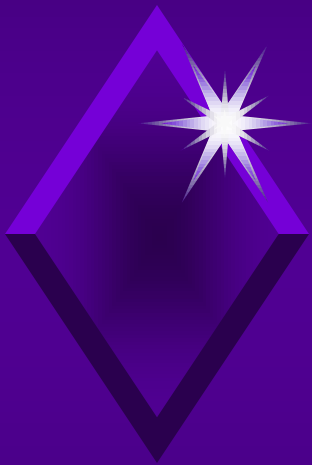


สไลด์การสาธิตการทำ SDS-PAGE



คณะผู้จัดทำ : 1. รศ. ดร. อภัสสร ชูเทศะ

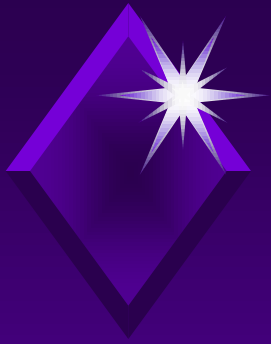
2. นายสมหมาย หอมสวาท

3. น.ส. อรพรรณ สังข์สัมฤทธิ์

4. นาย รัชต์ศักดิ์ สิทธิวิไล

ภาควิชาสรีรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์

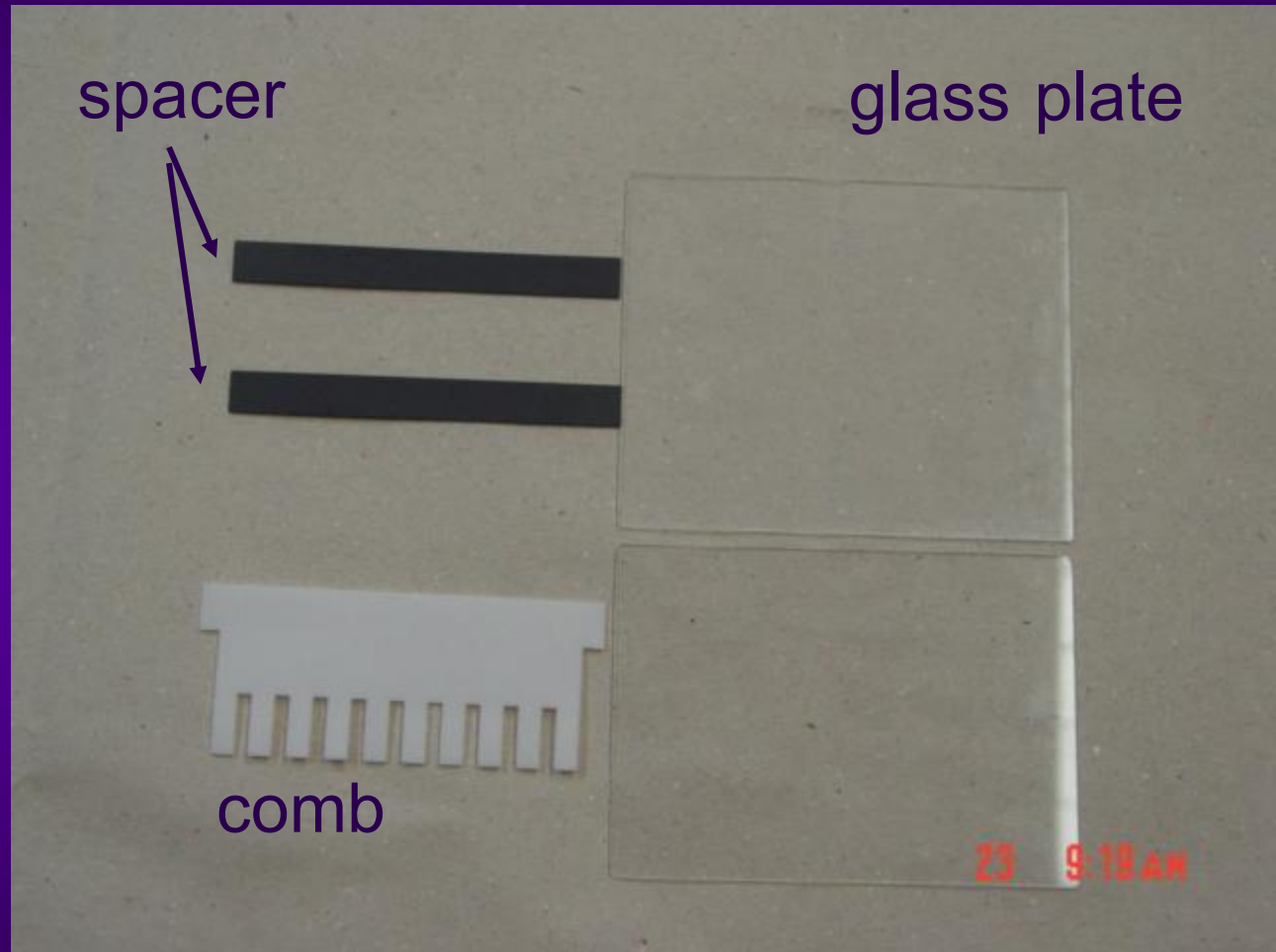
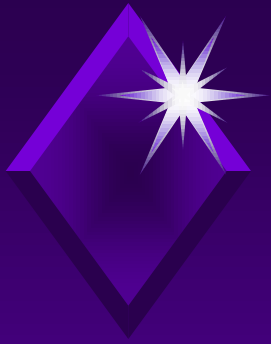
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



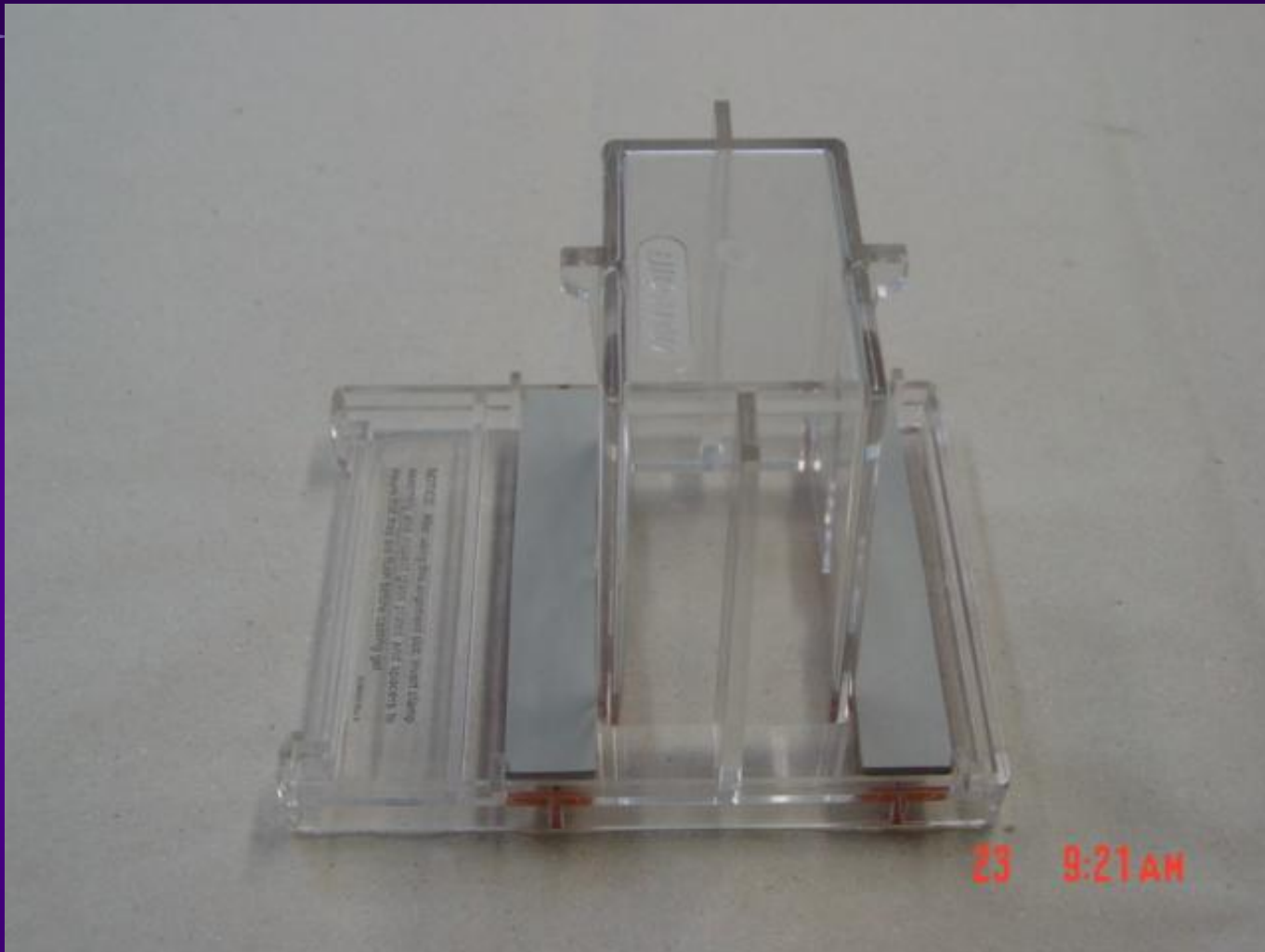
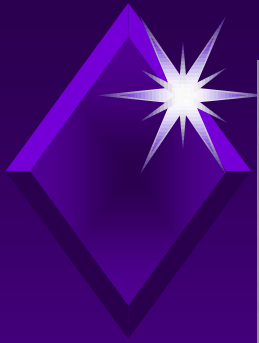
อุปกรณ์การทำ SDS-PAGE :

Miniprotean II Electrophoresis Cell

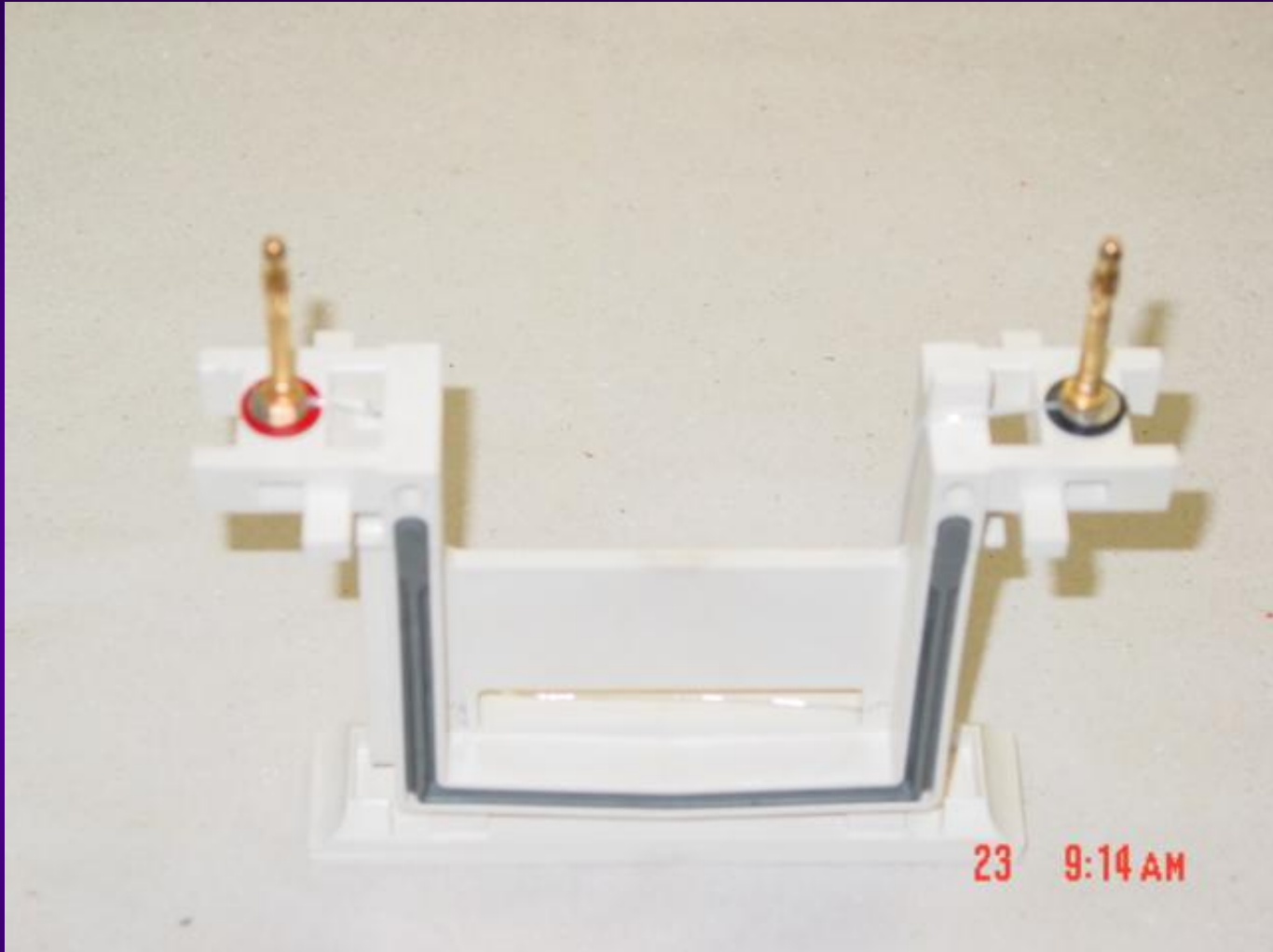
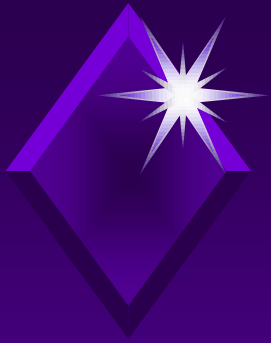
บริษัท Bio Rad U.S.A.



