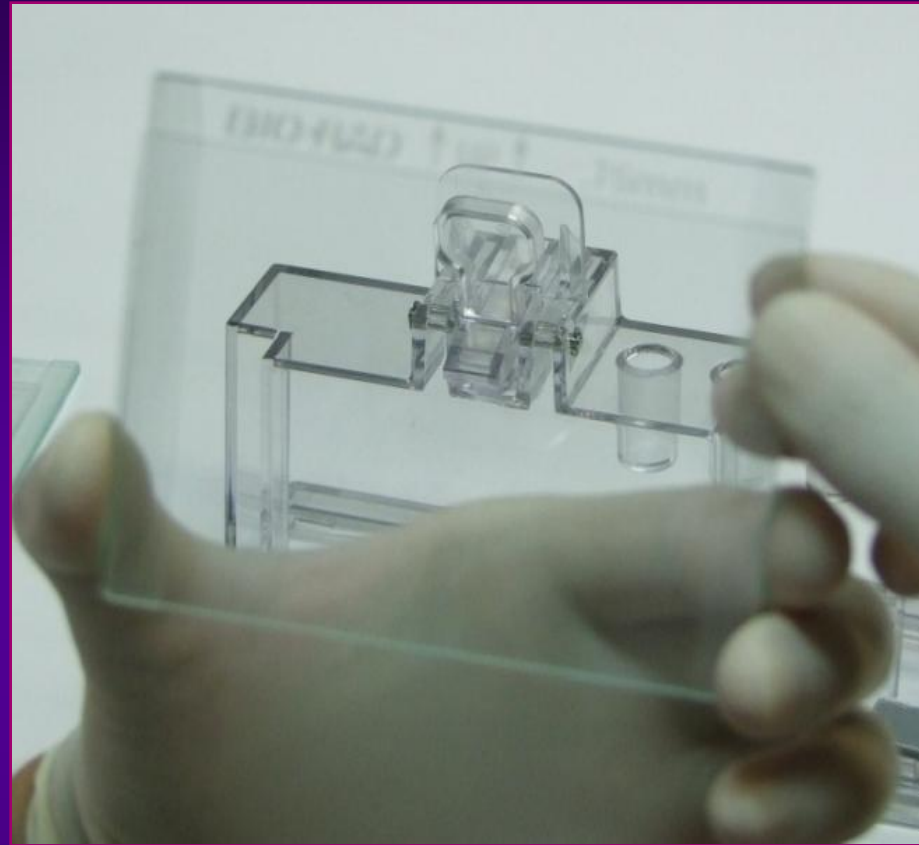
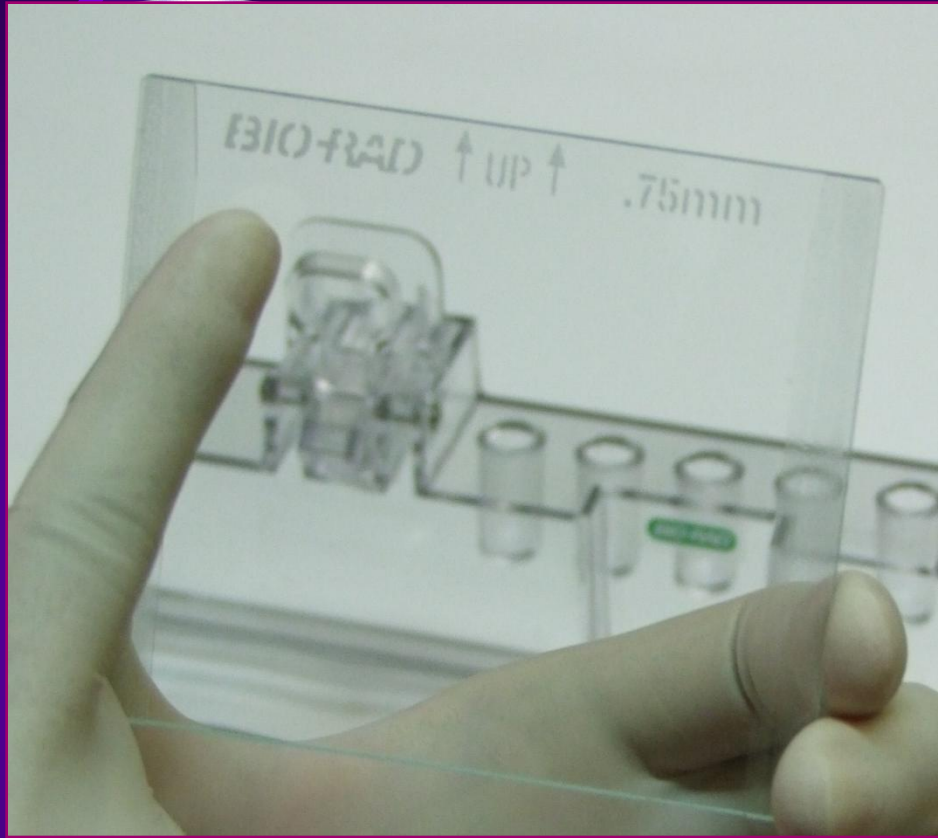
ในเจลระบบไม่ต่อเนื่อง (Discontinuous Gel)

ในแนวดิ่ง (Vertical)

1. Glass Cassette and Casting Stand Assembly



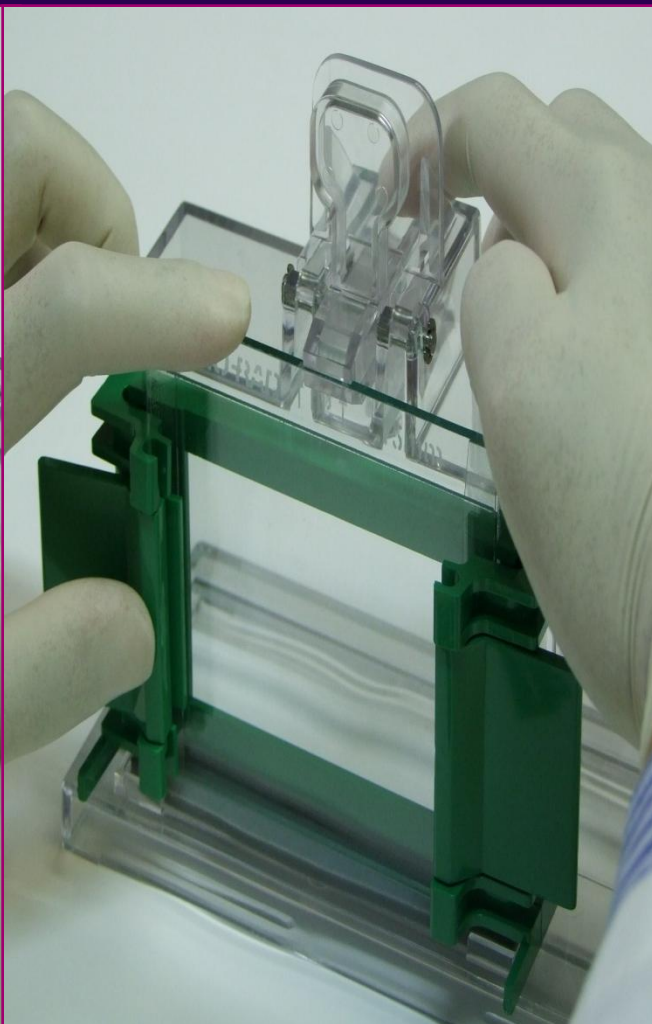
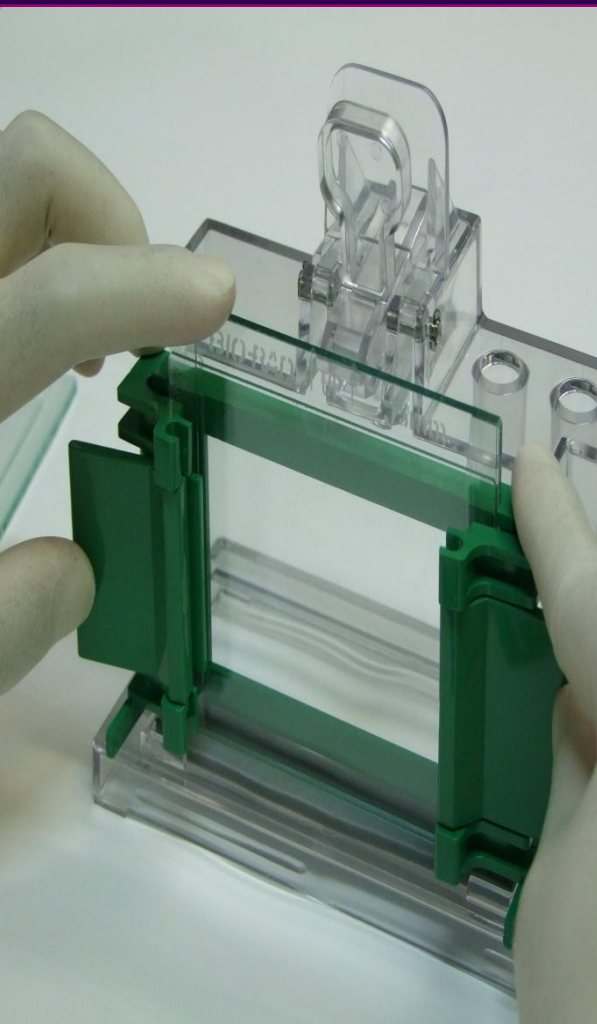
ทำความสะอาดแผ่นกระจก (glass plates) ที่วาง (casting stand)
กรอบวาง (casting frames) ให้สะอาดและแห้งก่อนทำการประกบแผ่นกระจก



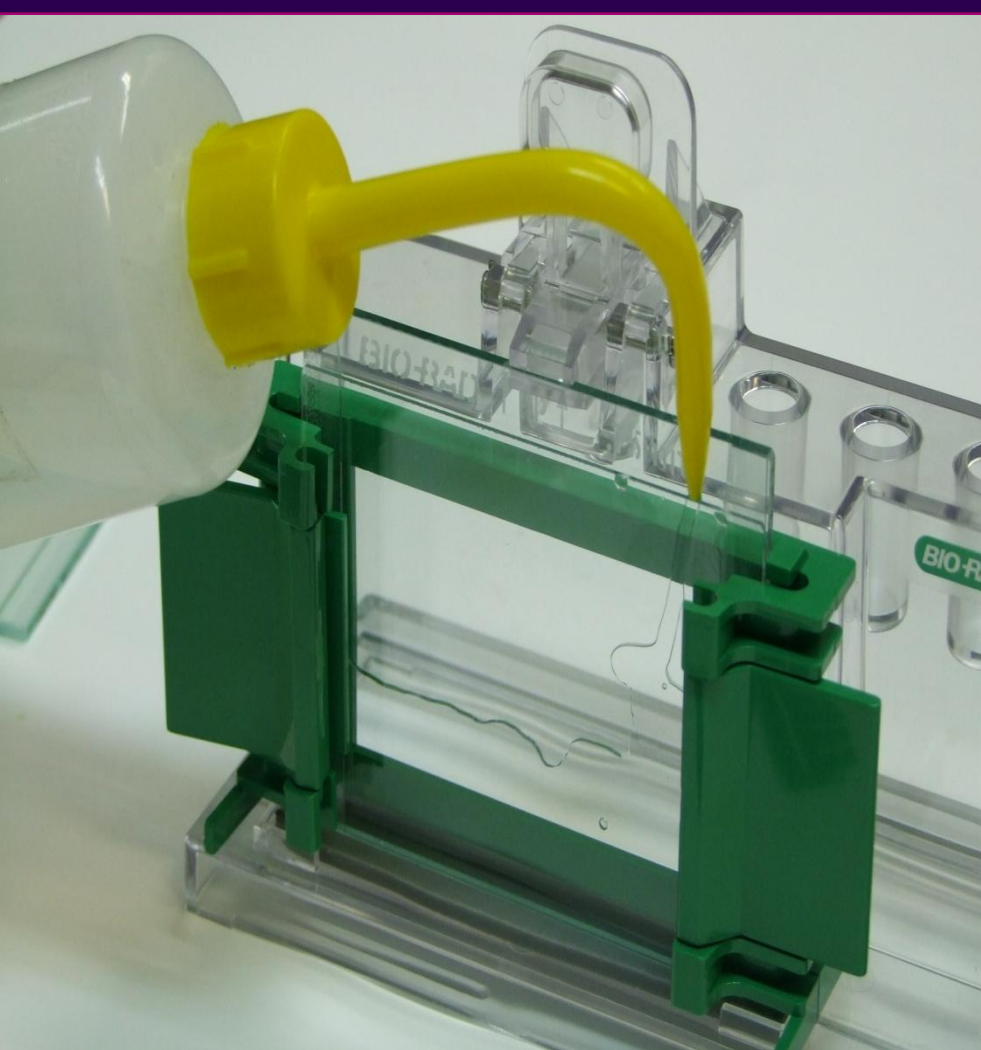
ประกบแผ่นกระจก 2 แผ่น โดยวางกระจกแผ่นสั้นไว้บน spacer plate (มีความหนา 0.75 mm) ตั้งแผ่นกระจกที่มีลูกศรขึ้นไว้ด้านบน