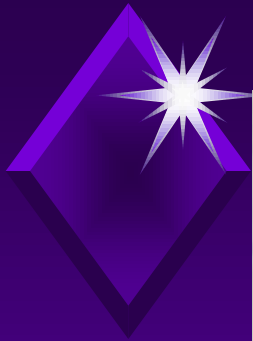
อุปกรณ์ในการเตรียมแผ่น gel



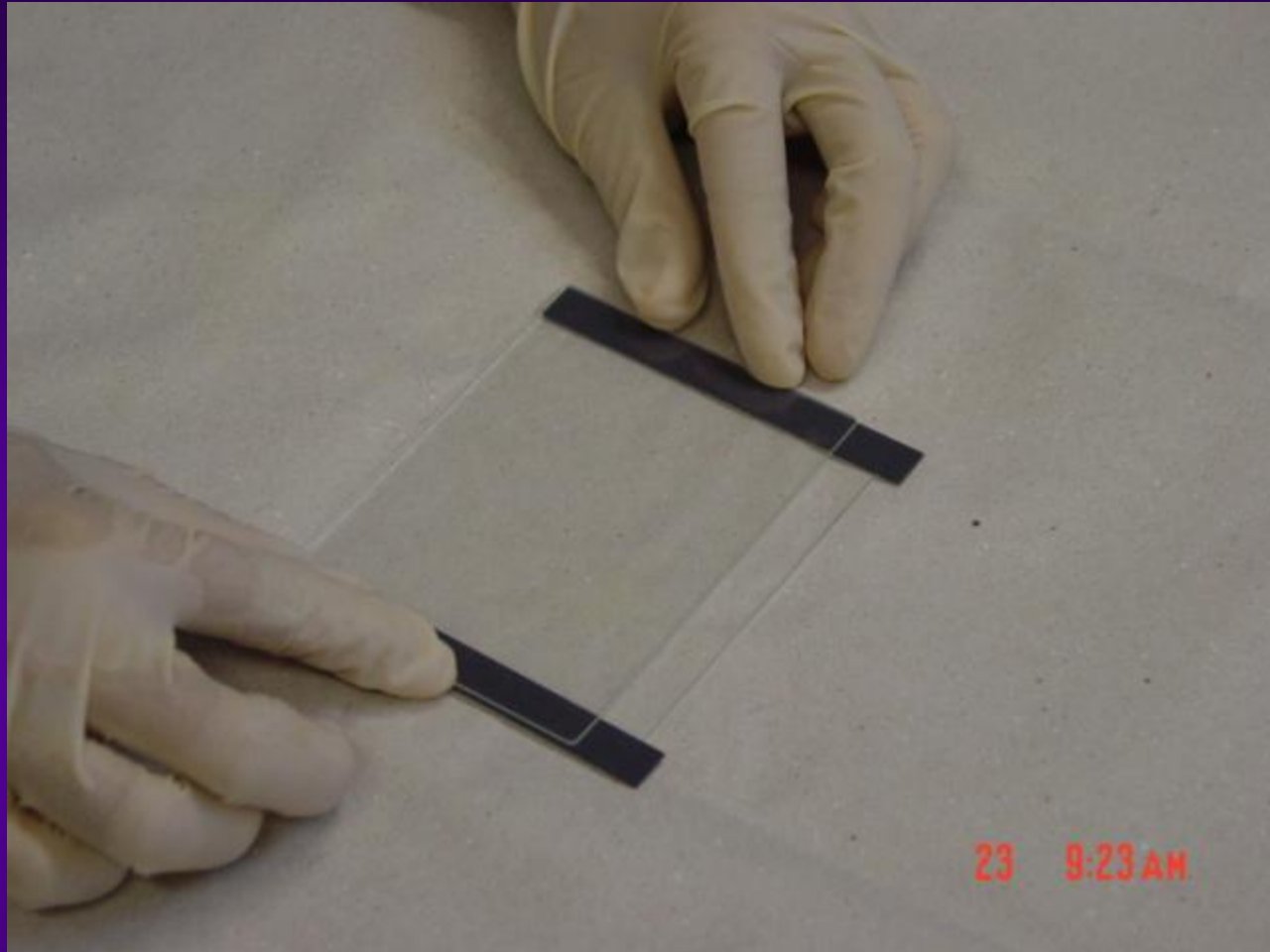
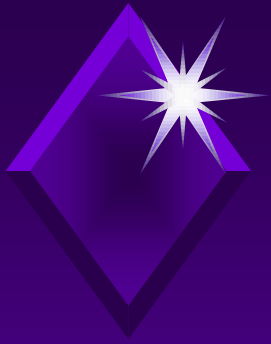
casting stand



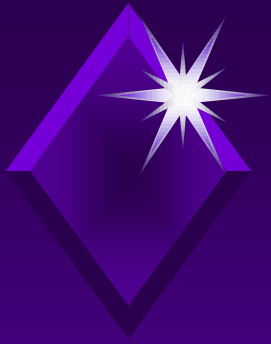
inner cooling core



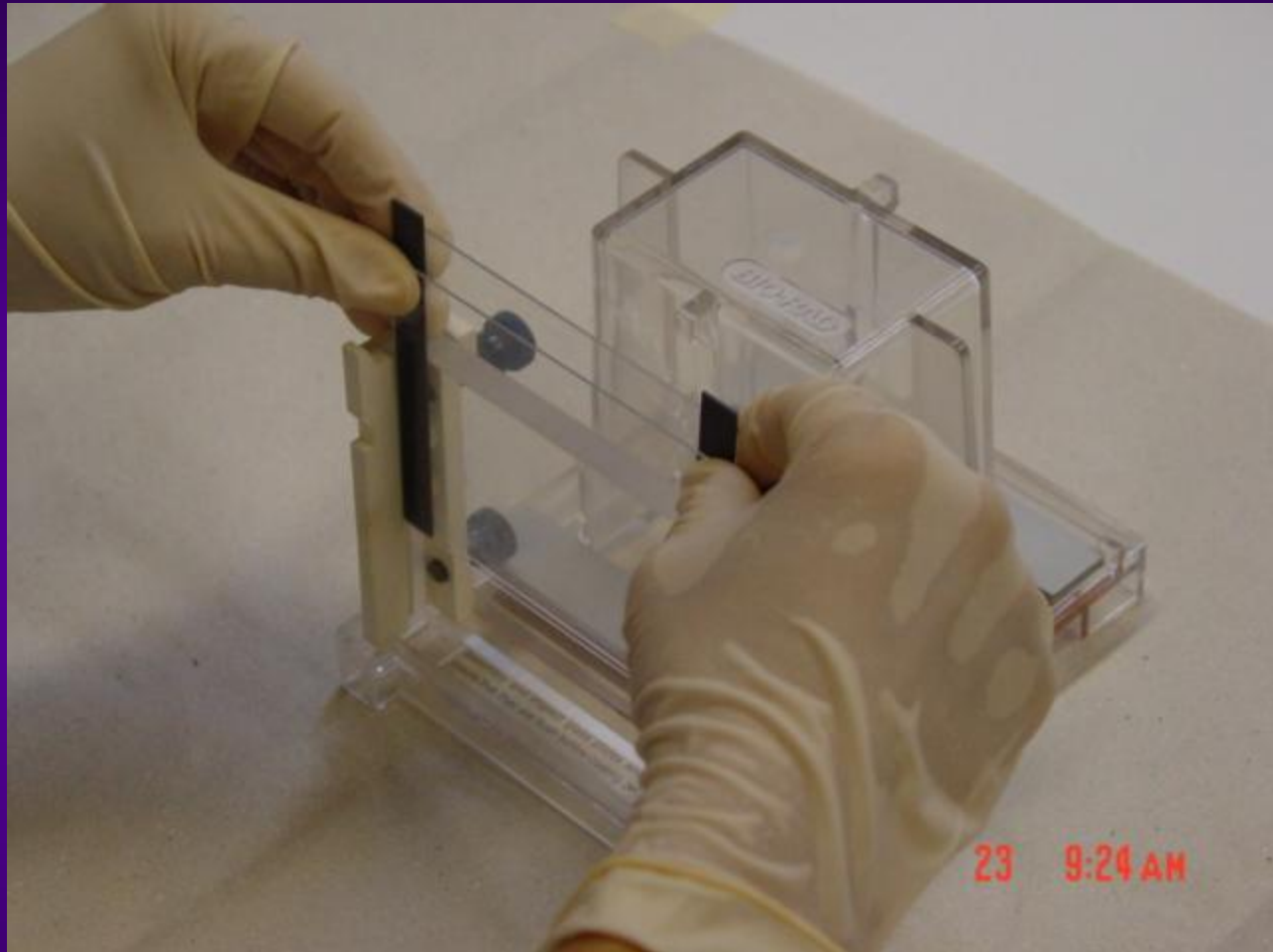
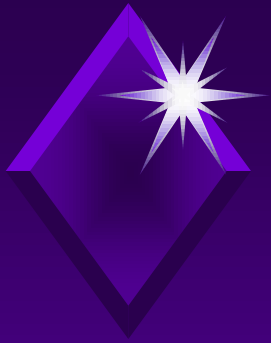
เครื่อง power supply



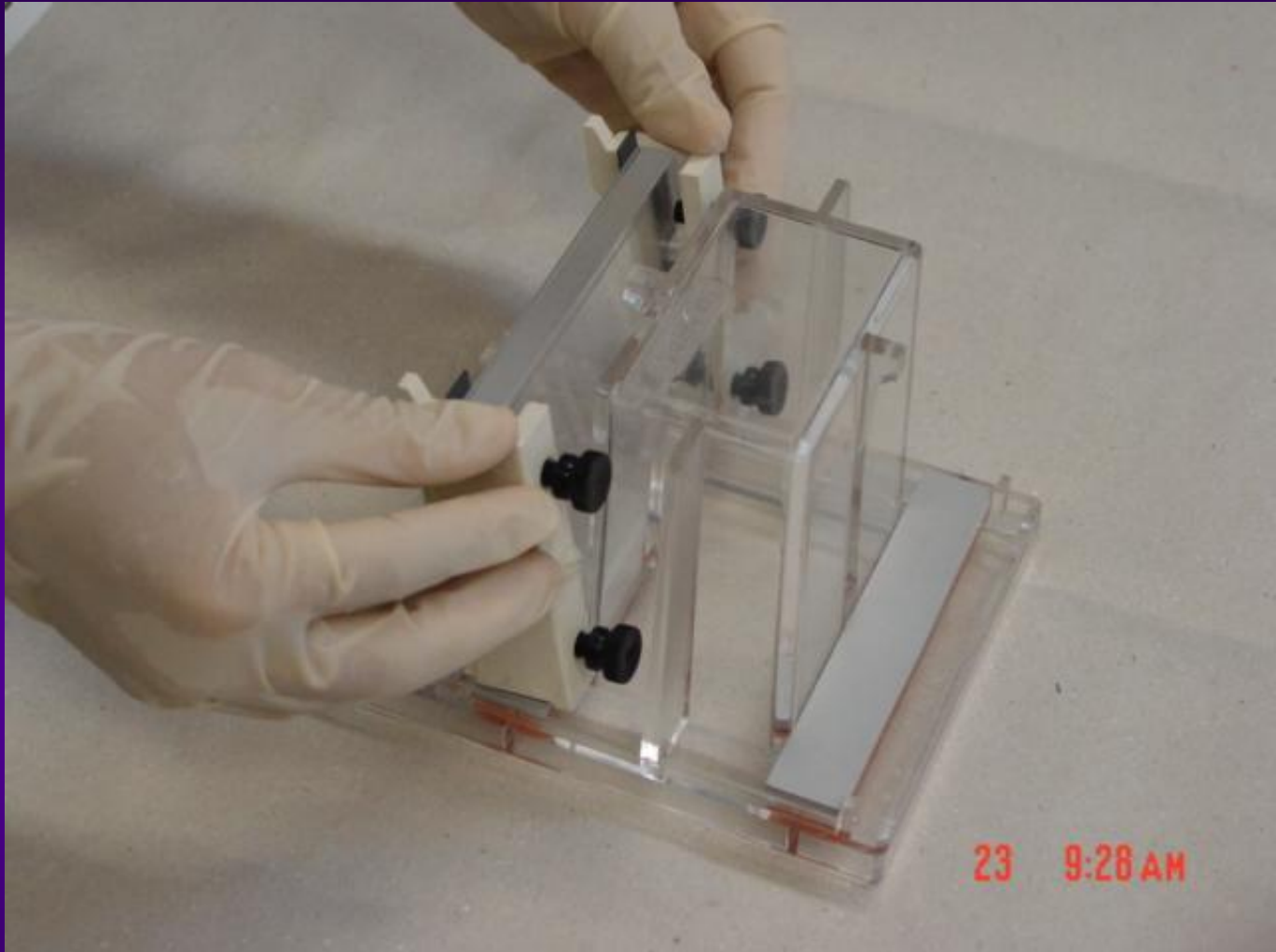
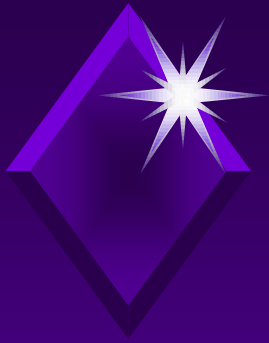
ประกบแผ่นกระจก 2 แผ่น โดยวางแผ่นยาวไว้ล่างบนพื้นที่สะอาด
มี spacer 2 อัน(ที่มีความหนาตามต้องการ)กั้นระหว่างแผ่นกระจก
ปลายของ spacer ควรวางอยู่เลยขอบกระจกแผ่นยาว 5 mm