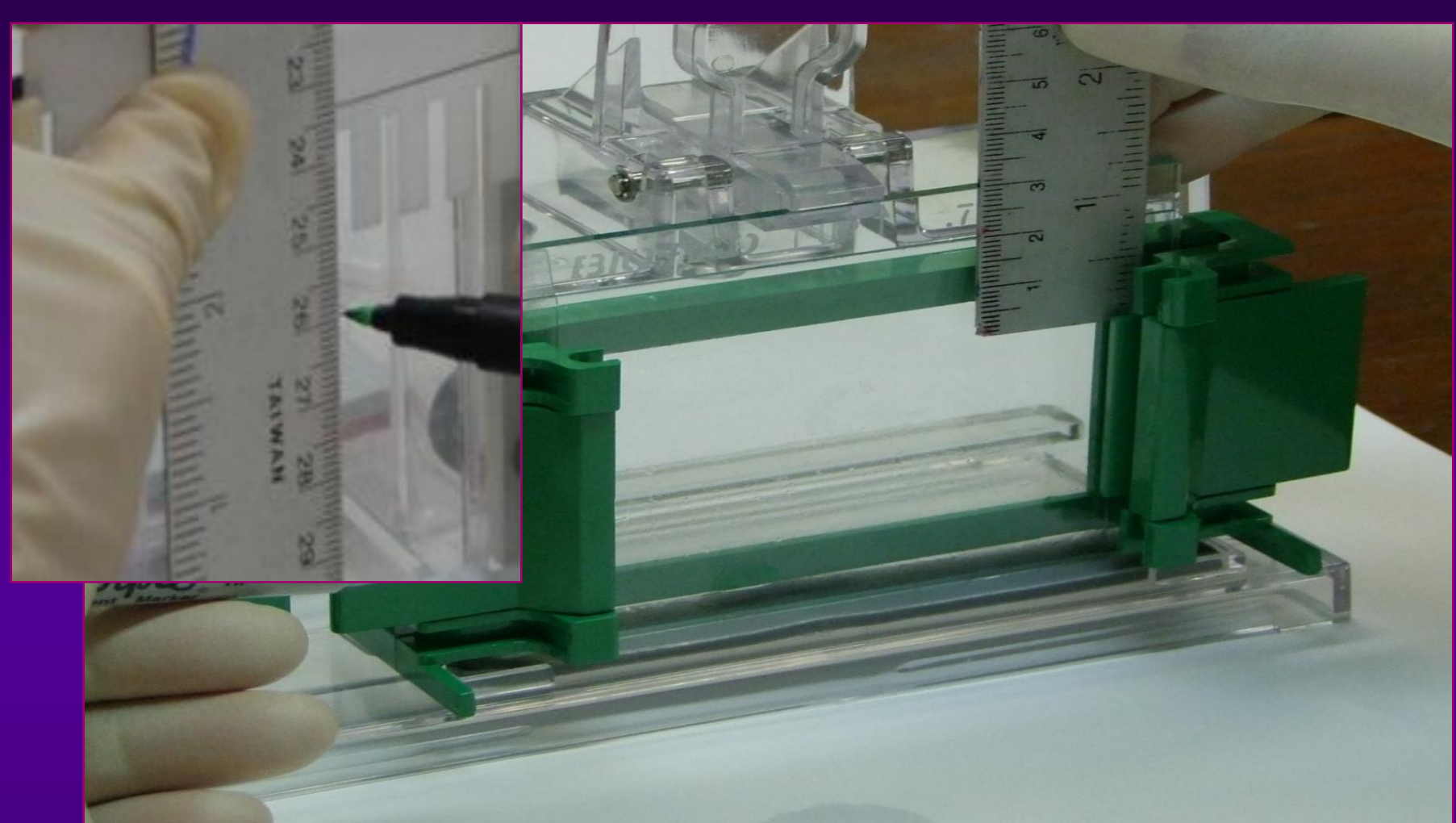
นำแผ่นกระจกทั้ง 2 แผ่น วางลงใน Casting Frame โดยวางแผ่นสั้น (Short Plate) ไว้ด้านหน้า Casting Frame ให้ปลายแผ่นกระจกทั้งสองเสมอกันเพื่อป้องกันการรั่ว จากนั้นค่อยๆ กดติดด้วย Pressure Cams ด้วยความระมัดระวัง เพราะกระจกอาจแตกจากการประกบไม่เข้ารูป



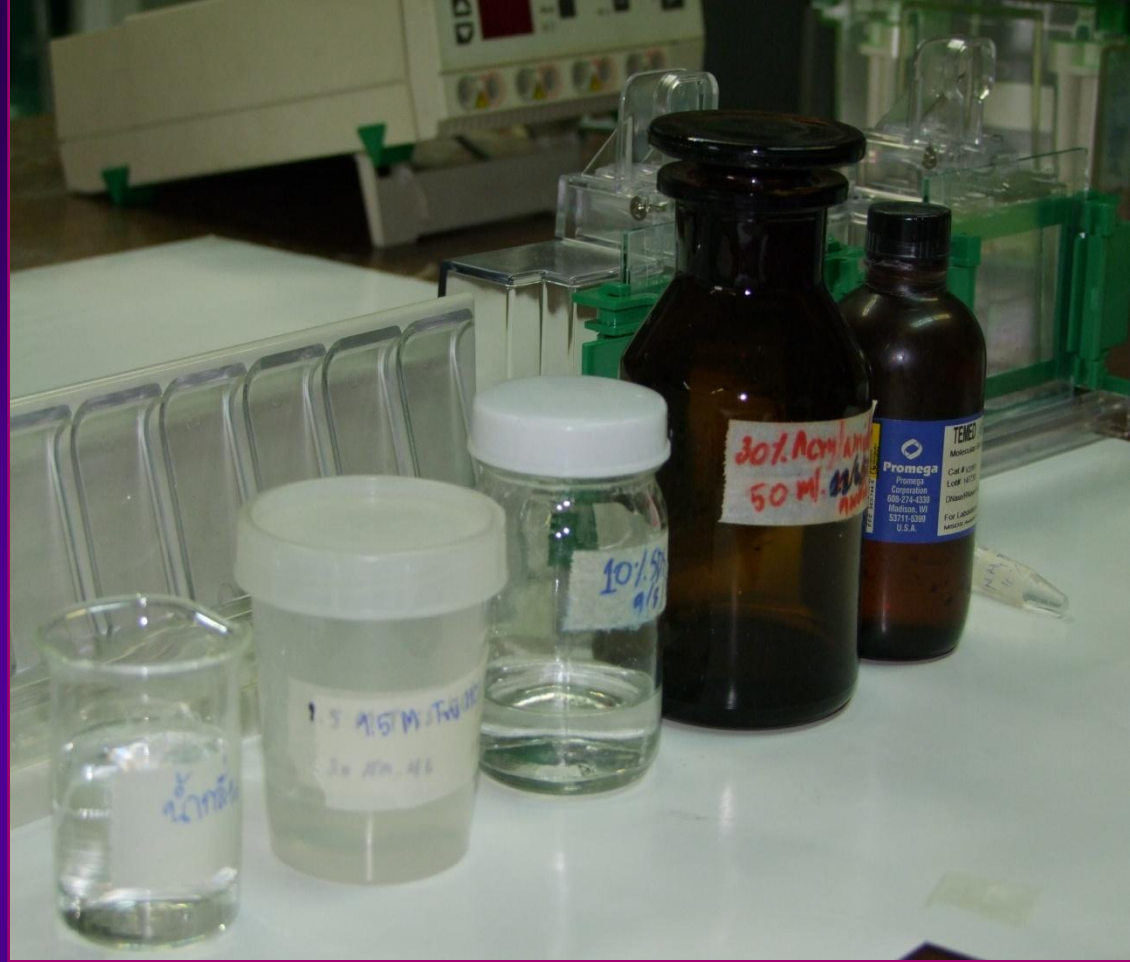
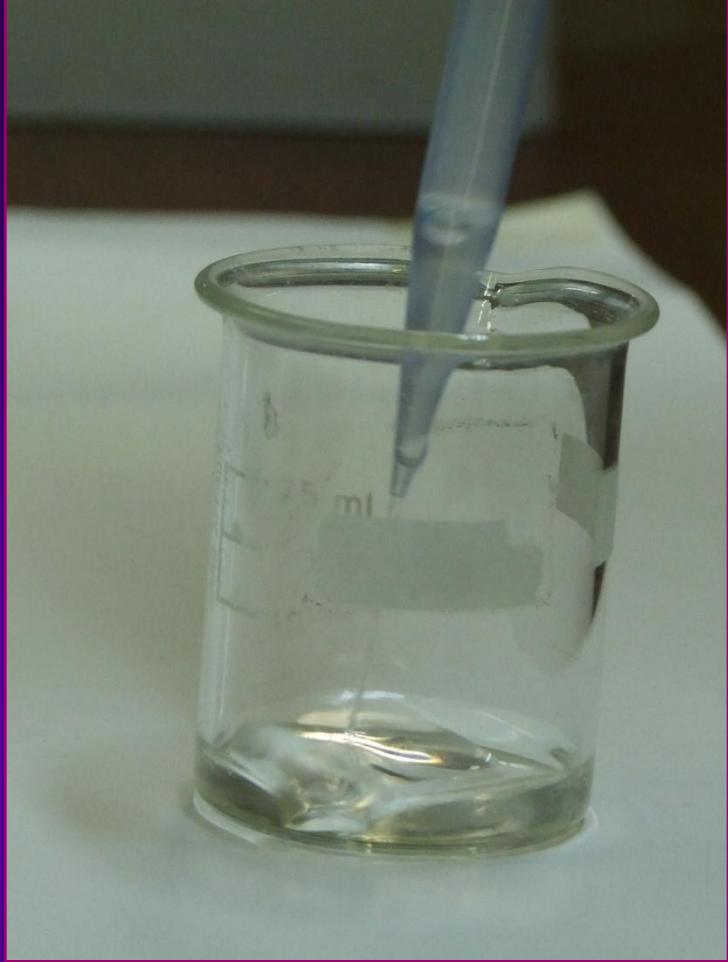
นำ gel cassette assembly ที่ประกอบใน casting frame วางบน casting stand ที่มี gray casting stand gasket รองอยู่ด้านล่าง โดยกดส่วน spring loaded lever ให้ gel cassette assembly แนบสนิทและตั้งฉากกับ casting stand



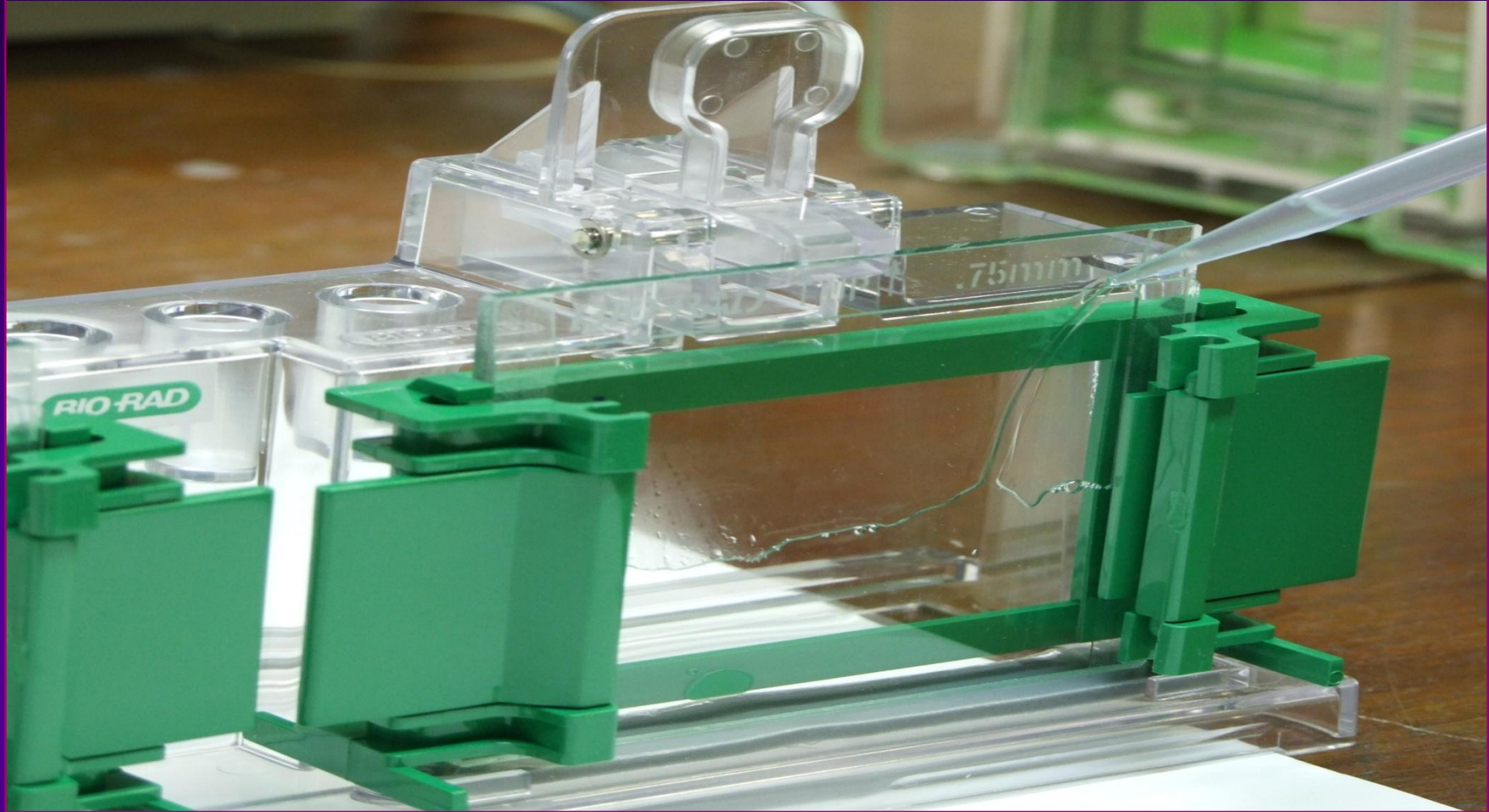
ควรใช้การรั่วของแผ่นกระจก โดยใช้ น้ำกลั่นทดสอบการรั่ว
ของแผ่นกระจก ทิ้งไว้ประมาณ 5-10 นาที ถ้ารั่วจะมีการไหล
ของน้ำออกจากแผ่นกระจก



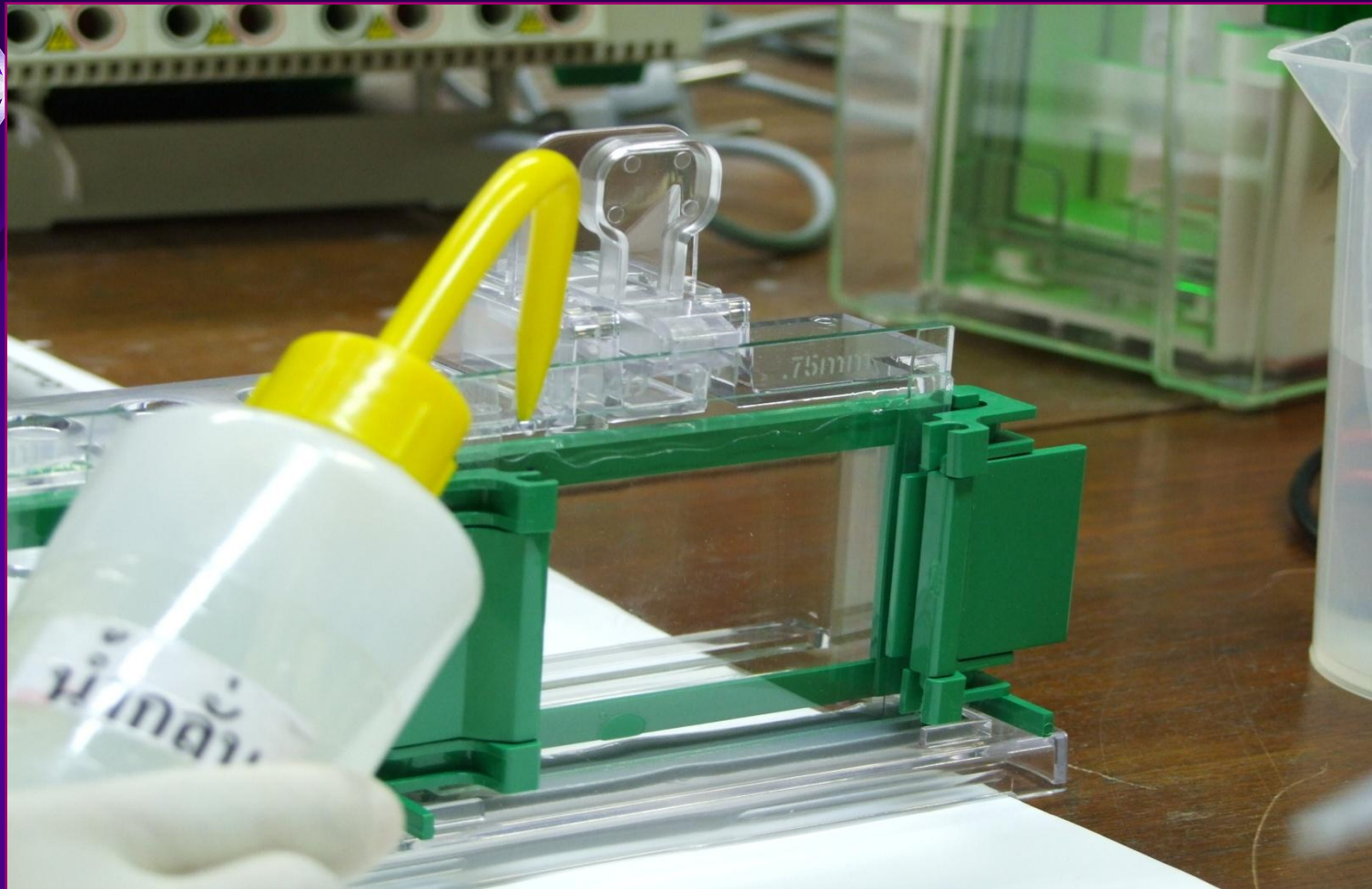
นำ comb มาเสียบในช่องว่างระหว่างแผ่นกระจก ใช้ไม้บรรทัดวัดระดับความสูงของส่วน separating gel โดยให้มีความสูงห่างจากปลายชี้ของ comb 1 cm ทำเครื่องหมายไว้ จากนั้นนำ comb ออก