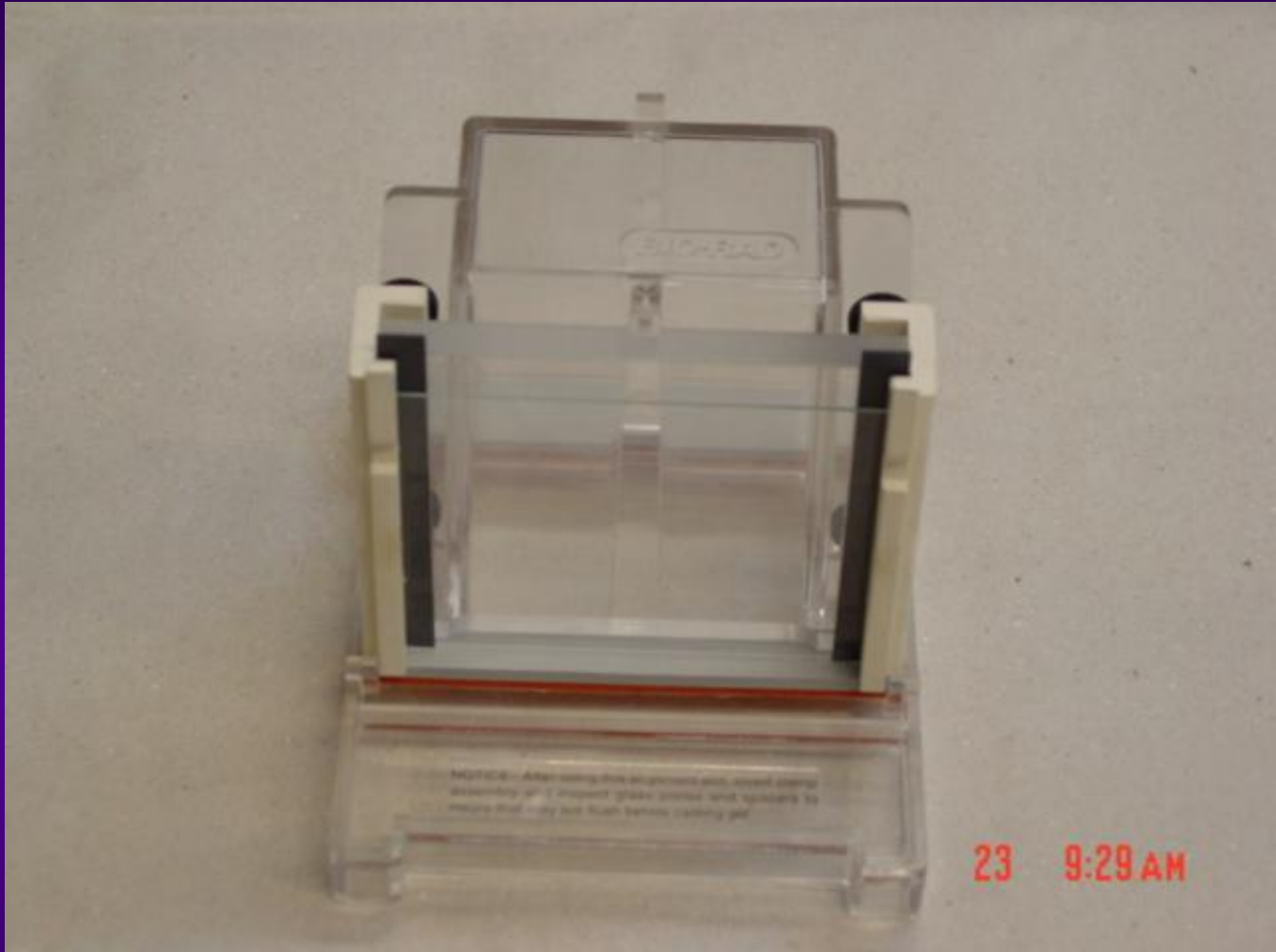
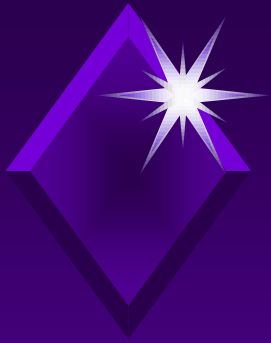
นำ gel clamp assembly มาวางตรง alignment slot ของ casting stand คลาย screw ทั้ง 4 ของ gel clamp assembly



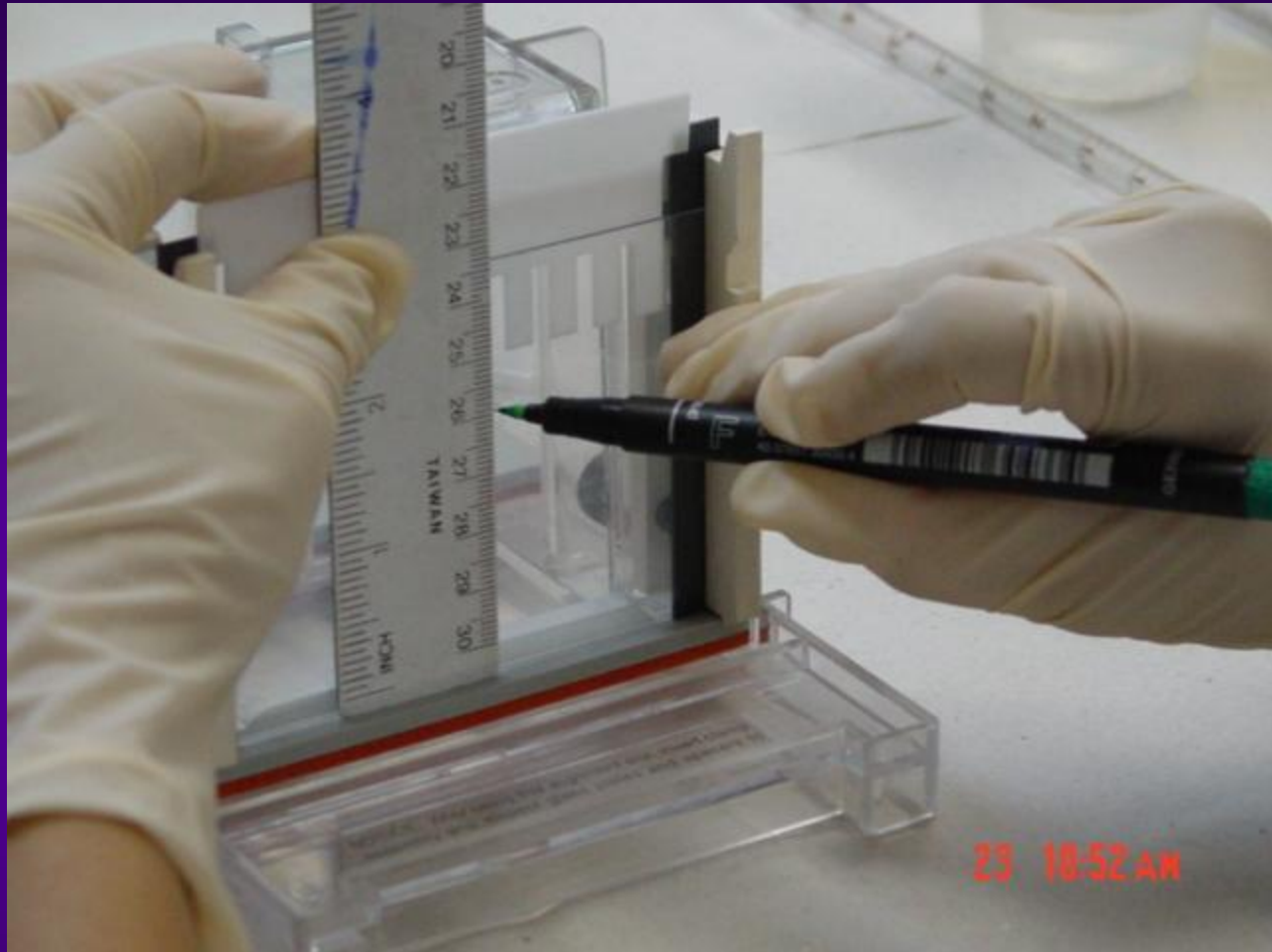
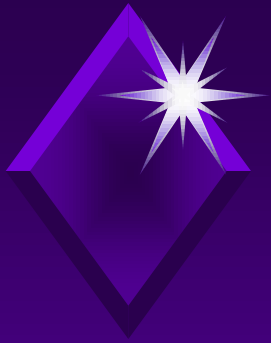
นำ glass sandwich มาใส่ใน gel clamp assembly บิด screw ทั้ง 4 ให้แน่น โดยหมุนทีละ 2 screw ที่อยู่ตรงข้ามกัน



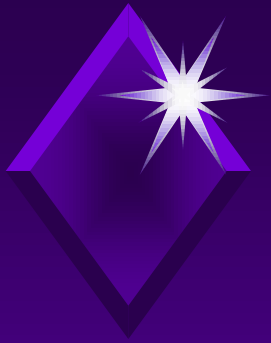
ย้าย gel clamp assembly จาก alignment slot ไปยัง
casting slot



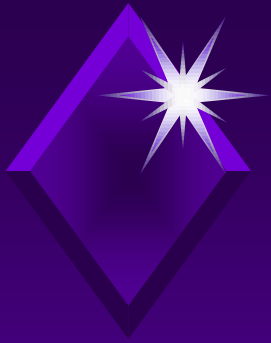
gel clamp assembly อยู่ตรงตำแหน่ง casting slot



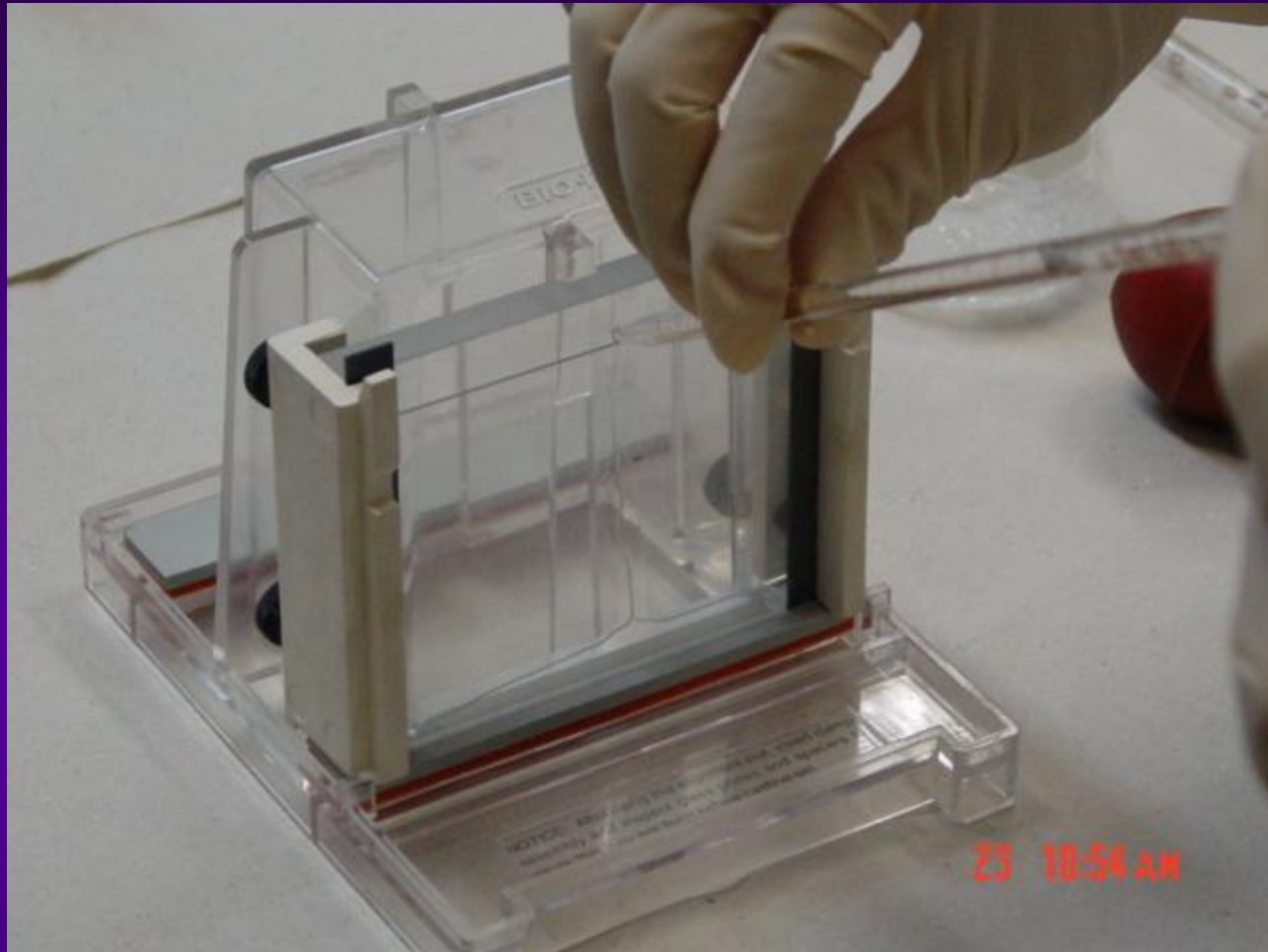
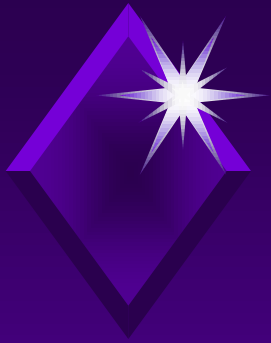
นำ comb มาเสียบในช่องว่างระหว่างแผ่นกระจก ใช้ไม้บรรทัด วัดระดับความสูงของส่วน separating gel โดยให้มีความสูงห่างจากปลายซี่ของ comb 1 cm ขีดเครื่องหมายไว้



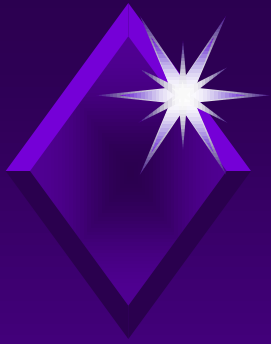
ปีเปตสารละลายเตรียม polyacrylamide gel ส่วน separating gel
ลงในขวด flask ยกเว้น ammonium persulfate และ TEMED



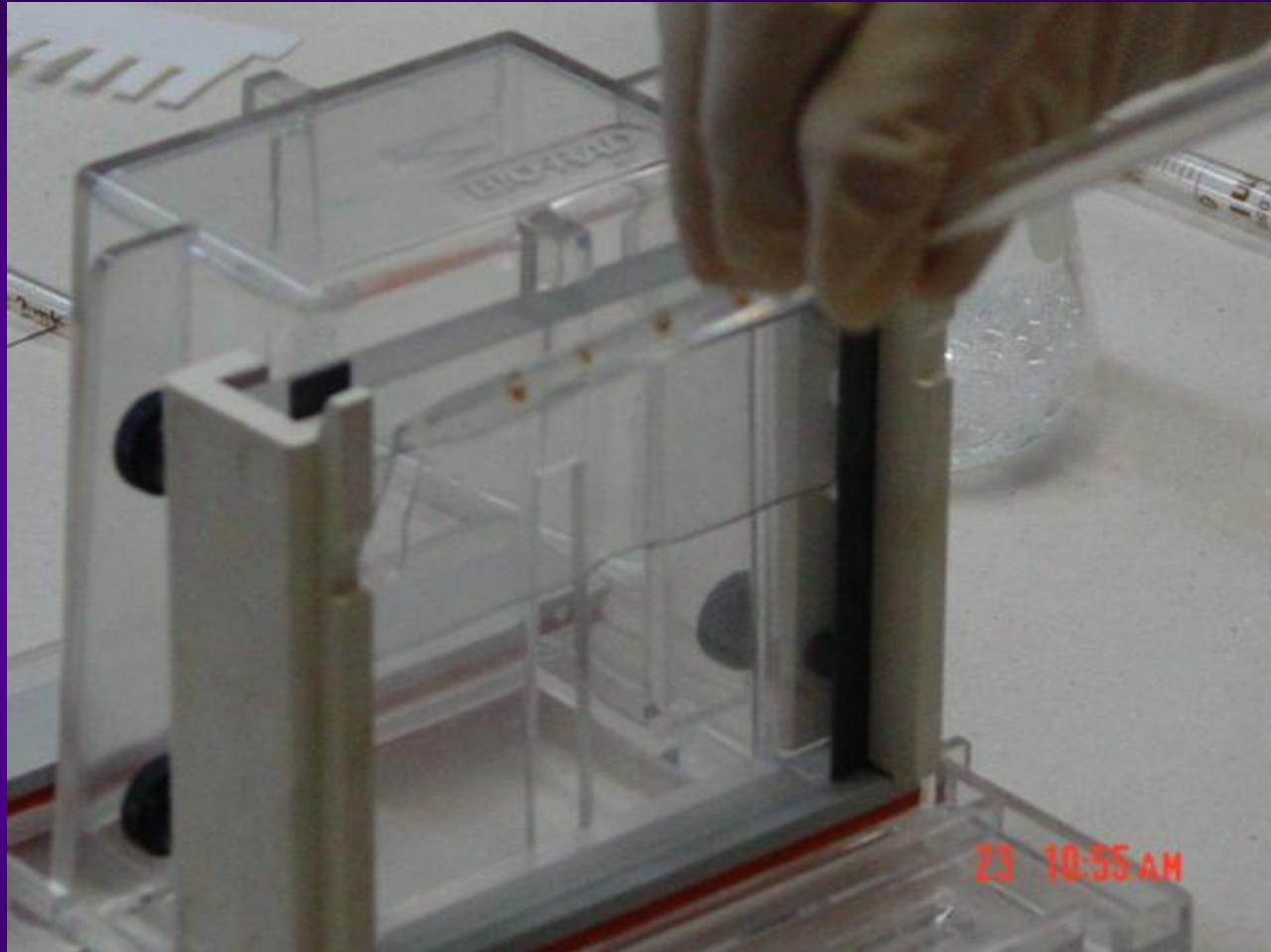
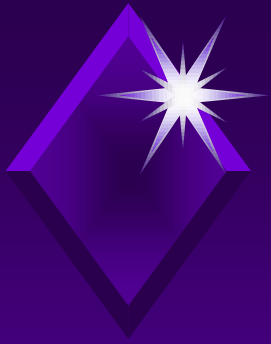
นำสารละลายไป degas อย่างน้อย 15 นาที