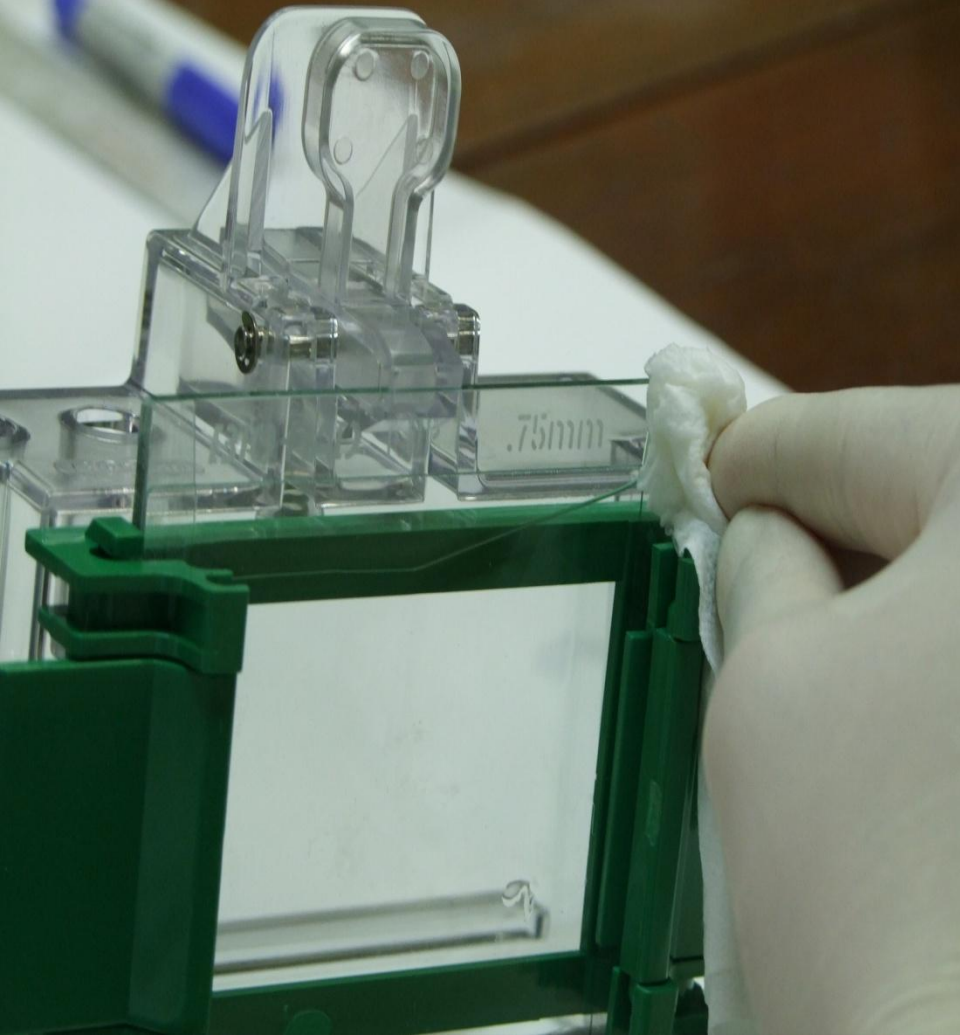
ผสมสารละลายเตรียม polyacrylamide gel ส่วน separating gel ลงในบีกเกอร์ ซึ่งประกอบด้วย distilled water, 1.5 M Tris HCl pH 8.8, 10% SDS, 30% acrylamide-bis แนะนำให้ใช้ vacuum เพื่อ degas อย่างน้อย 15 นาที ก่อนเติม 10% ammonium persulfate (ควรเตรียมใหม่เสมอ) และ TEMED



เติม ammonium persulfate และ TEMED ผสมให้เข้ากันเบาๆ ดูดสารละลาย
ใส่ลงในช่องว่างระหว่างแผ่นกระจก ระวังอย่าให้มีฟองอากาศจนกระทั่งมี
ความสูงเท่ากับระยะที่ทำเครื่องหมายไว้สำหรับส่วน separating gel



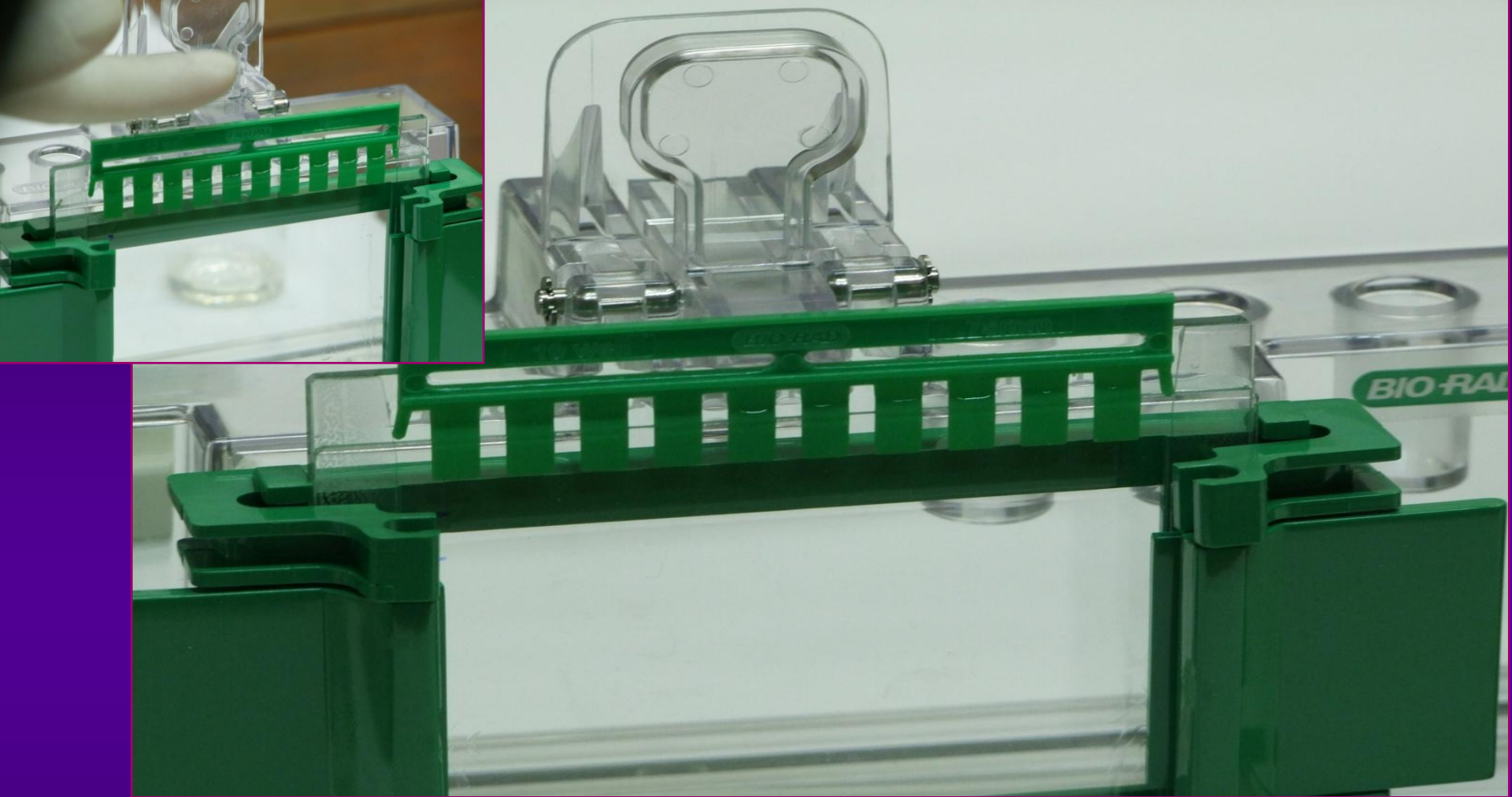
เมื่อส่วนของ separating gel มีความสูงของ polyacrylamide gel เท่ากับระยะที่ทำเครื่องหมายไว้ เติมน้ำกลั่น (distilled water) เบบนบนผิวหน้าเจล เพื่อให้ผิวหน้าเจลเรียบ



ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 45 นาที-1 ชั่วโมง เทน้ำกลั่นที่ปิดผิวหน้าของเจลทิ้ง
สังเกตที่ผิวหน้าเจลจะเรียบสม่ำเสมอ



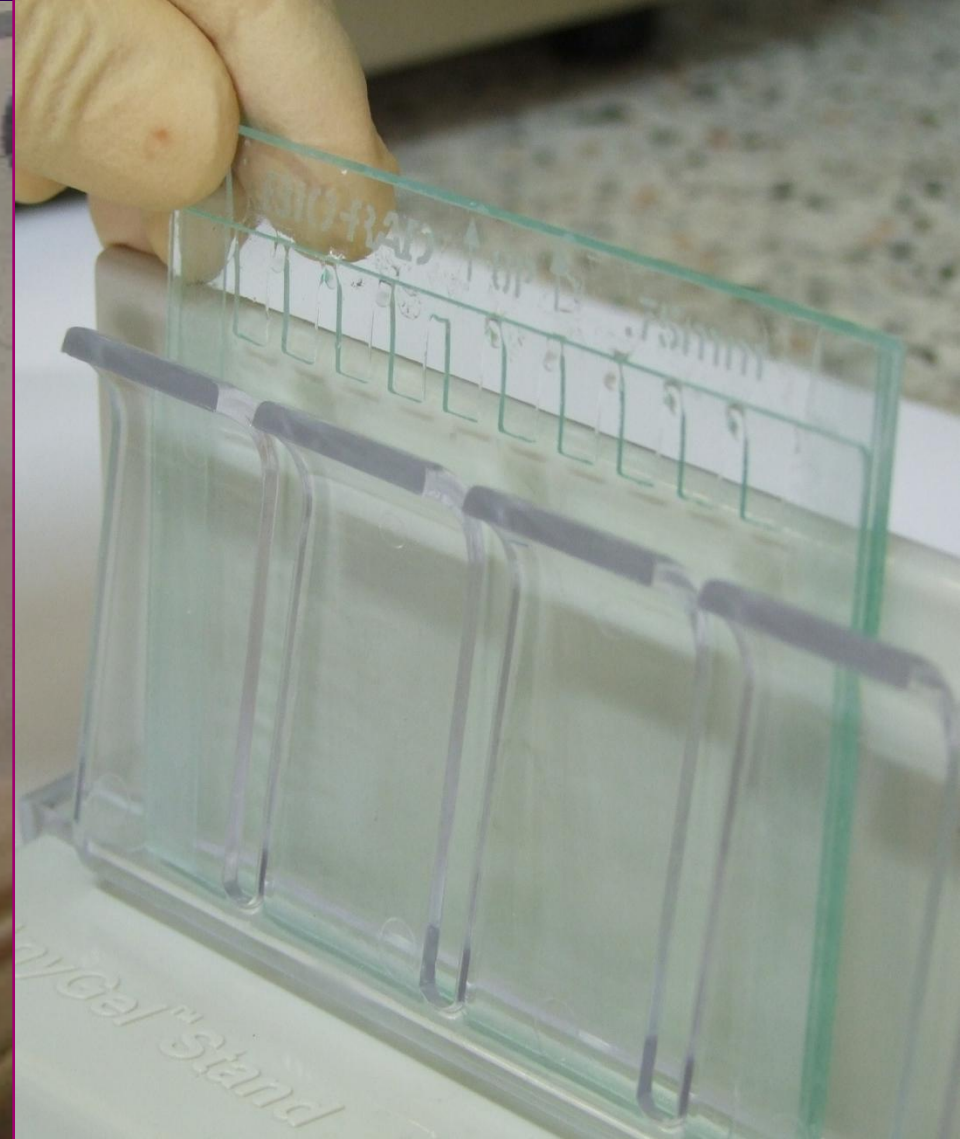
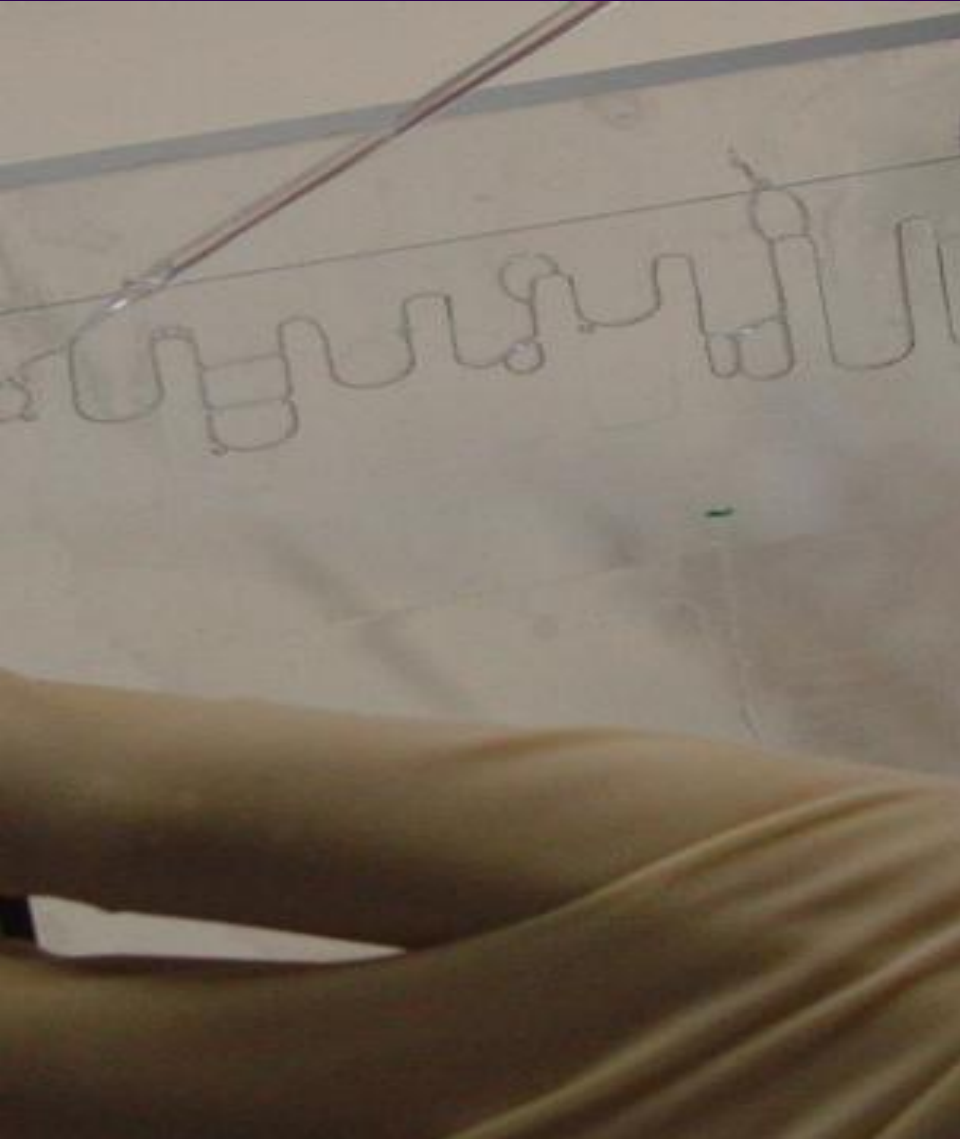
ดูดสารละลายเตรียม polyacrylamide gel ส่วน stacking gel ลงในบีกเกอร์ ซึ่งประกอบด้วย distilled water, 0.5 M Tris HCl pH 6.8, 10% SDS, 30% acrylamide-bis แนะนำให้ใช้ vacuum เพื่อ degas อย่างน้อย 15 นาที ก่อนเติม 10% ammonium persulfate (ควรเตรียมใหม่เสมอ) และ TEMED



หลังจากใส่ polyacrylamide gel ส่วน stacking gel ในช่องว่างระหว่างแผ่นกระจก จนกระทั่งท่วมพื้นของ comb วาง comb ให้ตรง อย่าให้มีฟองอากาศ ตั้งทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว (polymerize) ประมาณ 30-45 นาที

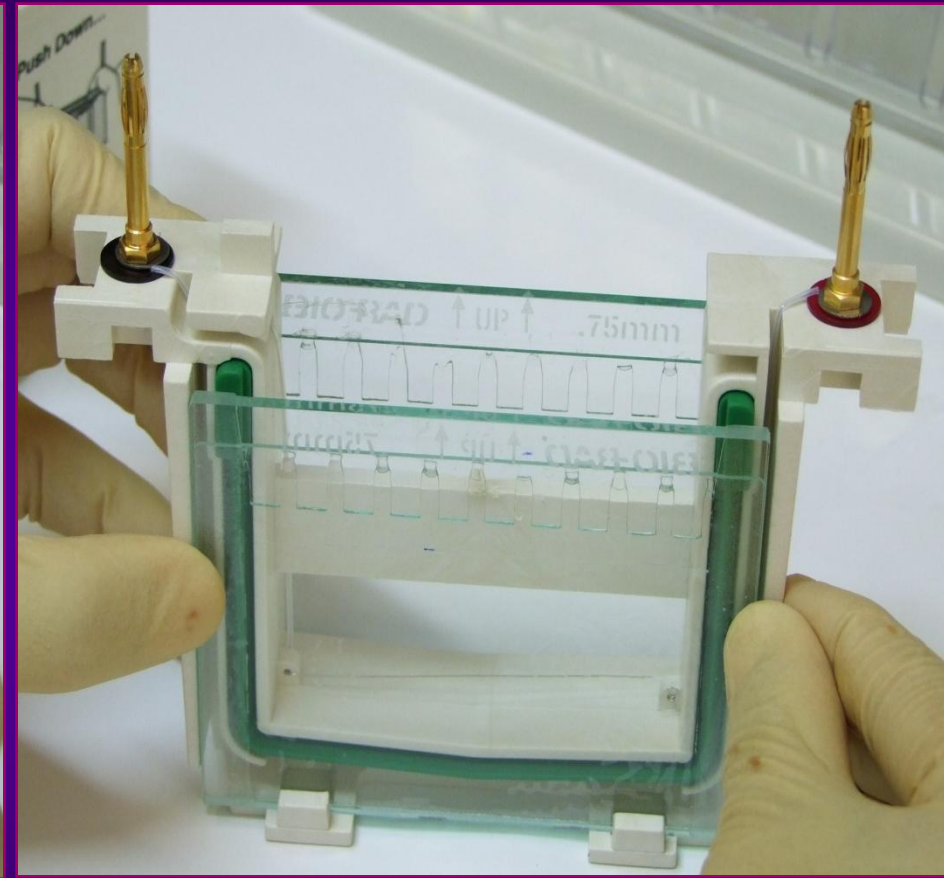
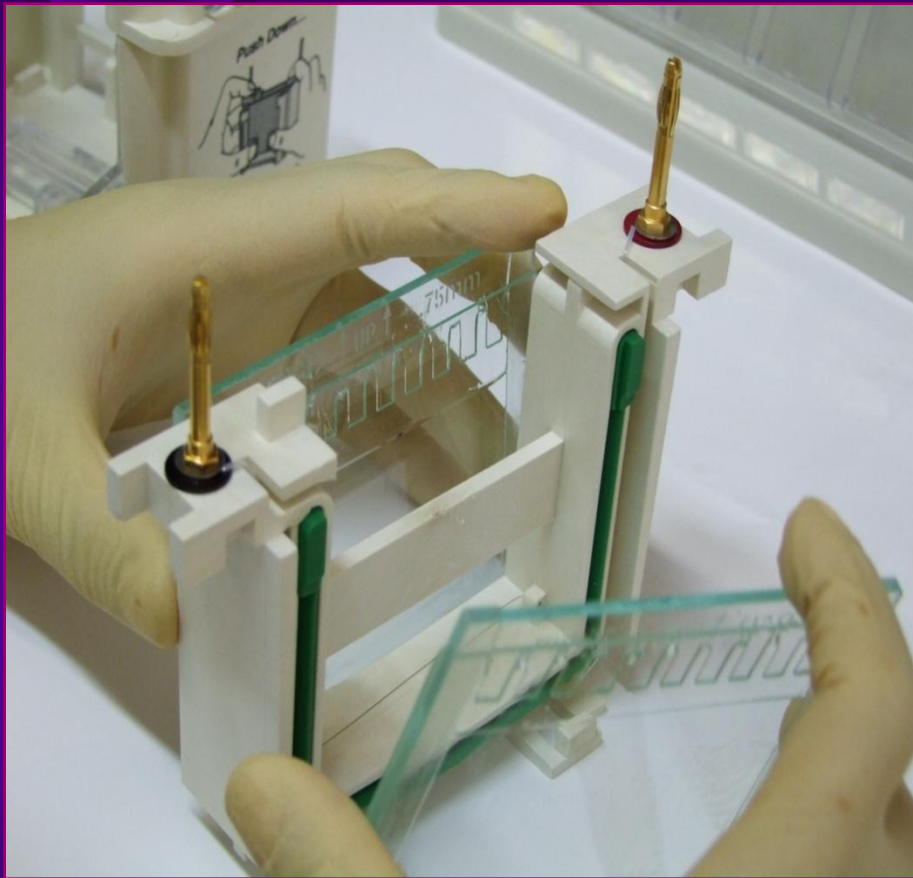


เมื่อเจลแข็งตัวแล้ว ดึง comb ออกช้าๆ

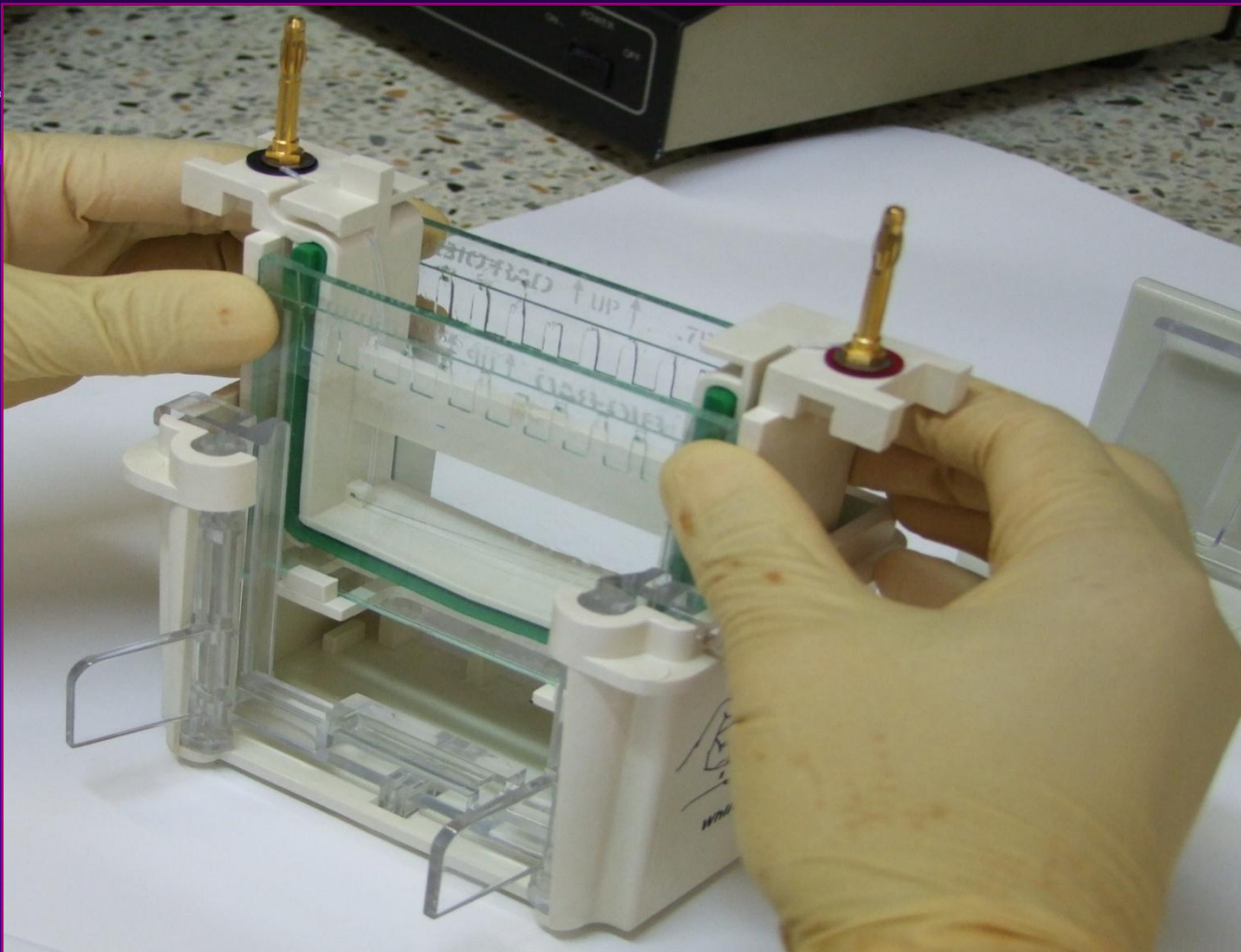
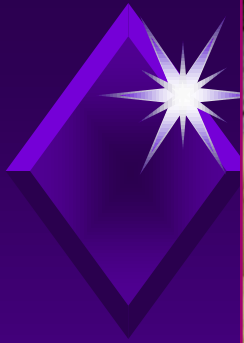


ล้าง sample well ด้วยน้ำกลั่นหรือ running buffer สามารถวางแผ่นกระจกพักไว้ที่ stand ก่อนได้ ในกรณีทำเจลหลายแผ่น