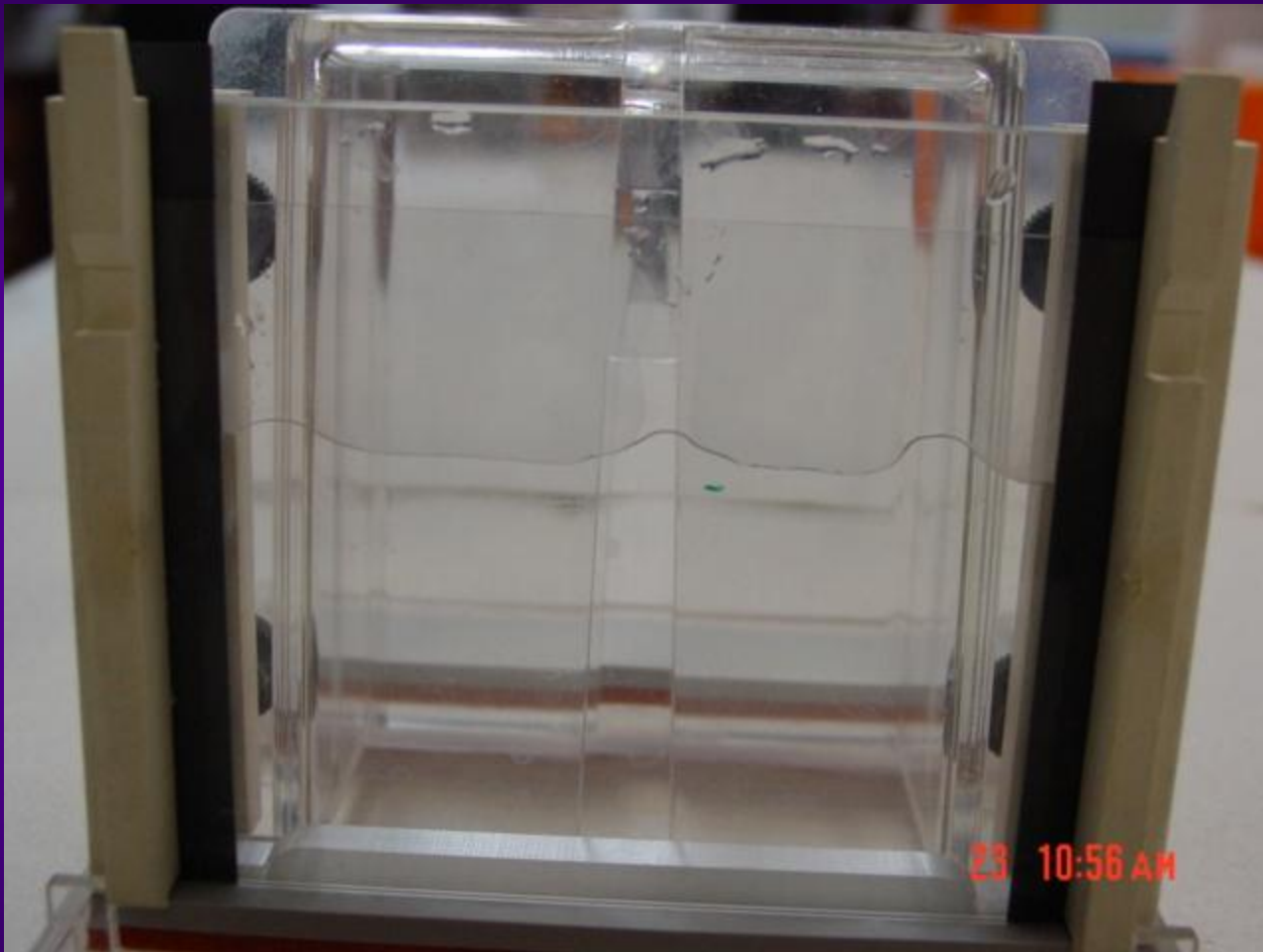
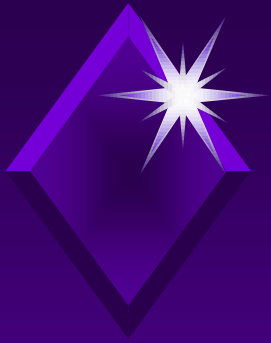
เติม ammonium persulfate และ TEMED ลงในสารละลายที่ degas แล้ว ผสมให้เข้ากันเบาๆ ปิเปตสารละลายใส่ลงในช่องว่างระหว่างแผ่นกระจกจนกระทั่งมีความสูงเท่ากับ ระยะที่ทำเครื่องหมายไว้



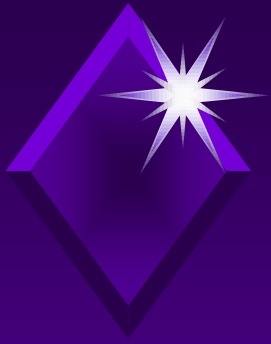
polyacrylamide gel ส่วน separating gel มีความสูง
เท่ากับระยะที่ทำเครื่องหมายไว้



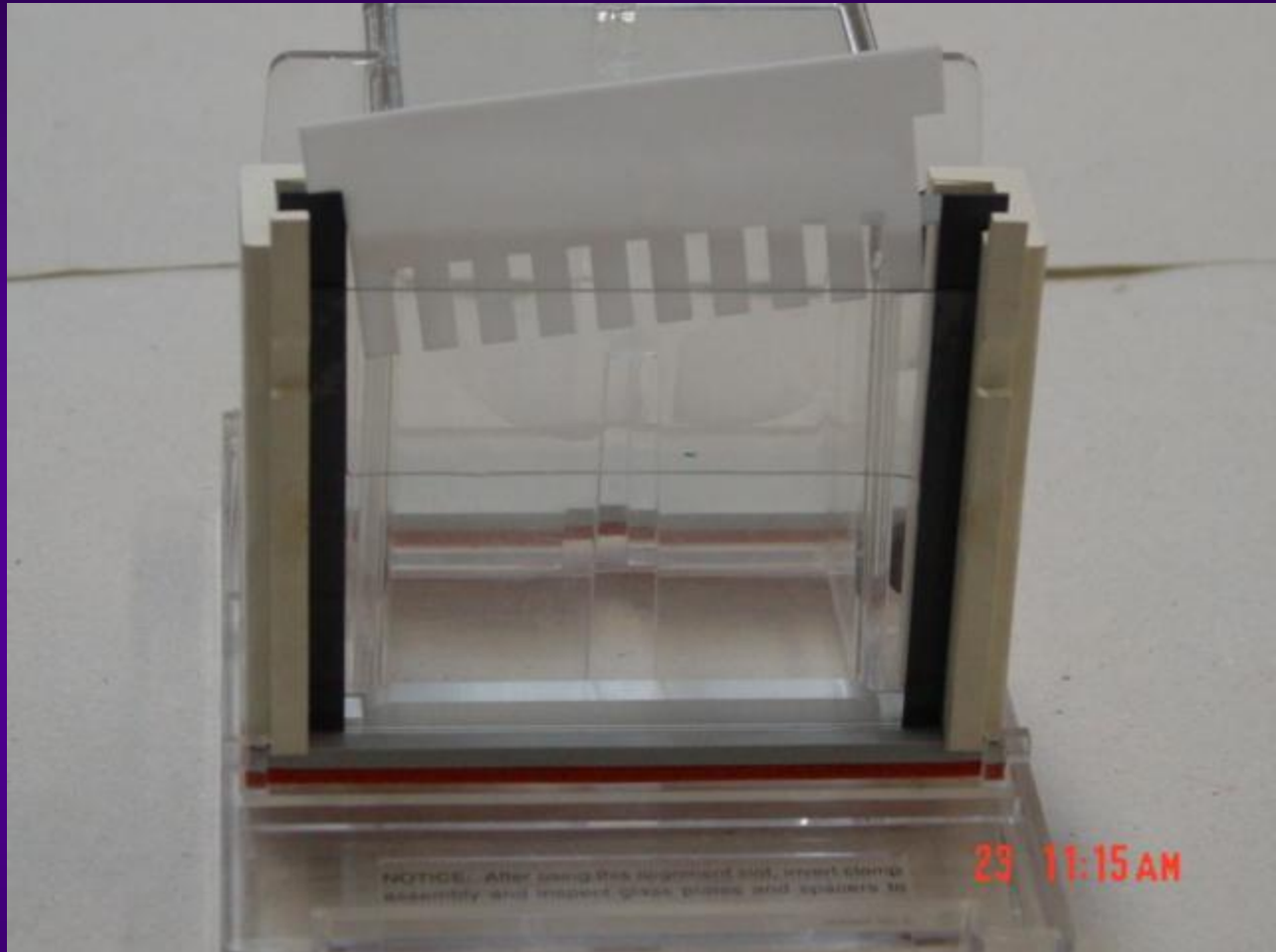
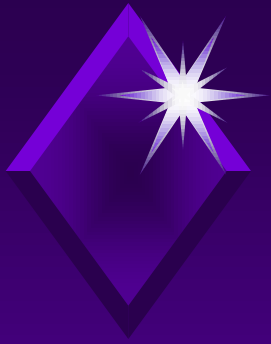
ปิดผิวหน้าของสารละลาย gel ด้วยน้ำกลั่นเบาๆ



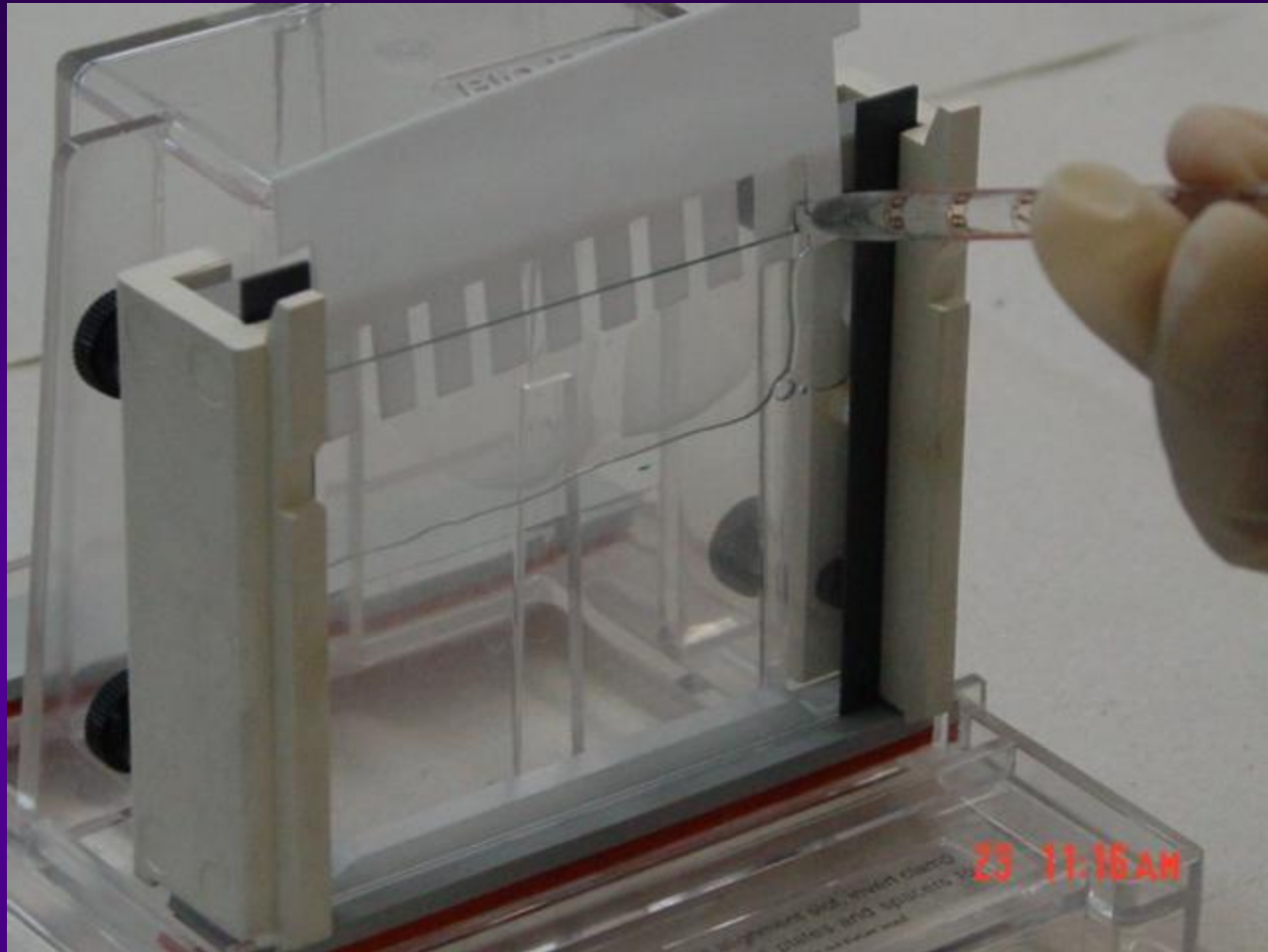
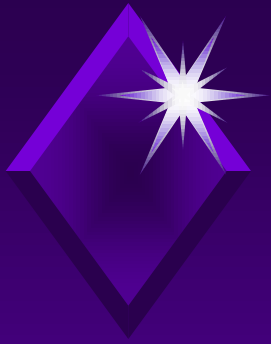
ส่วน separating gel มีน้ำกลั่นปิดที่ผิวหน้า