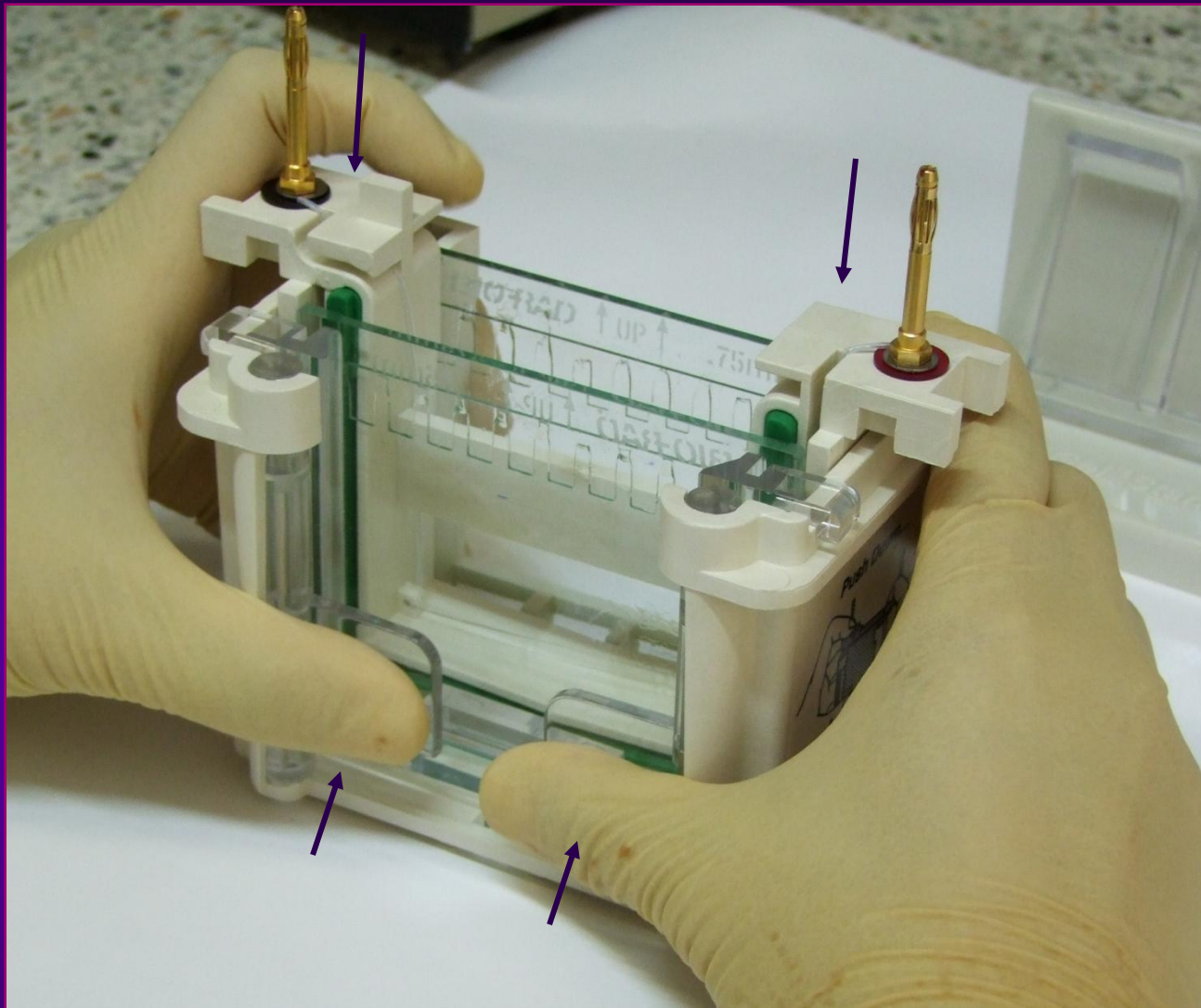
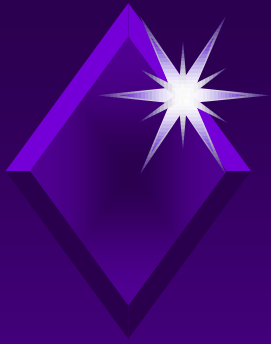
2. Mini-PROTEAN 3 Electrophoresis Module Assembly



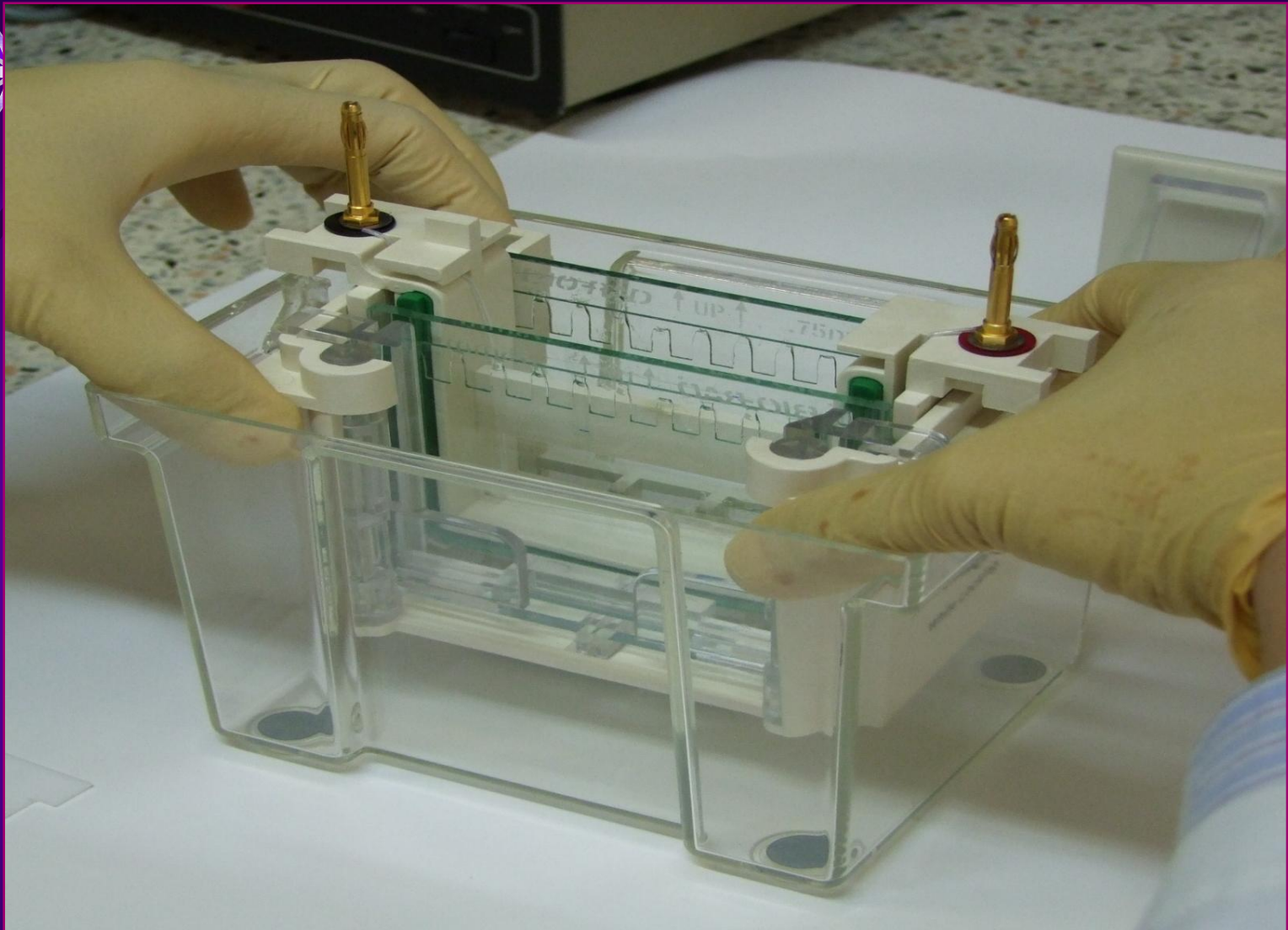
นำ Gel Cassette Assemblies ออกจาก Casting Stand แล้วนำไปต่อเข้ากับ Electrode Assembly โดยหันด้าน Short Plate ของ Gel Cassette Sandwich เข้าด้านในตรงส่วนของ U-shaped Gaskets



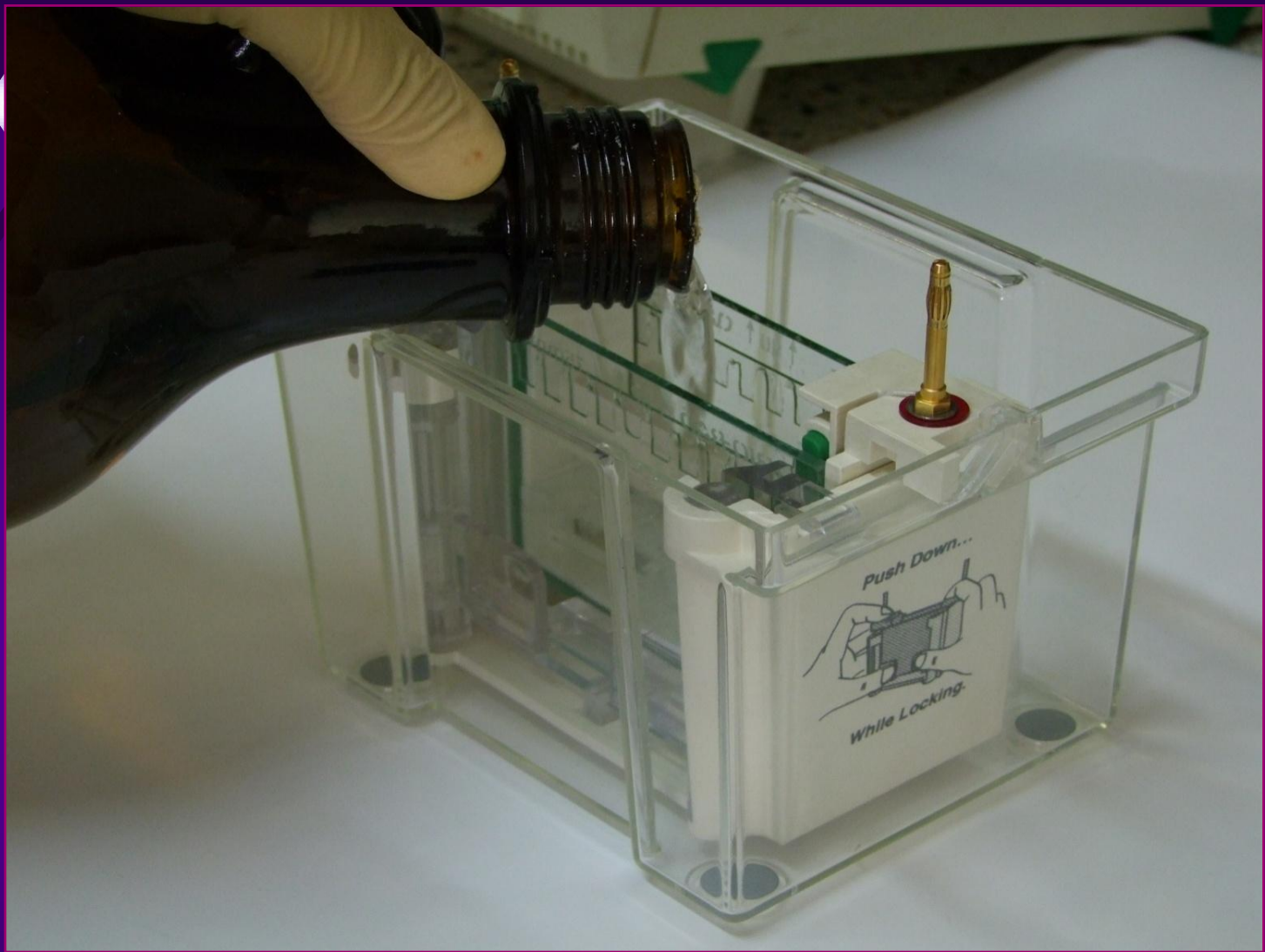
นำ gel cassette sandwiches และ electrode assembly เดือนใส่เข้า
ไปใน clamping frame



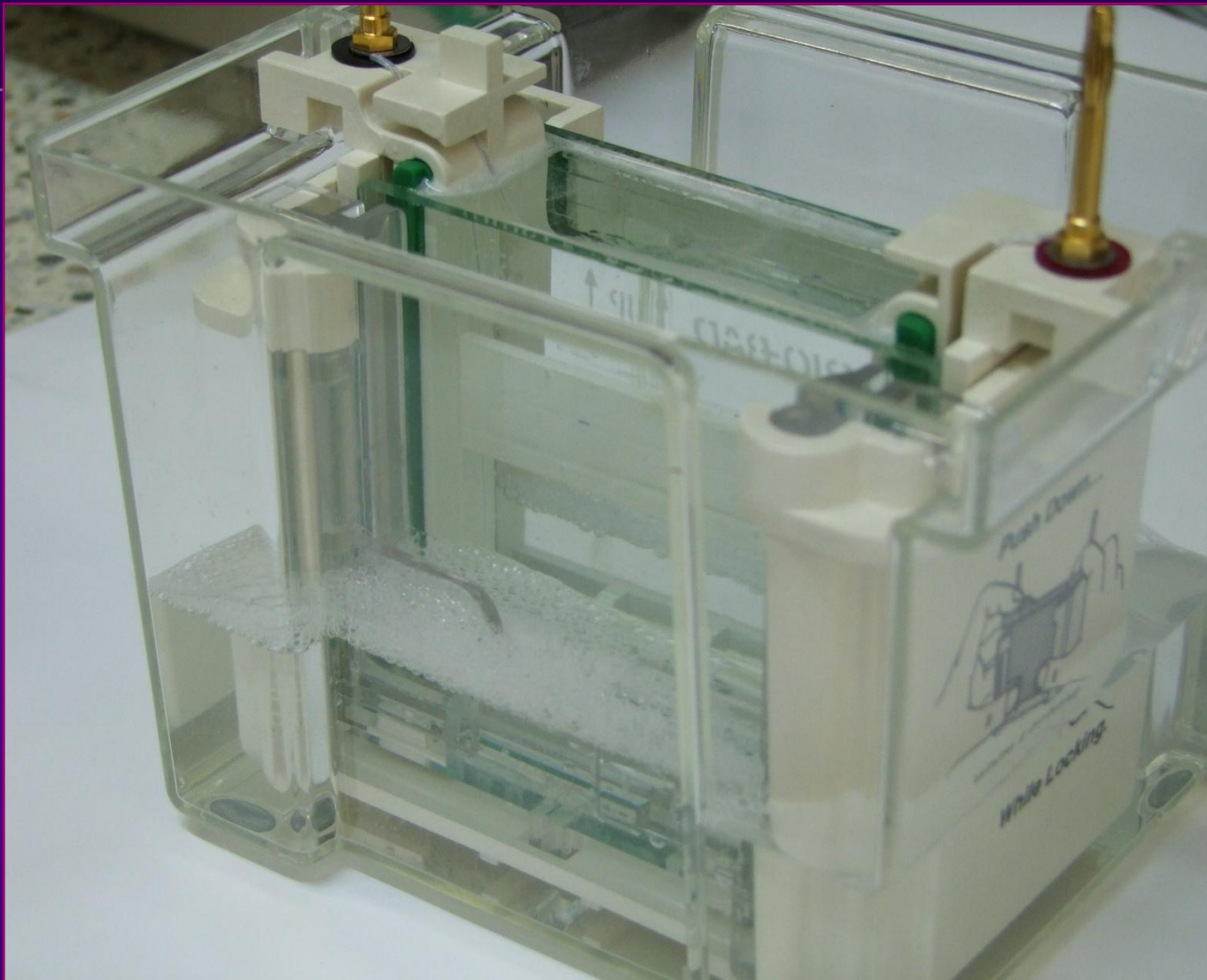
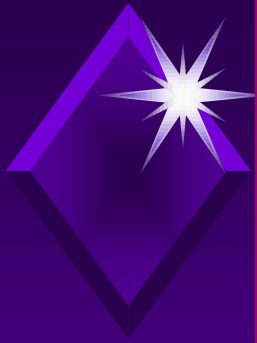
กด electrode assembly ลงใน clamping frame พร้อมทั้งกดล็อก
ด้วย cam levers เพื่อประกอบเป็นส่วน inner chamber



นำส่วน Inner Chamber เข้าไปข้างในส่วน Mini Tank



เท running buffer ลงใน upper buffer chamber ประมาณ 125 ml จนกระทั่งถึงระดับกึ่งกลางแผ่นกระจก สังเกตดูว่ามีส่วนของ running buffer รั่วหรือไม่

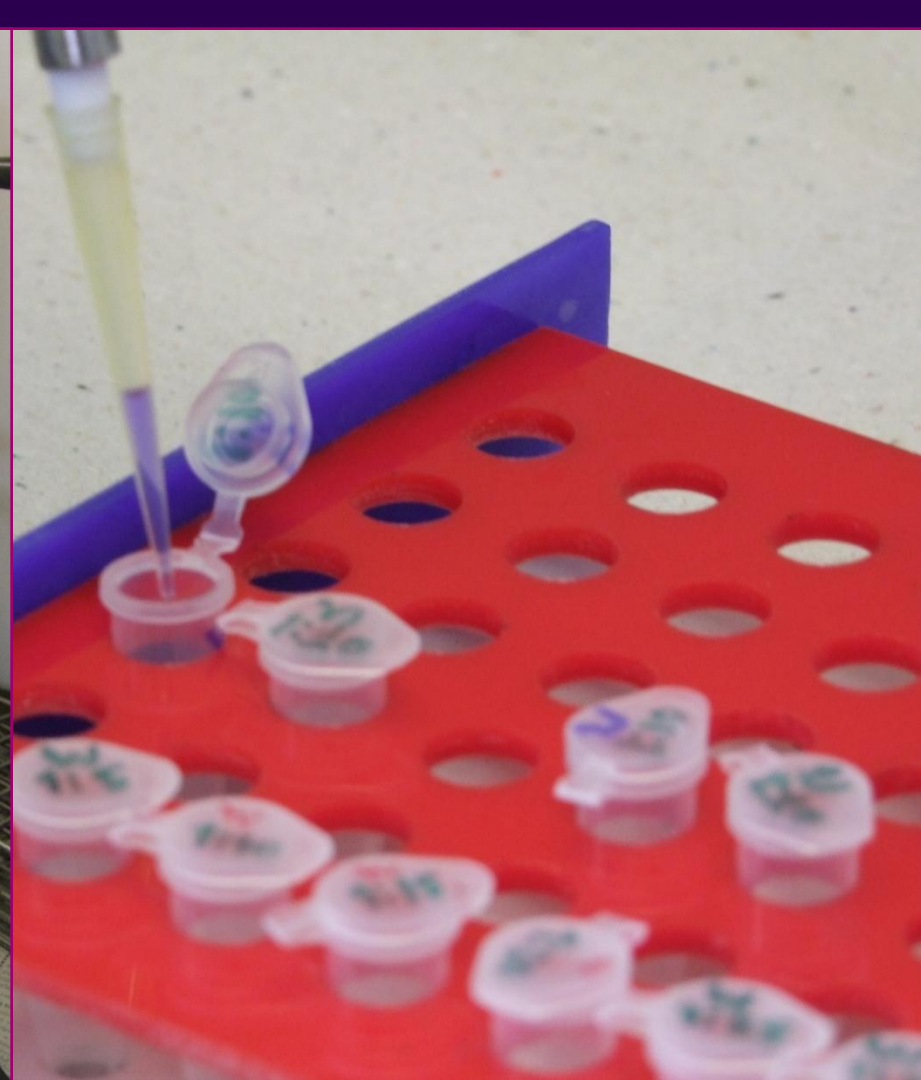


เท running buffer ประมาณ 200 ml ลงใน lower buffer chamber ของ Mini Tank แล้วฟองอากาศออกให้หมด

3. Sample Loading



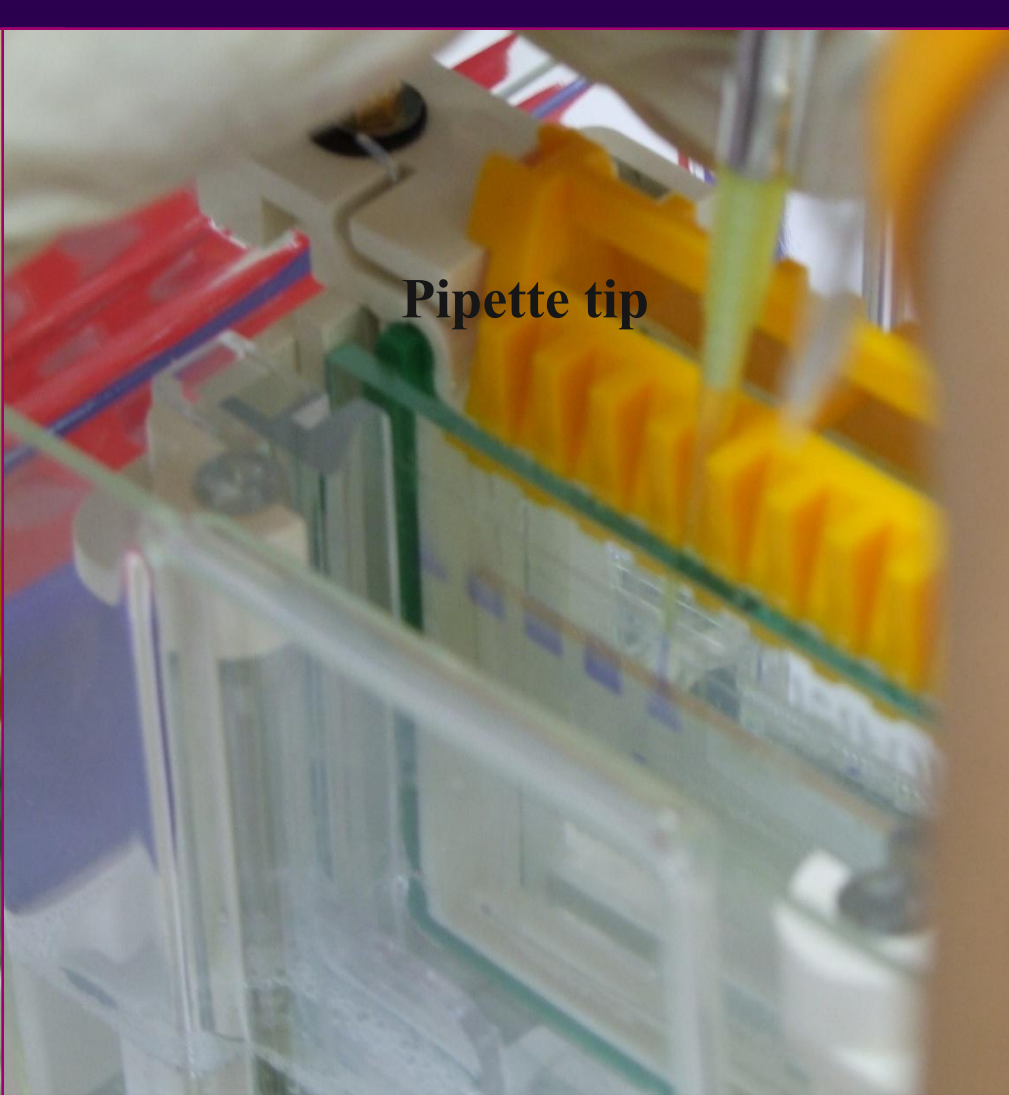
นำ Sample Loading Guide วางระหว่างเจ็ตทั้งสองในส่วนของ Electrode Assembly เพื่อรอการใส่ตัวอย่างต่อไป



ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง : เตรียมสารละลาย standard proteins และ
สารละลายตัวอย่างโดยใส่ sample buffer นำไป heat ที่ 95°C นาน 5 นาที

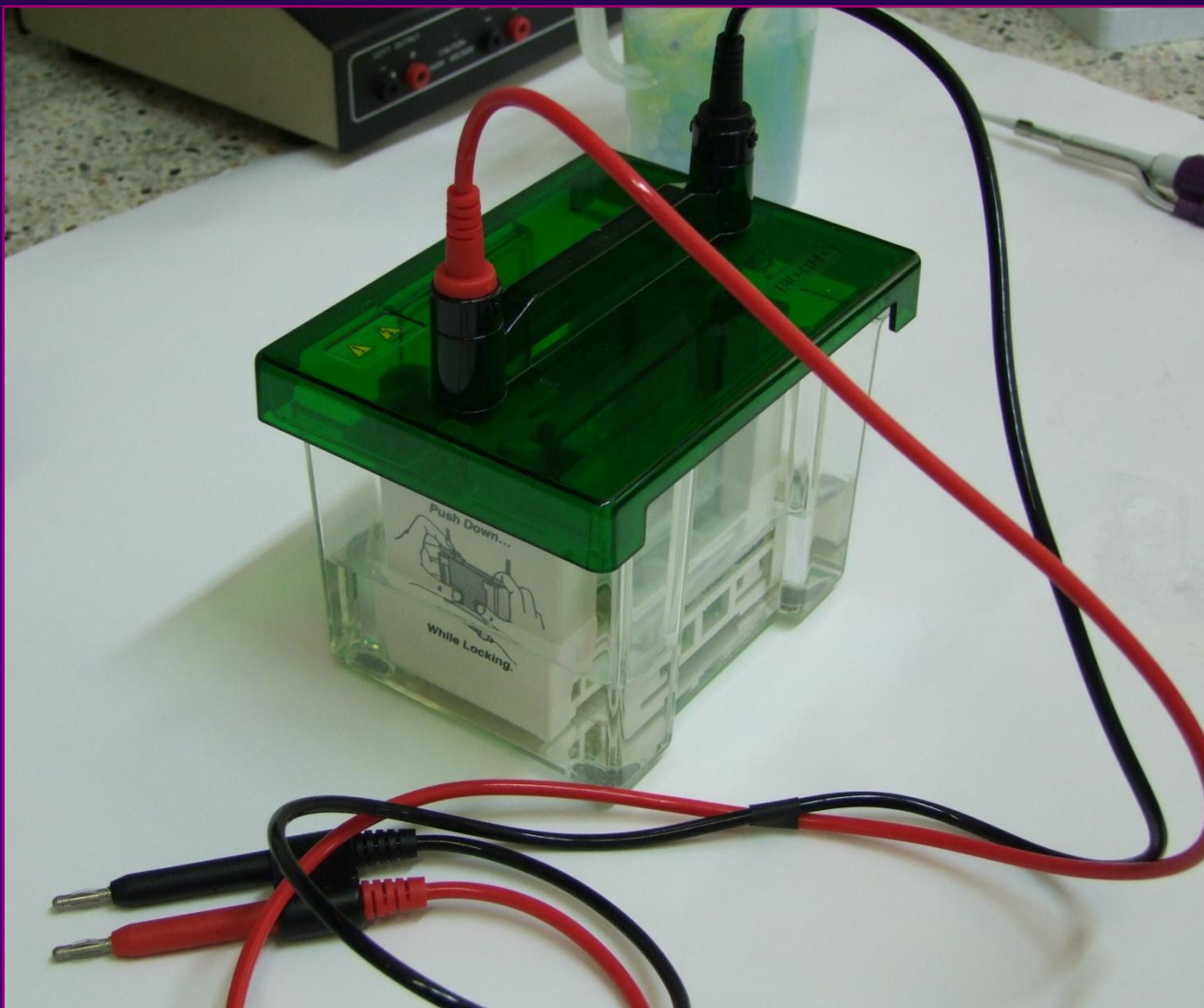
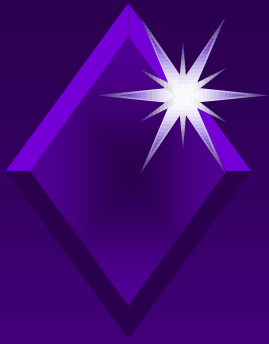
A close-up photograph of a Hamilton syringe being used to load a sample into a multi-well plate. The syringe is white with a yellow plunger and a thin needle. It is positioned over a yellow well in a clear plastic plate. A hand is visible holding the syringe. The background is a red surface with white polka dots.

Hamilton syringe

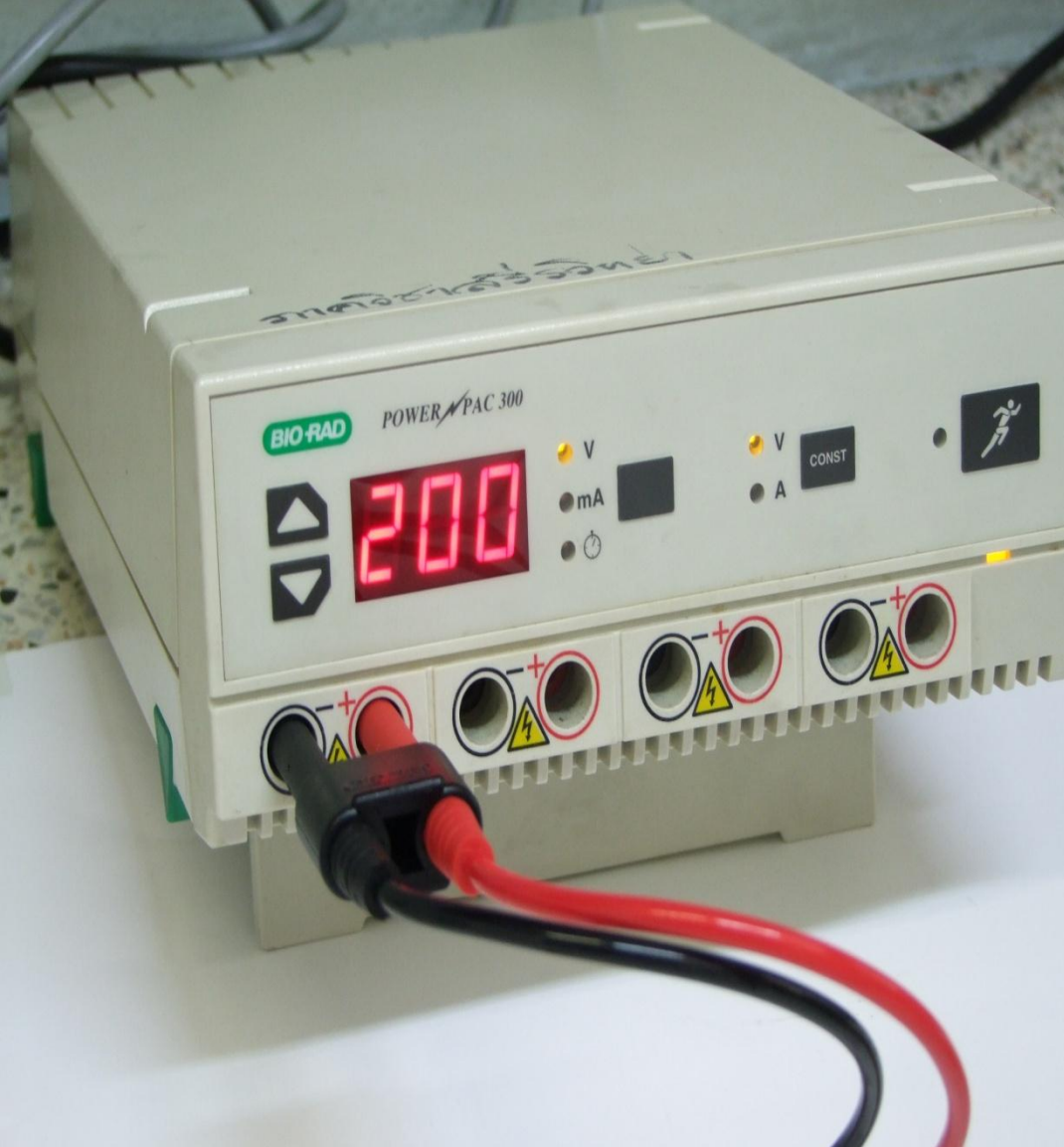
A close-up photograph of a pipette tip being used to load a sample into a multi-well plate. The pipette tip is yellow and is positioned over a yellow well in a clear plastic plate. A hand is visible holding the pipette. The background is a red surface with white polka dots.