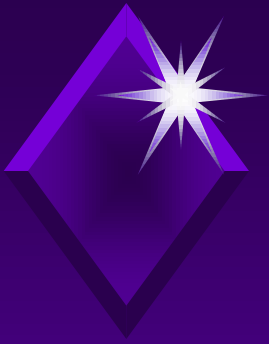
ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 45 นาที-1 ชั่วโมง เทน้ำกลั่นที่
ปิดผิวหน้าของเจลทิ้ง



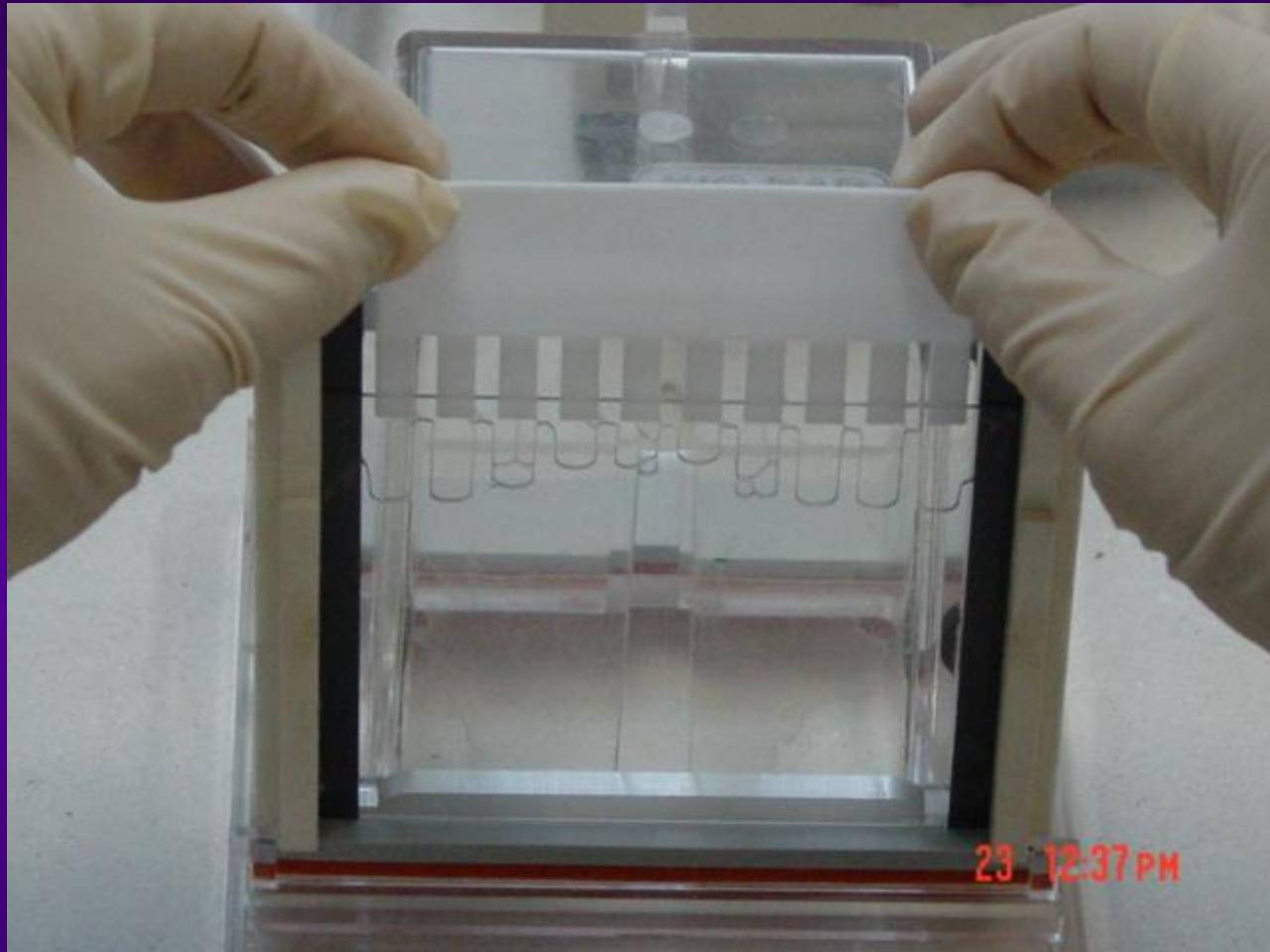
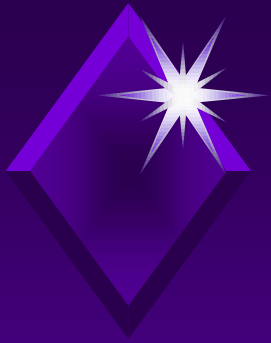
วาง comb ให้มีความเอียงประมาณ 10 องศา



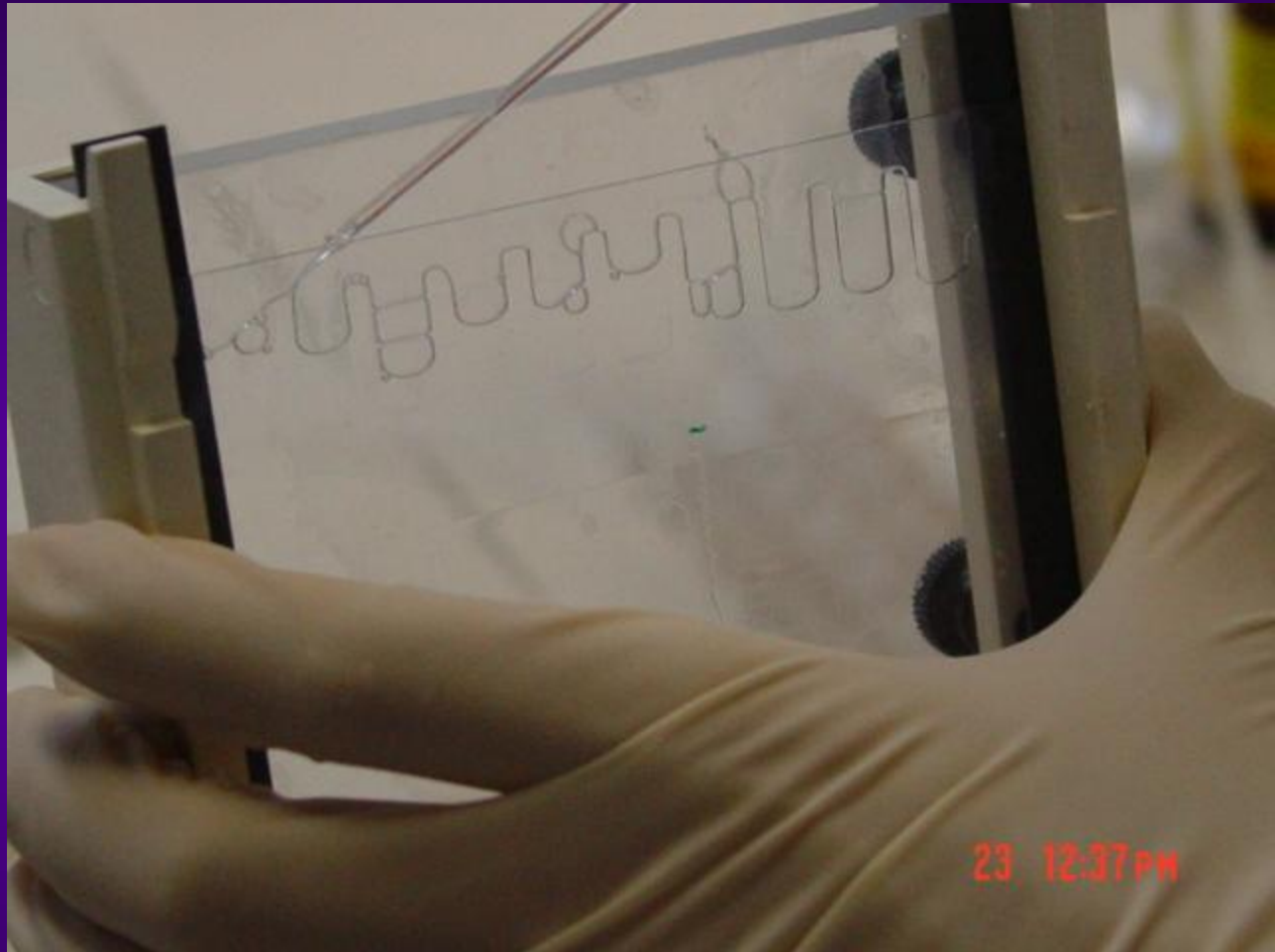
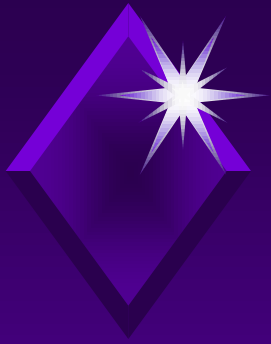
เตรียม polyacrylamide gel ส่วน stacking gel เหมือนกับส่วน separating gel ปิเปตสารละลายที่ degas และเติม ammonium persulfate และ TEMED ใส่ลงในช่องว่างระหว่างแผ่นกระจกจนกระทั่งท่วมพื้นของ comb



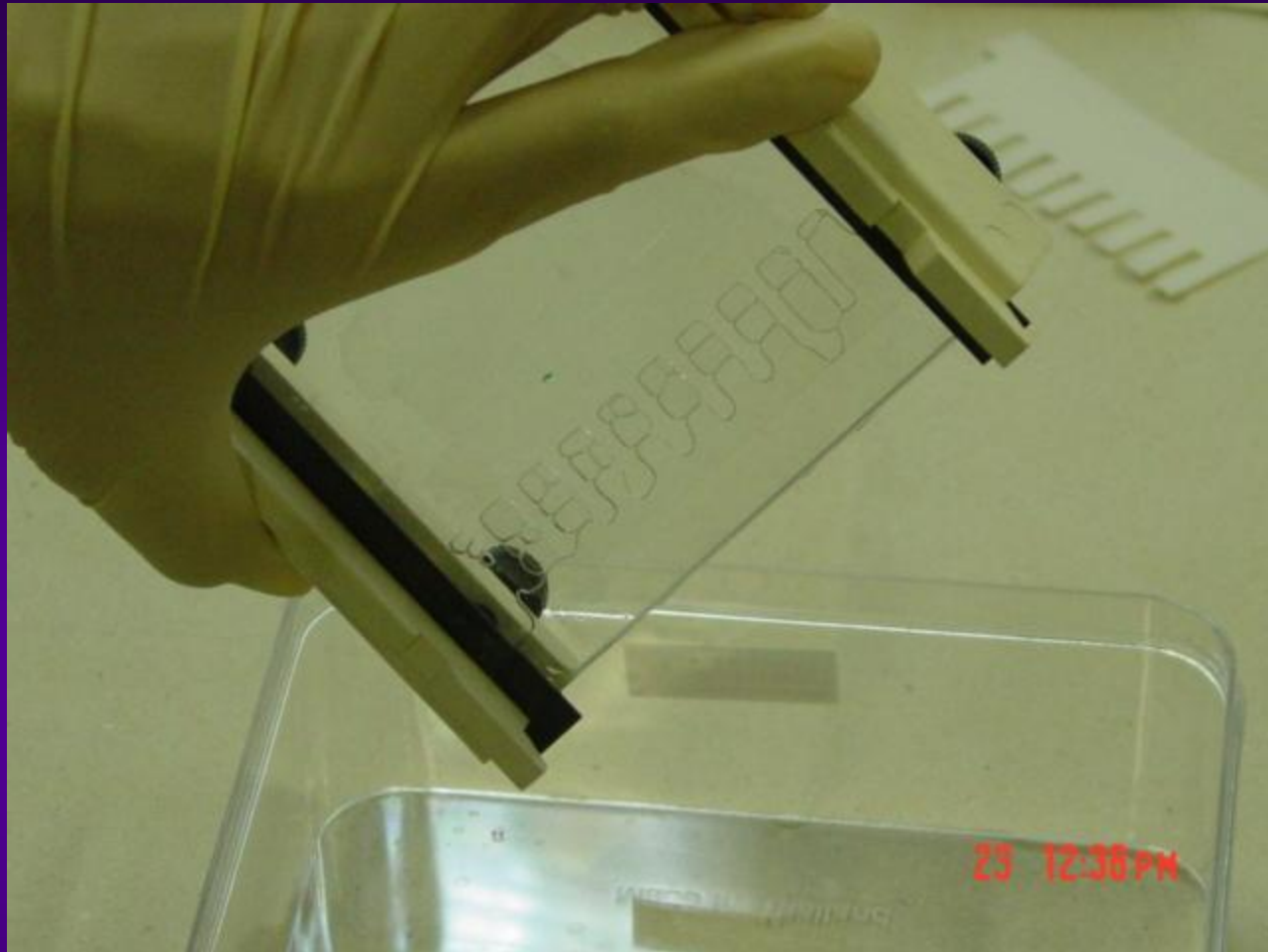
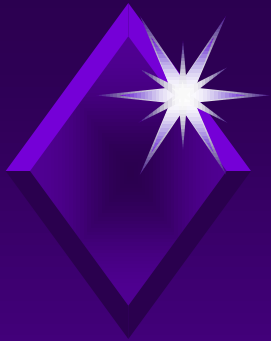
วาง comb ให้ตรง ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30-45 นาที



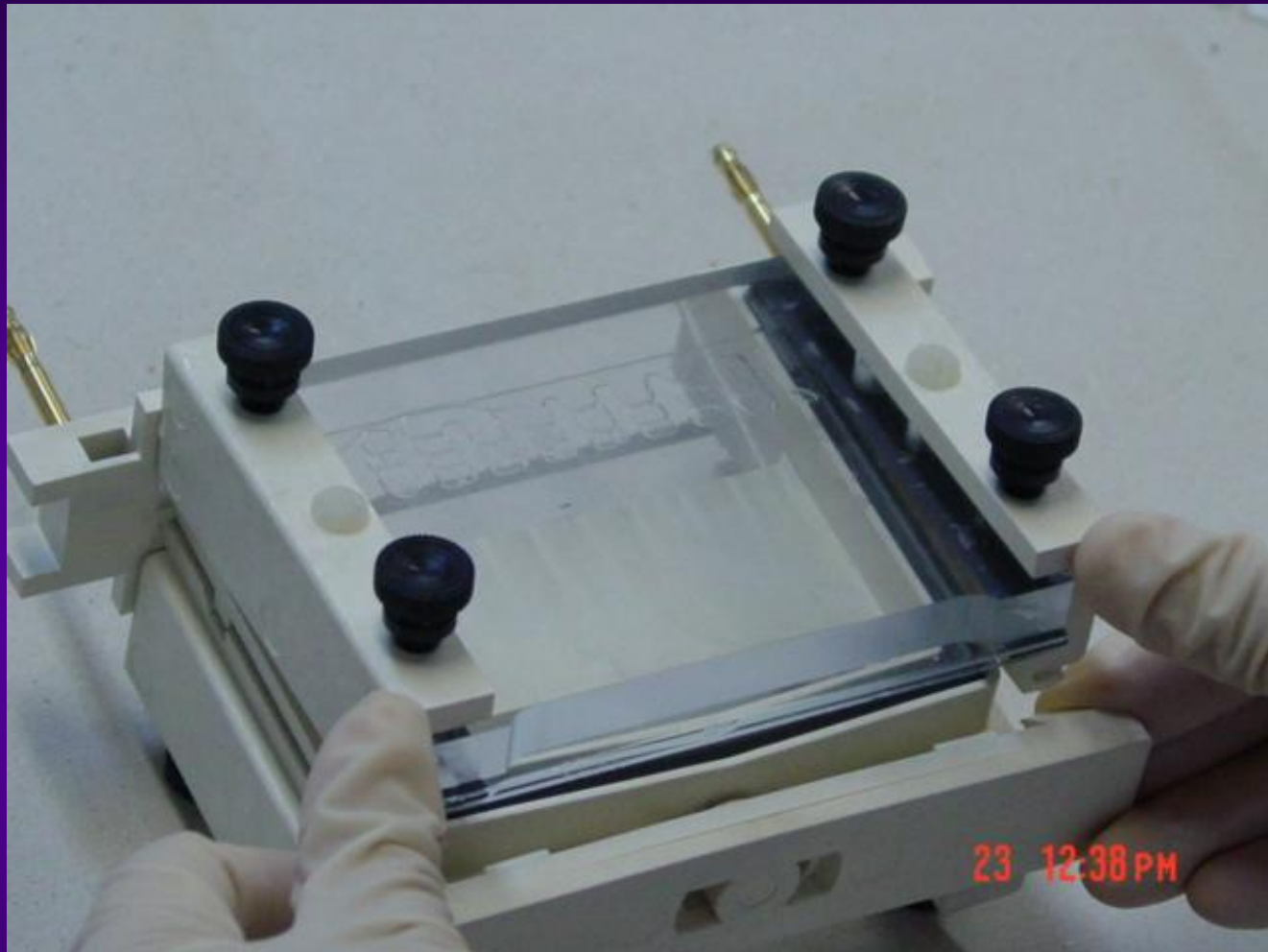
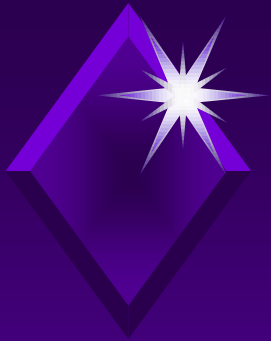
ดึง comb ออกช้าๆ



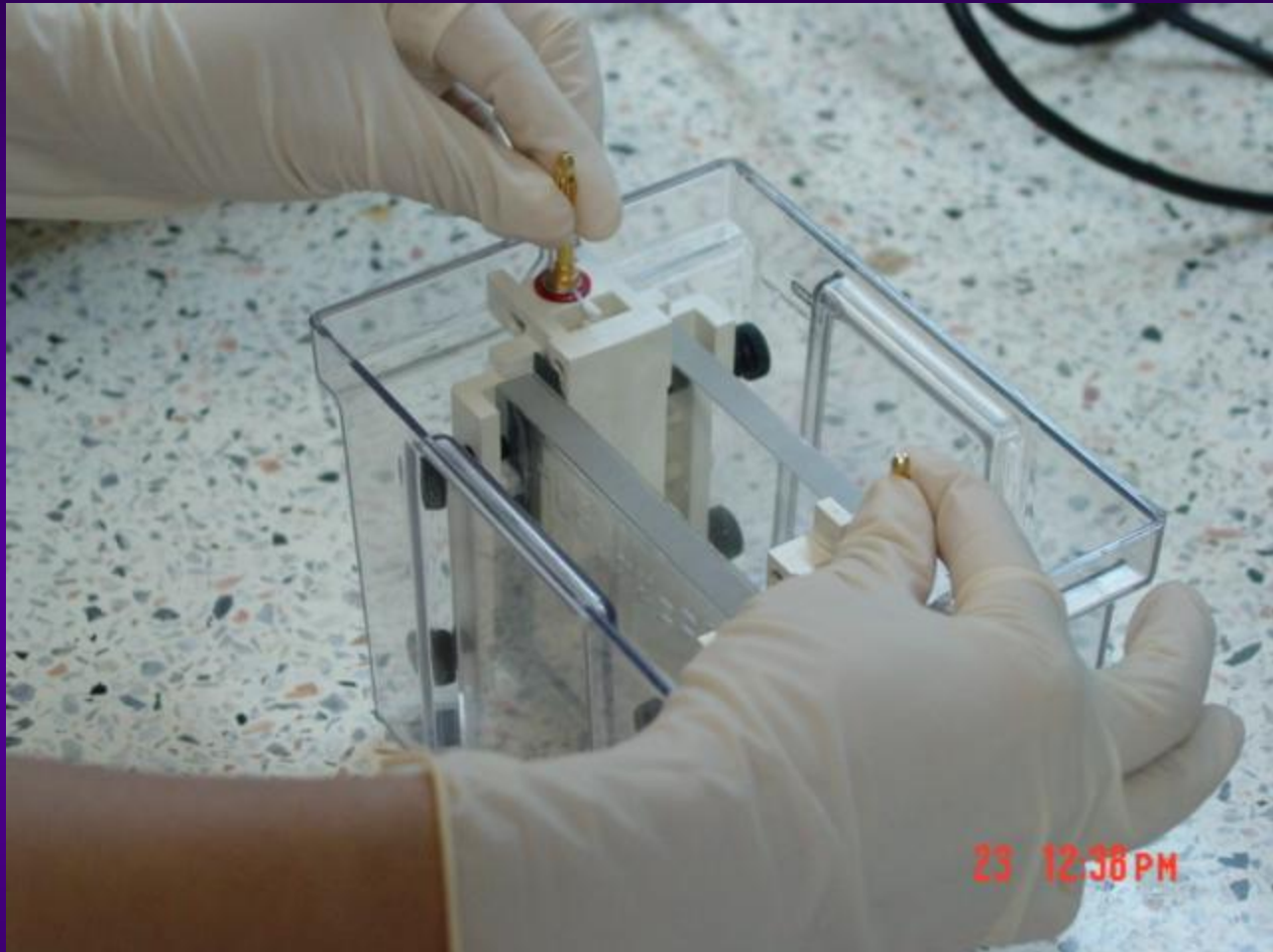
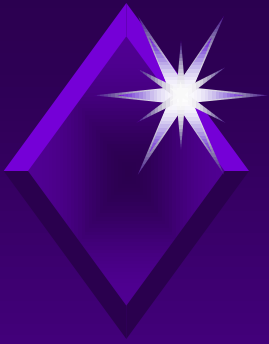
ล้าง sample well ด้วยน้ำกลั่นหรือ electrode buffer



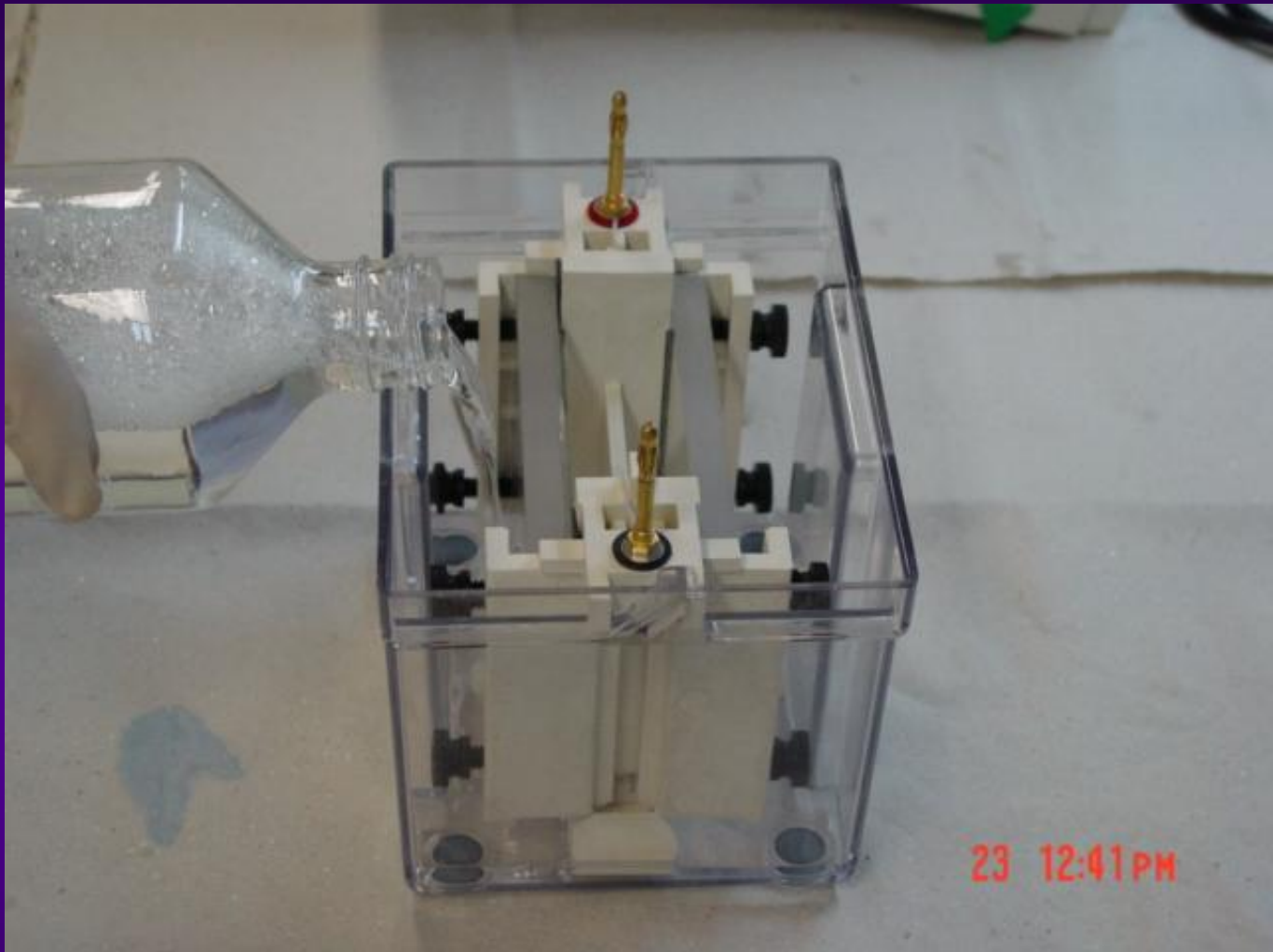
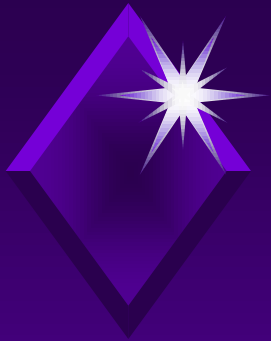
เทน้ำกลั่นหรือ electrode buffer ที่ทิ้ง ทำให้แห้ง
ด้วยกระดาษกรอง



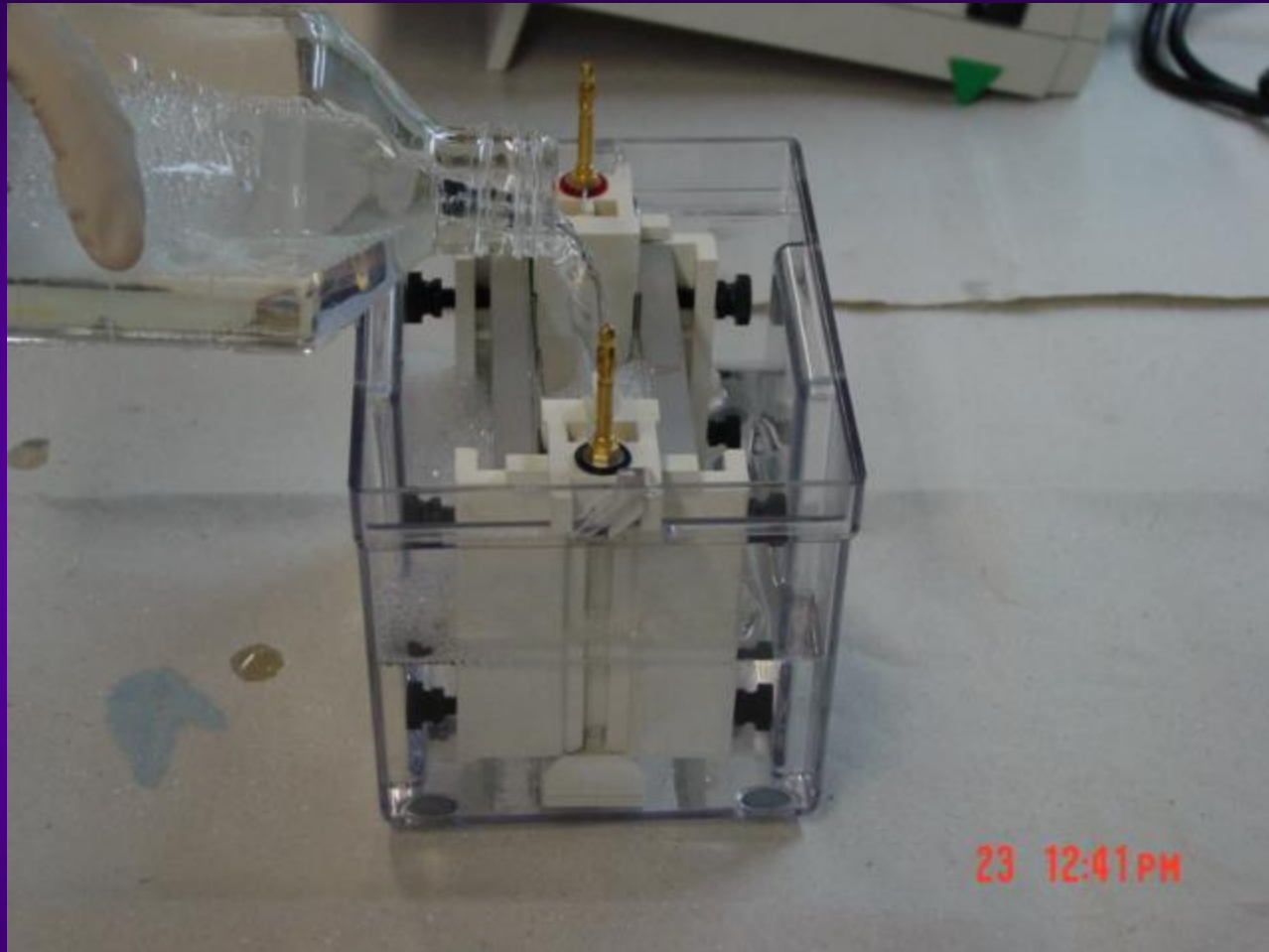
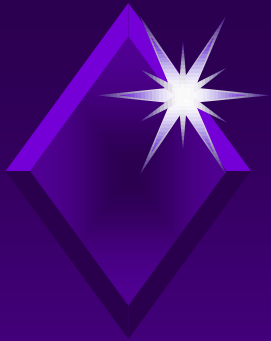
นำ gel clamp assembly พร้อมด้วย gel มาใส่ใน
inner cooling core



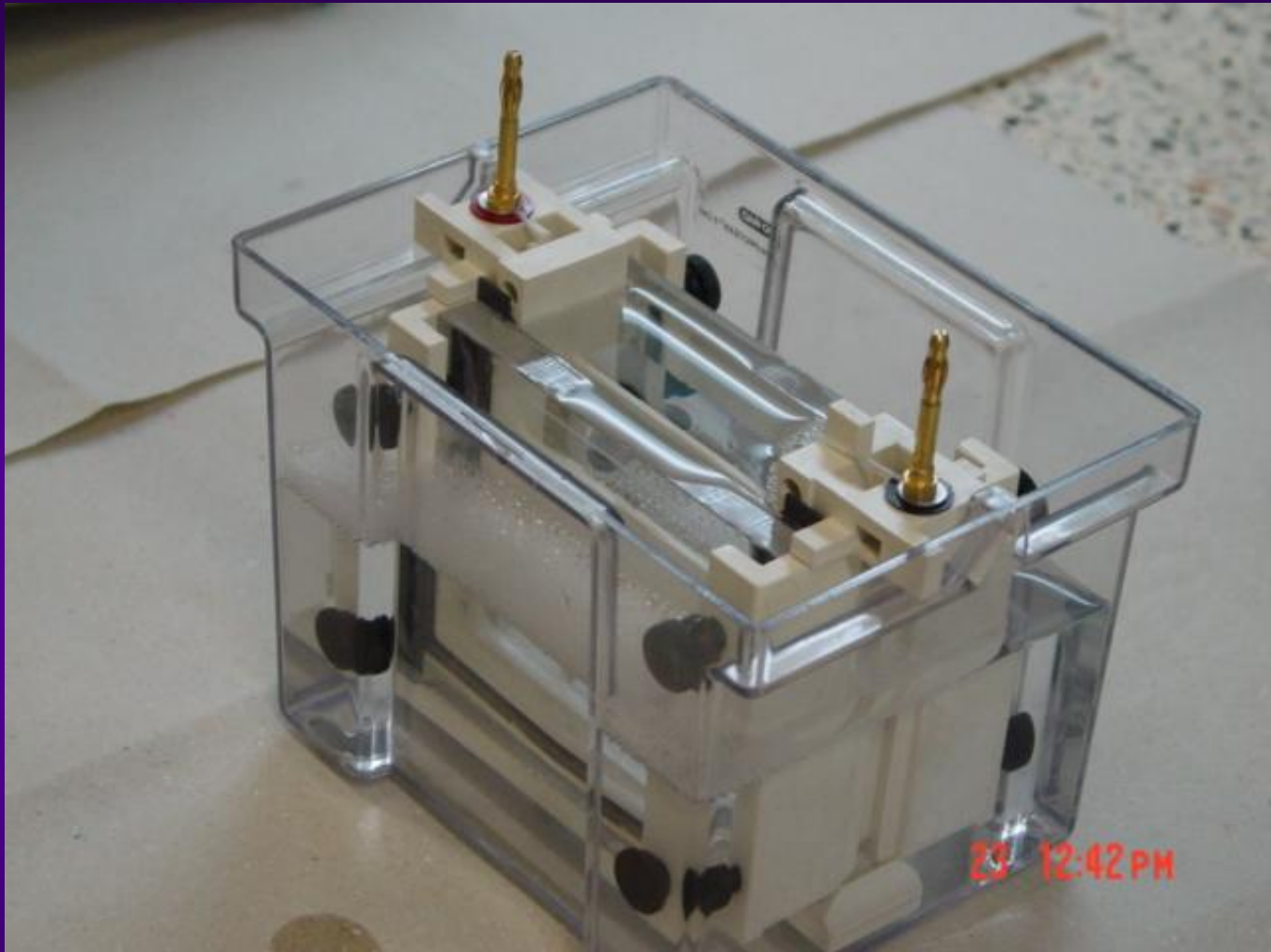
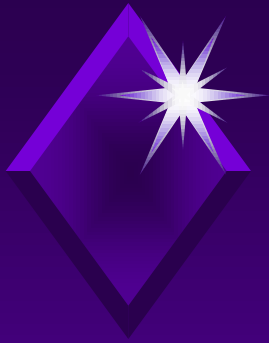
วาง inner cooling core ลงใน lower buffer chamber



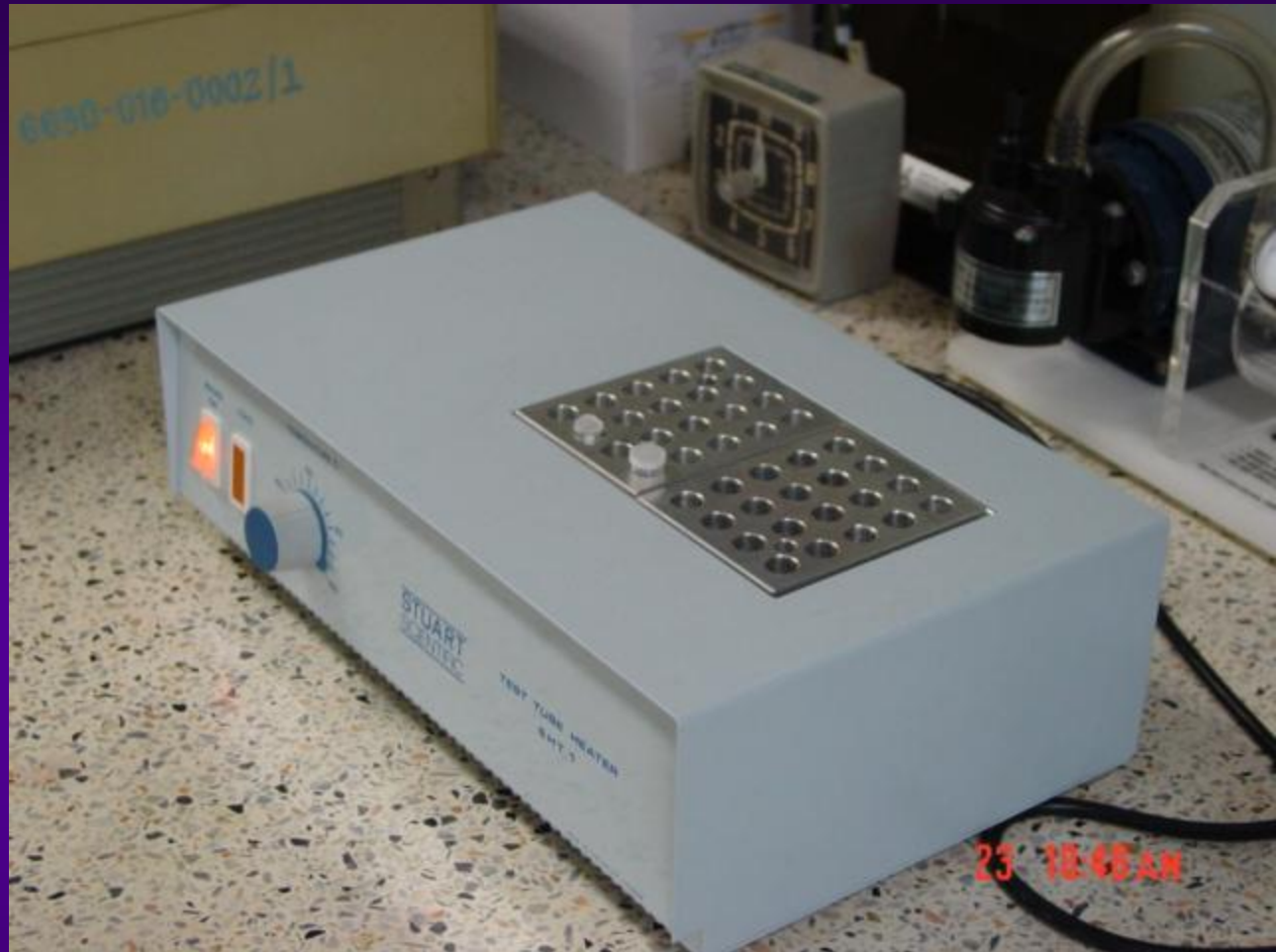
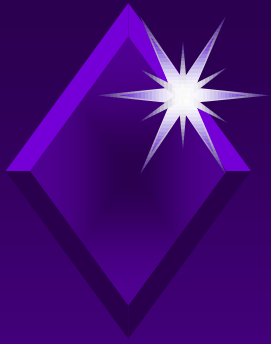
เท electrode buffer ลงใน lower buffer chamber ประมาณ 115 ml
จนกระทั่งถึงระดับกึ่งกลางแผ่นกระจก



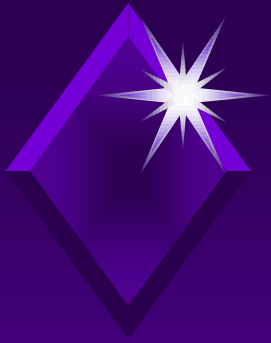
เท electrode buffer ที่เหลือลงใน upper buffer chamber
จนกระทั่งท่วม gel



ไล่ฟองอากาศออกให้หมด



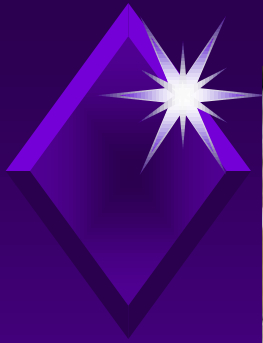
เตรียมสารละลาย standard proteins และสารละลายตัวอย่าง
โดยใช้ sample buffer นำไป heat ที่ 95°C นาน 4 นาที



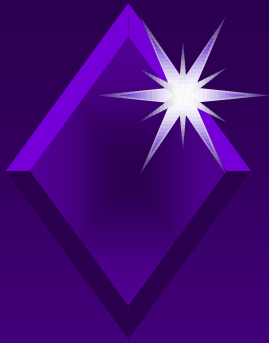
เมื่อสารละลายเย็นแล้ว ปิเปตสารละลายประมาณ 5 μ l หยดลงใน sample well ที่มี electrode buffer ท่วมอยู่



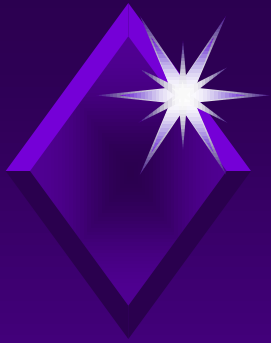
สภาพของสารละลายตัวอย่างที่อยู่ใน sample well



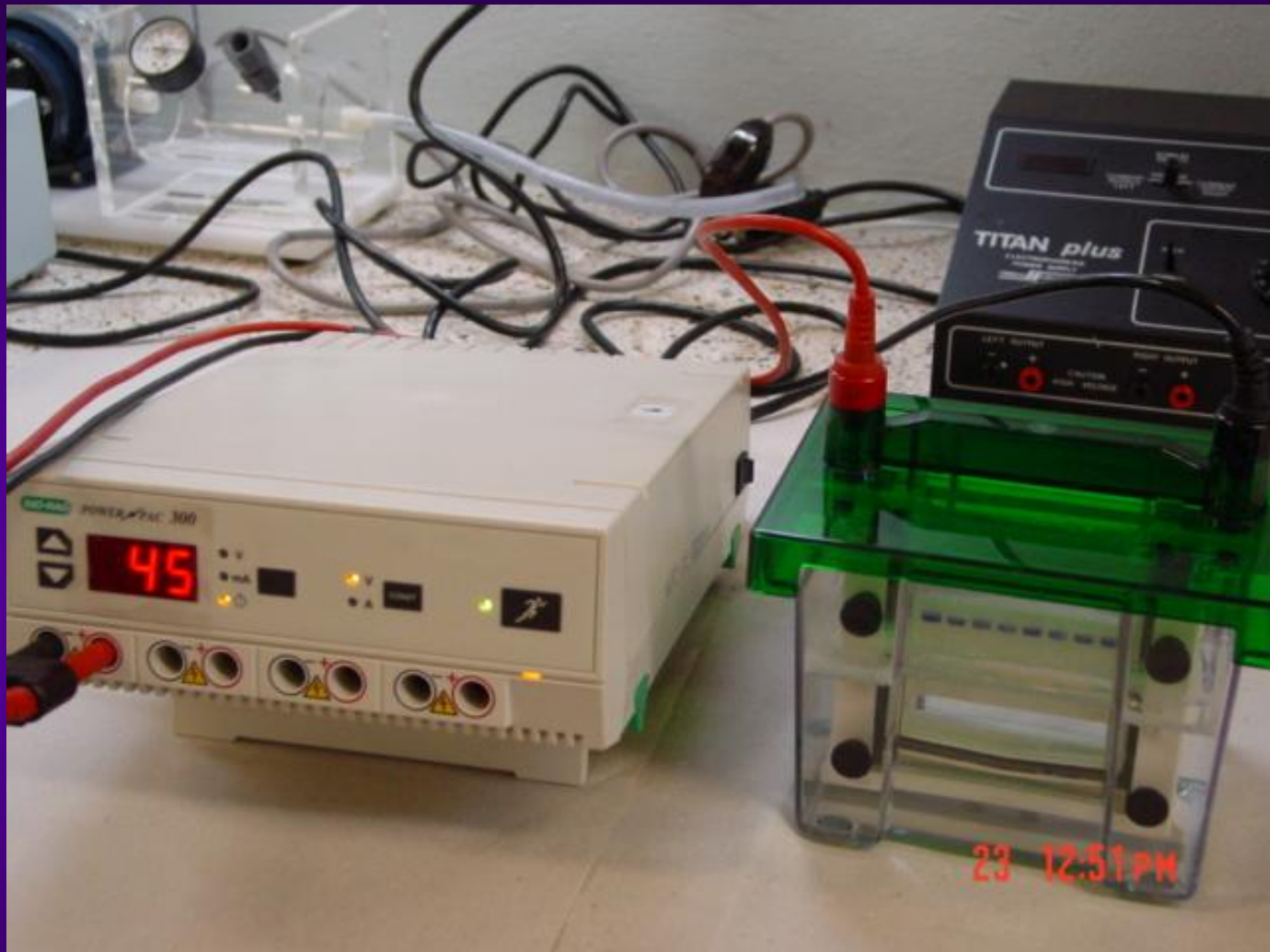
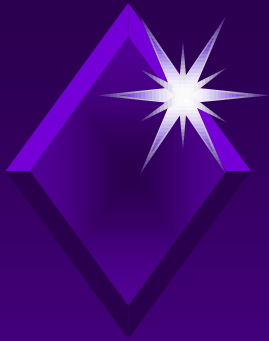
สารตัวอย่างและสารมาตรฐานอยู่ใน sample well



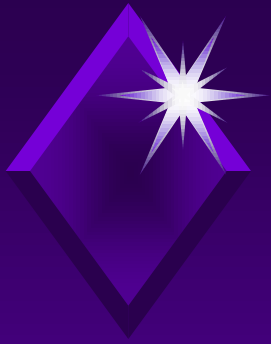
ปิดฝาบน lower buffer chamber ต่อสายขั้วไฟฟ้า
ให้ถูกต้อง



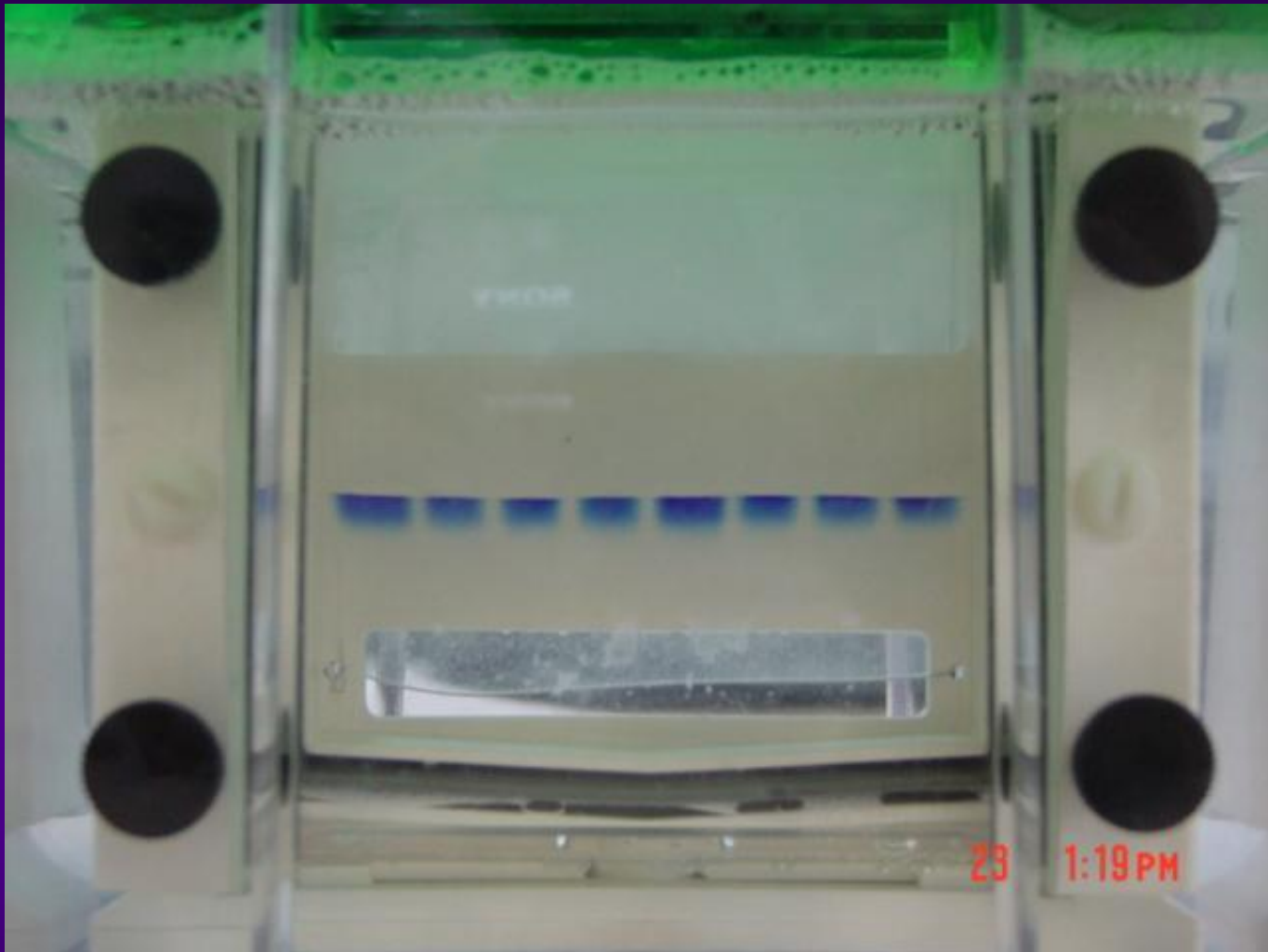
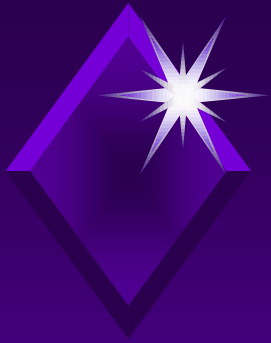
เปิดเครื่อง power supply กำหนดการทำ SDS-PAGE ที่
200 V 60 mA ต่อ 1 gel นาน 45 นาที



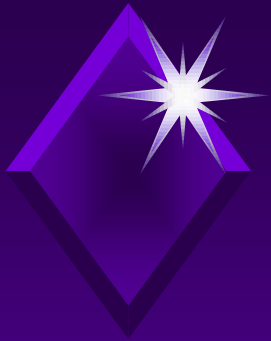
เริ่มต้นการทำ SDS-PAGE



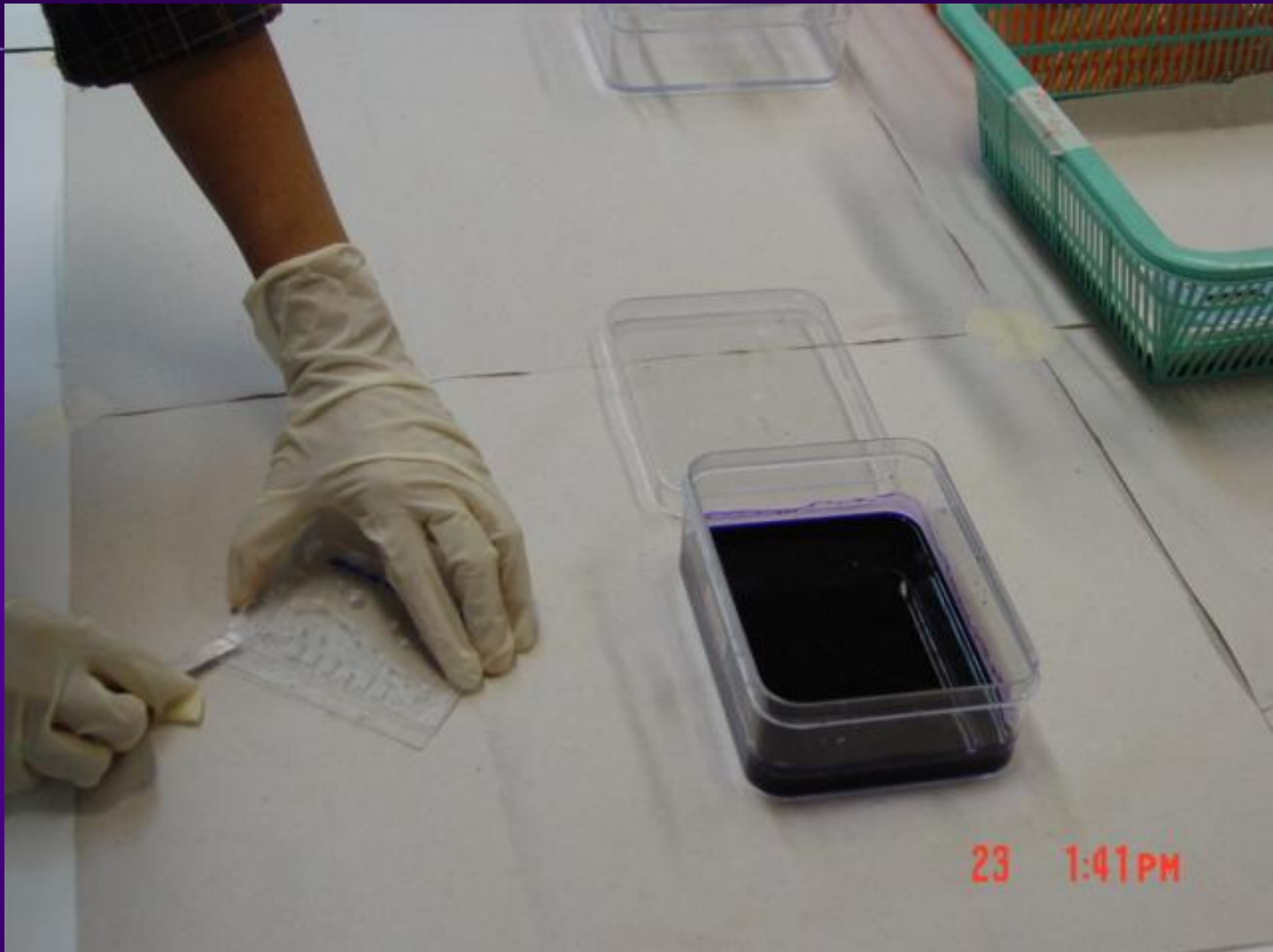
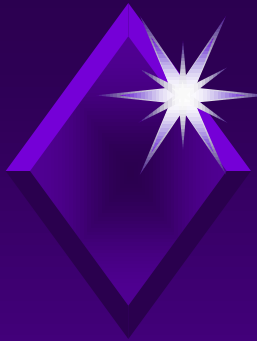
เมื่อการทำ electrophoresis ดำเนินไปจะเห็นการเคลื่อนที่ของ tracking dye เป็น band สีน้ำเงินจากขั้วลบลงสู่ขั้วบวก



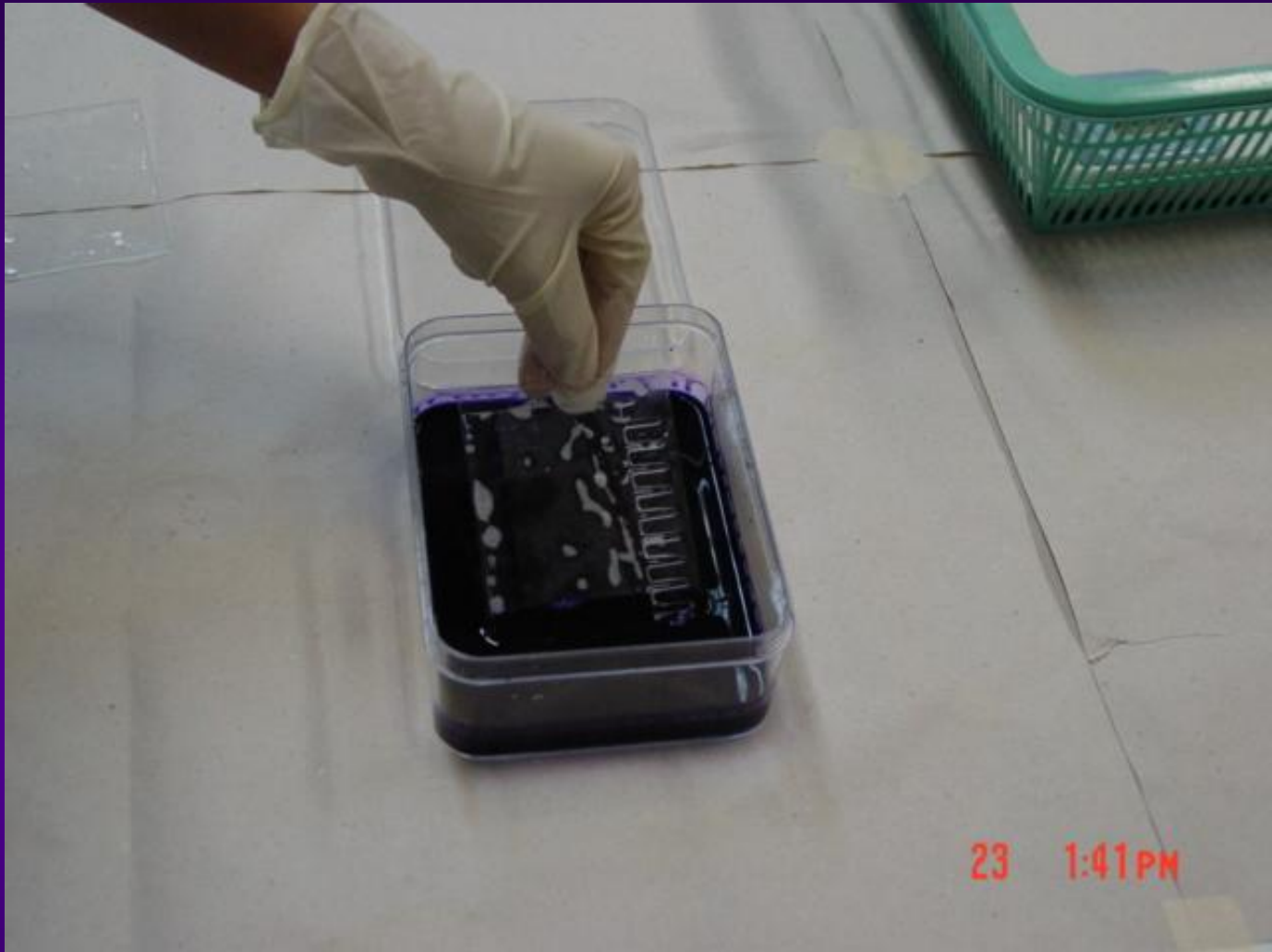
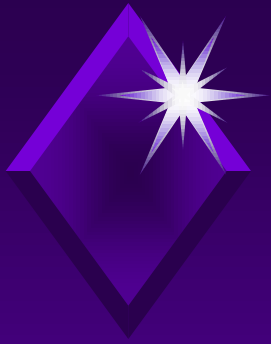
สิ้นสุดการทำ electrophoresis เมื่อ band ของ tracking dye เคลื่อนที่ห่างจากปลายล่างของ gel ประมาณ 0.5-1cm