Pipette tip

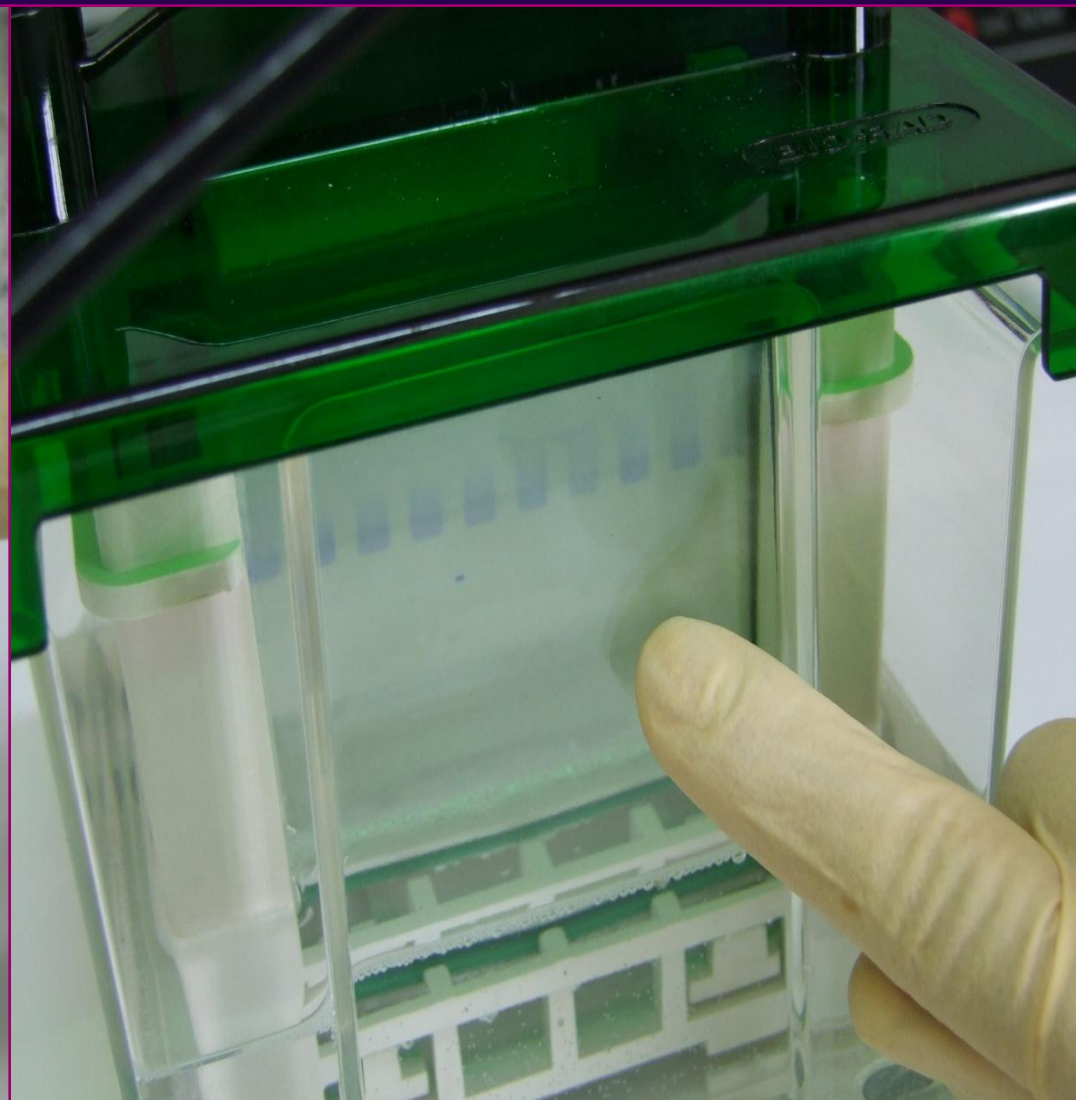
เมื่อสารละลายอุ่นแล้ว ดูดสารละลายประมาณ 5 μ l หยดลงใน sample well ที่มี running buffer ท่วมอยู่ (โปรตีนในสารละลายมีปริมาณเท่า ๆ กัน)



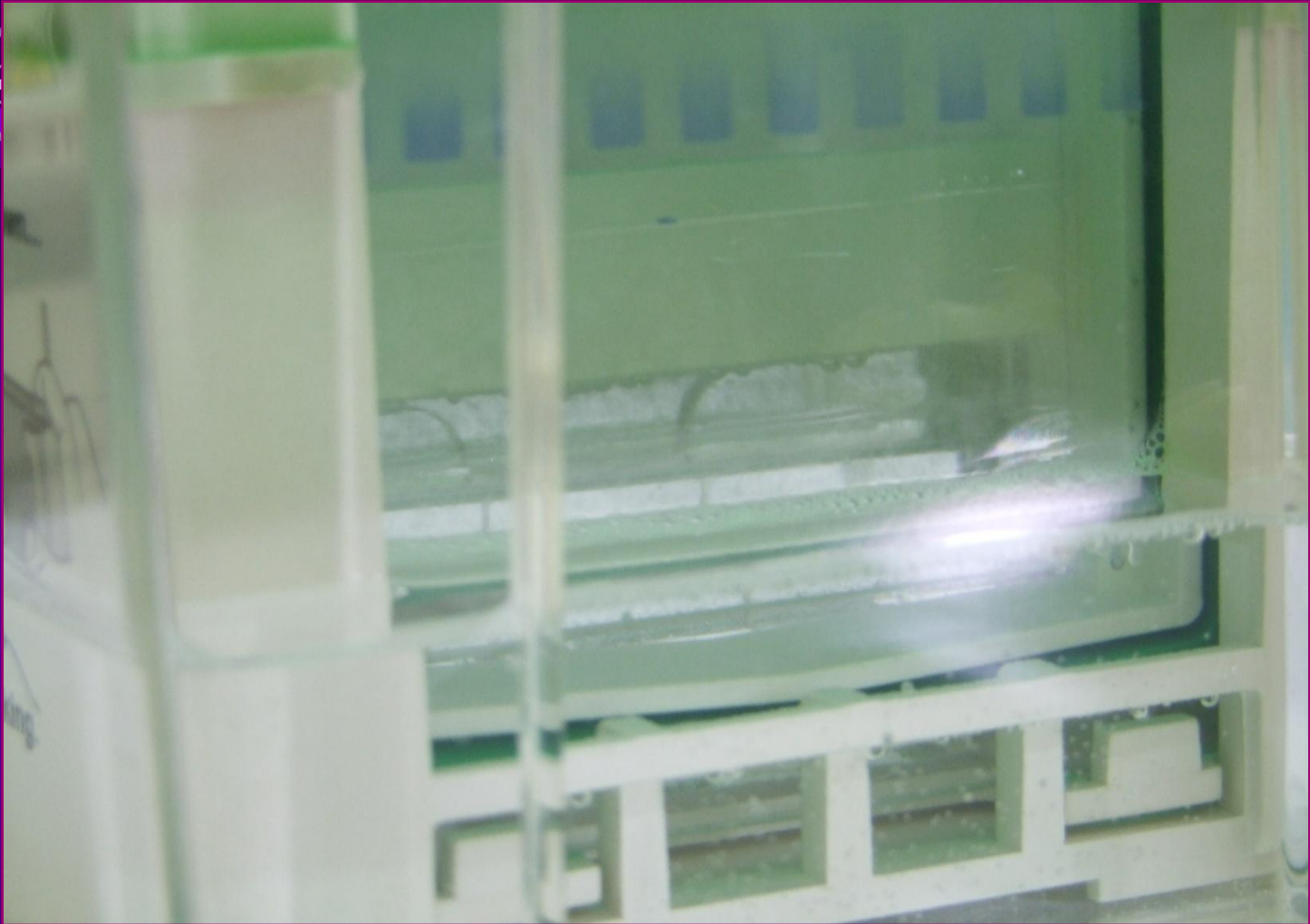
ปิดฝา Lid บน Mini Tank ต่อสายขั้วไฟฟ้าให้สีตรงส่วนของ
Banana Plugs และ Jacks ให้ถูกต้อง



เปิดเครื่อง power supply กำหนดการทำ SDS-PAGE ที่ 200 V 120 mA ต่อ 2 gel นาน 45 นาที



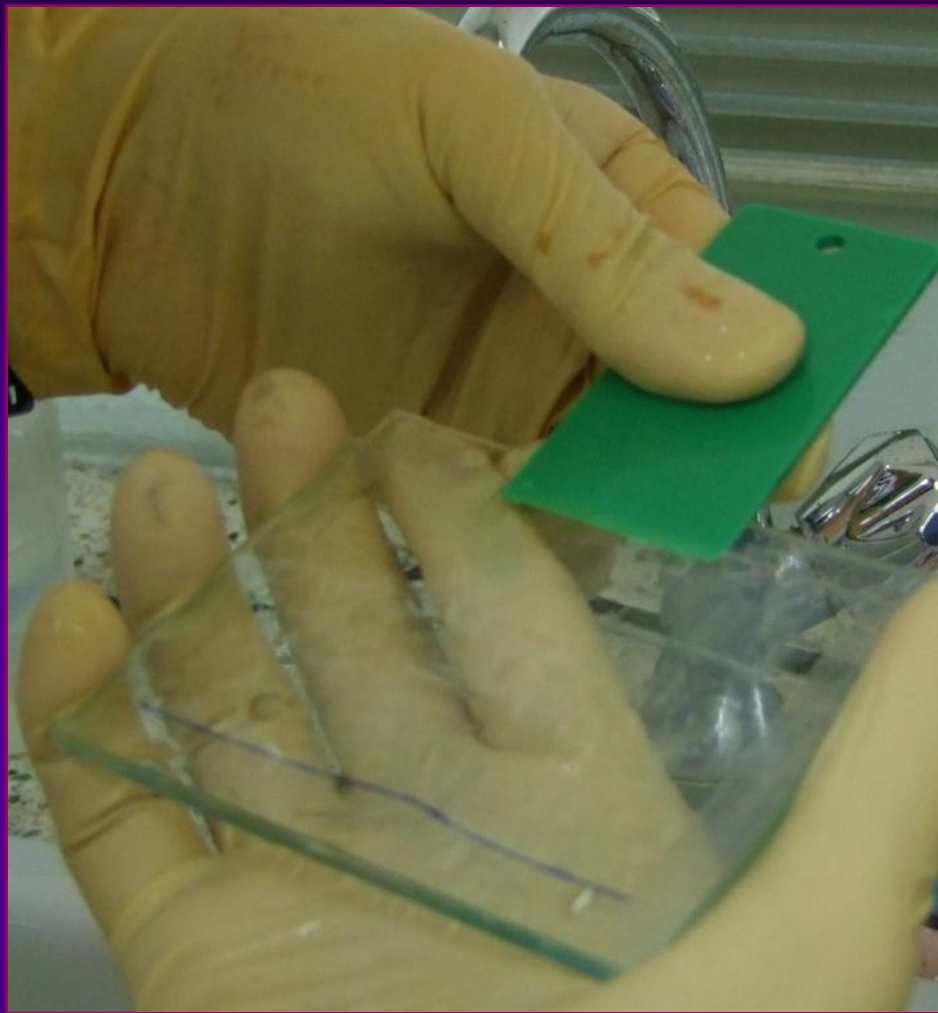
เริ่มต้นการทำ SDS-PAGE สังเกตสี tracking dye เริ่มเคลื่อนที่เป็นแถบ (band)
สีน้ำเงินจากขั้วลบลงสู่ขั้วบวก



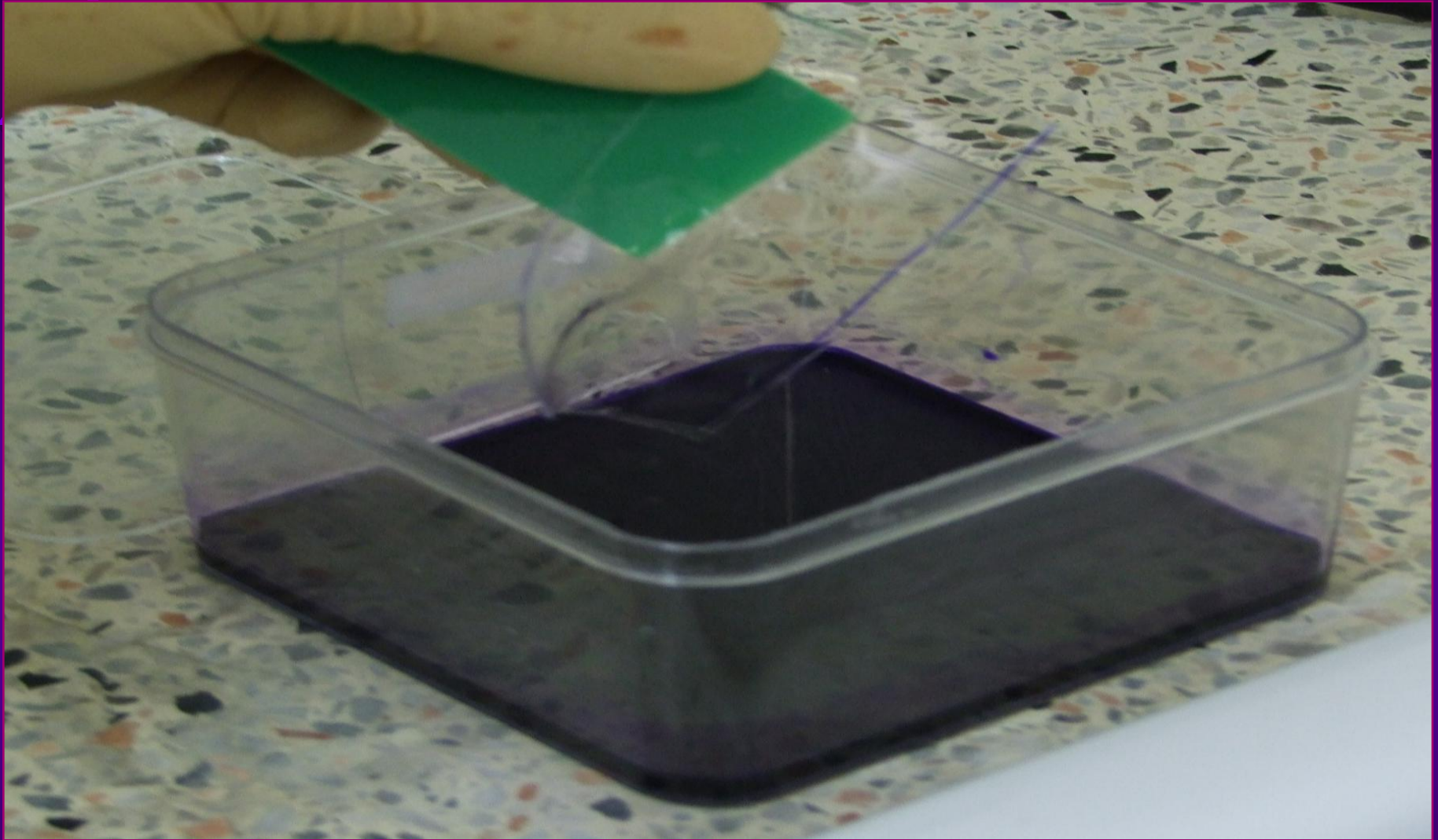
สิ้นสุดการทำ electrophoresis เมื่อ band ของ tracking dye เคลื่อนที่
ห่างจากปลายล่างของ gel ประมาณ 0.5-1 cm



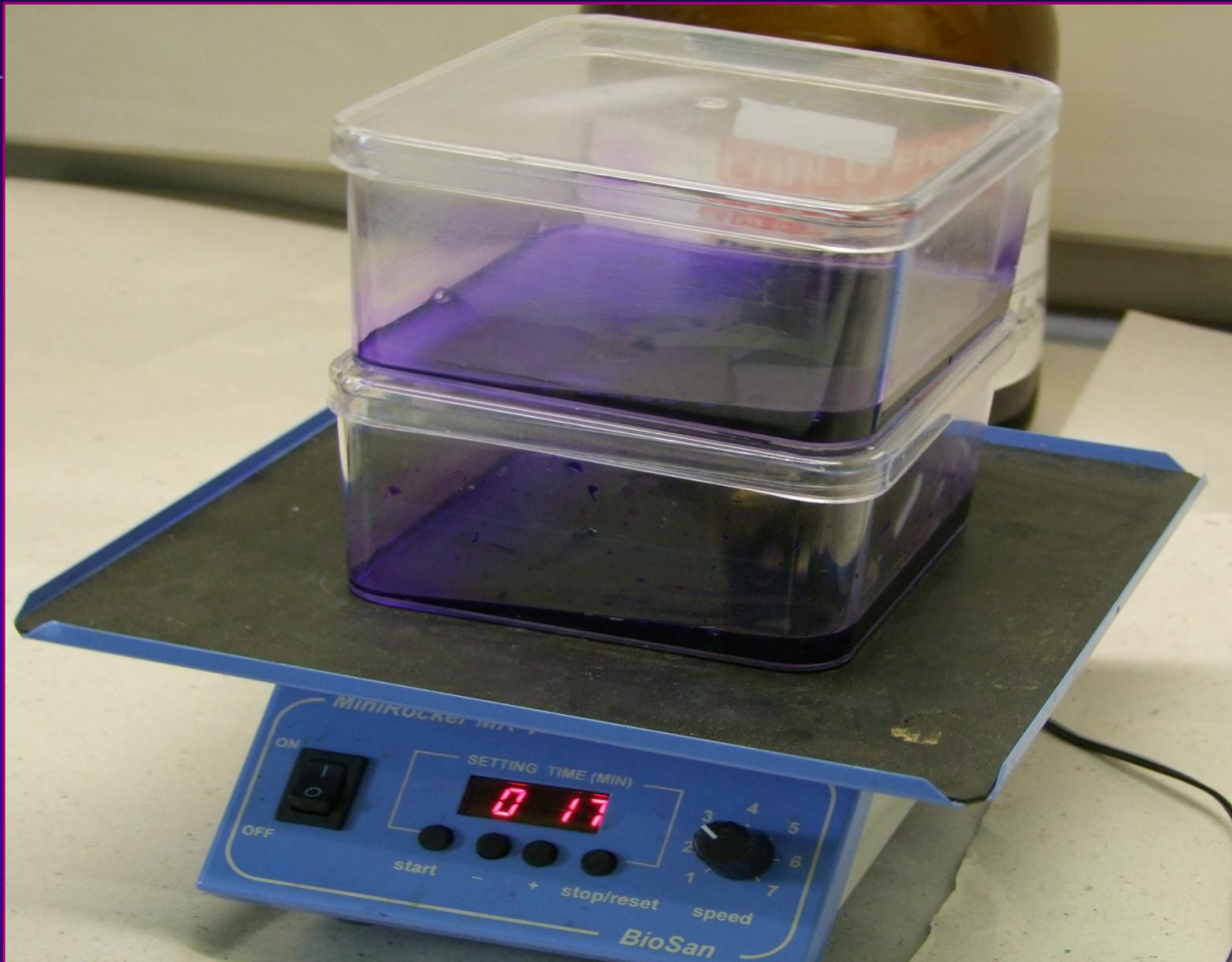
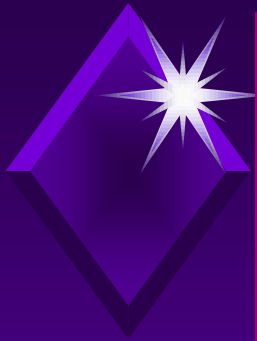
นำเจลออกจาก Gel Cassette Sandwich และวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของ tracking dye โดยใช้ไม้บรรทัดวัด เพื่อไปคำนวณหา relative mobility



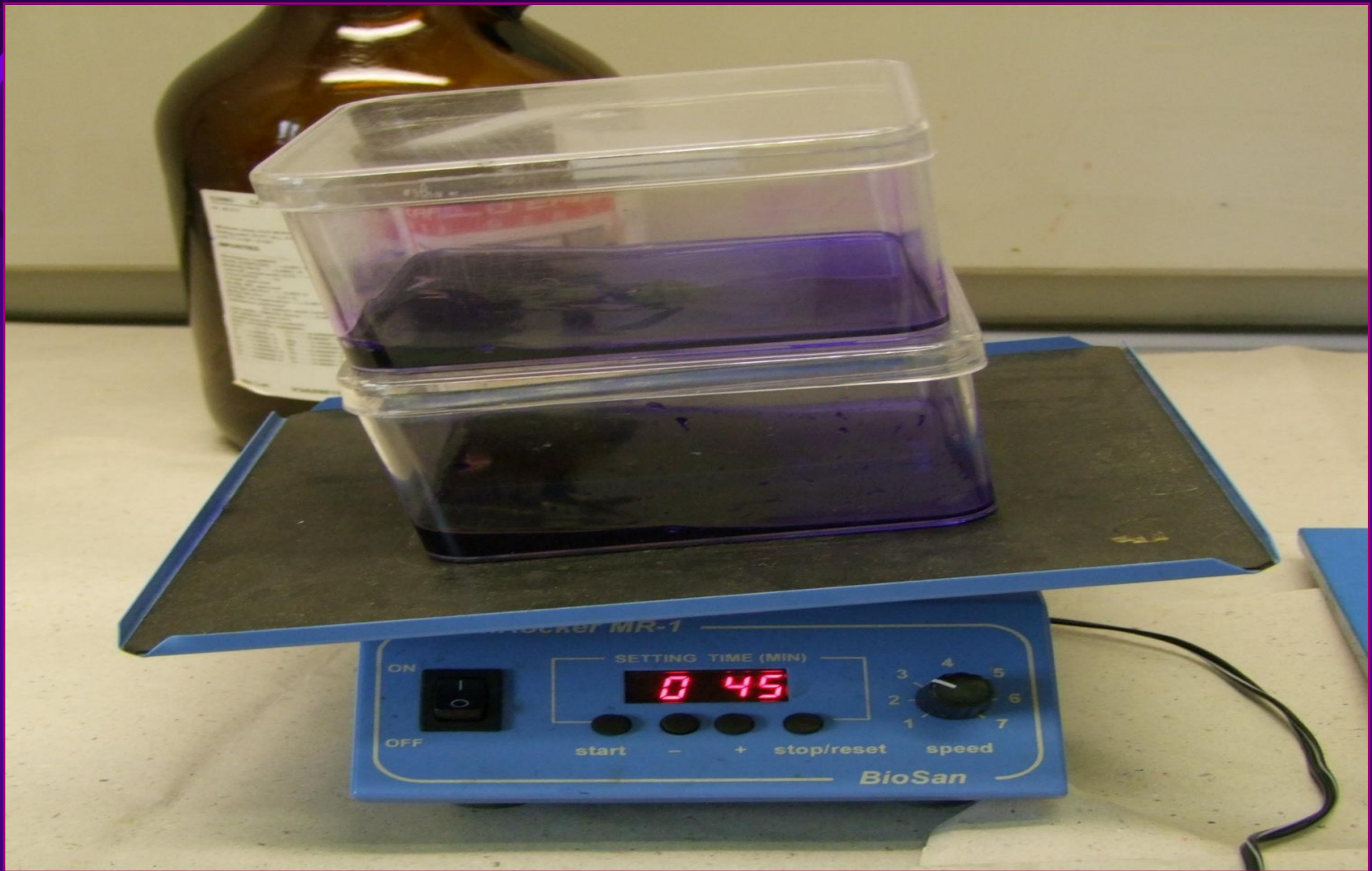
นำแผ่น gel ออกจากแผ่นกระจก ใช้ plastic gel releaser ช่วยใน
การแยกแผ่นกระจกสองแผ่นออกจากกัน ตัดส่วน stacking gel
ทิ้งไป



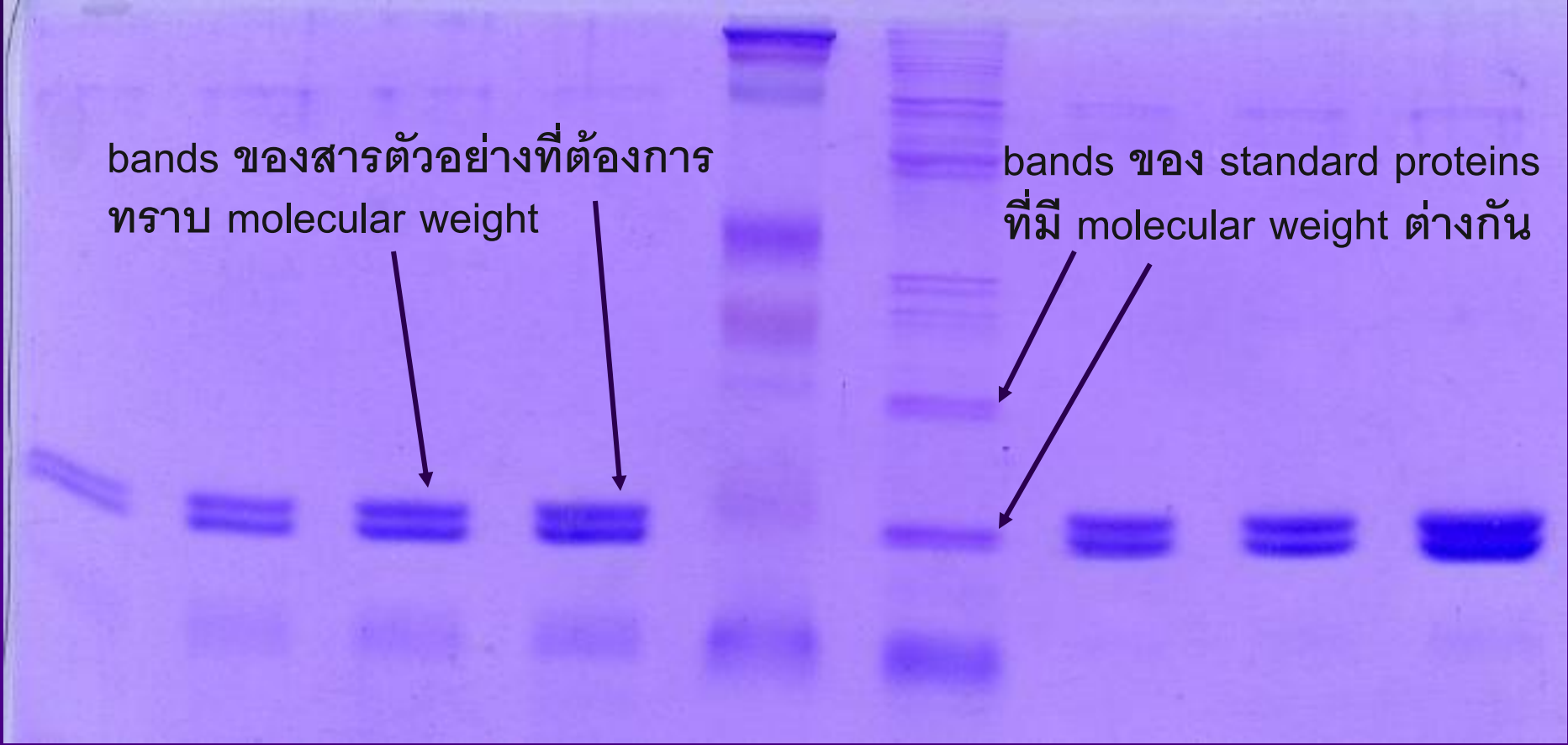
นำส่วน separating gel ไปตรึง (fixing) และย้อมสีด้วยสีย้อม
Coomassie blue R-250 นาน 30 นาที (เขย่าแผ่น gel ระหว่างทำ)



การตรึงและย้อมสีด้วยสีย้อม Coomassie blue R-250 นาน 30 นาที
ระหว่างการย้อมสี gel ควรเขย่าด้วยเครื่องเขย่าสารตลอดการทำ



ล้างสีย้อมด้วย destaining reagent จนกระทั่งเห็น band ของ protein
ชัดเจนและพื้นหลัง (background) ไม่ติดสีย้อม



bands ของสารตัวอย่างที่ต้องการ
ทราบ molecular weight

This is an SDS-PAGE gel image showing protein bands. On the left, there are four lanes of sample bands. In the center, there is a lane with a molecular weight marker showing multiple distinct bands. On the right, there are four more lanes of sample bands. Arrows point from the Thai text labels to specific bands in the sample lanes and the marker lane.

bands ของ standard proteins
ที่มี molecular weight ต่างกัน

สังเกตเห็น band ของ protein ที่แยกออกจากกันตามความแตกต่างของ molecular weight วัดระยะทางการเคลื่อนที่ของแต่ละ band โดยใช้ไม้บรรทัดหรือใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ เพื่อไปคำนวณหา relative mobility



นำแผ่น gel ไปวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง imaging densitometer หรือ
สแกนแผ่นเจลเพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป



ใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ในการคำนวณหา molecular weight
ของสารตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน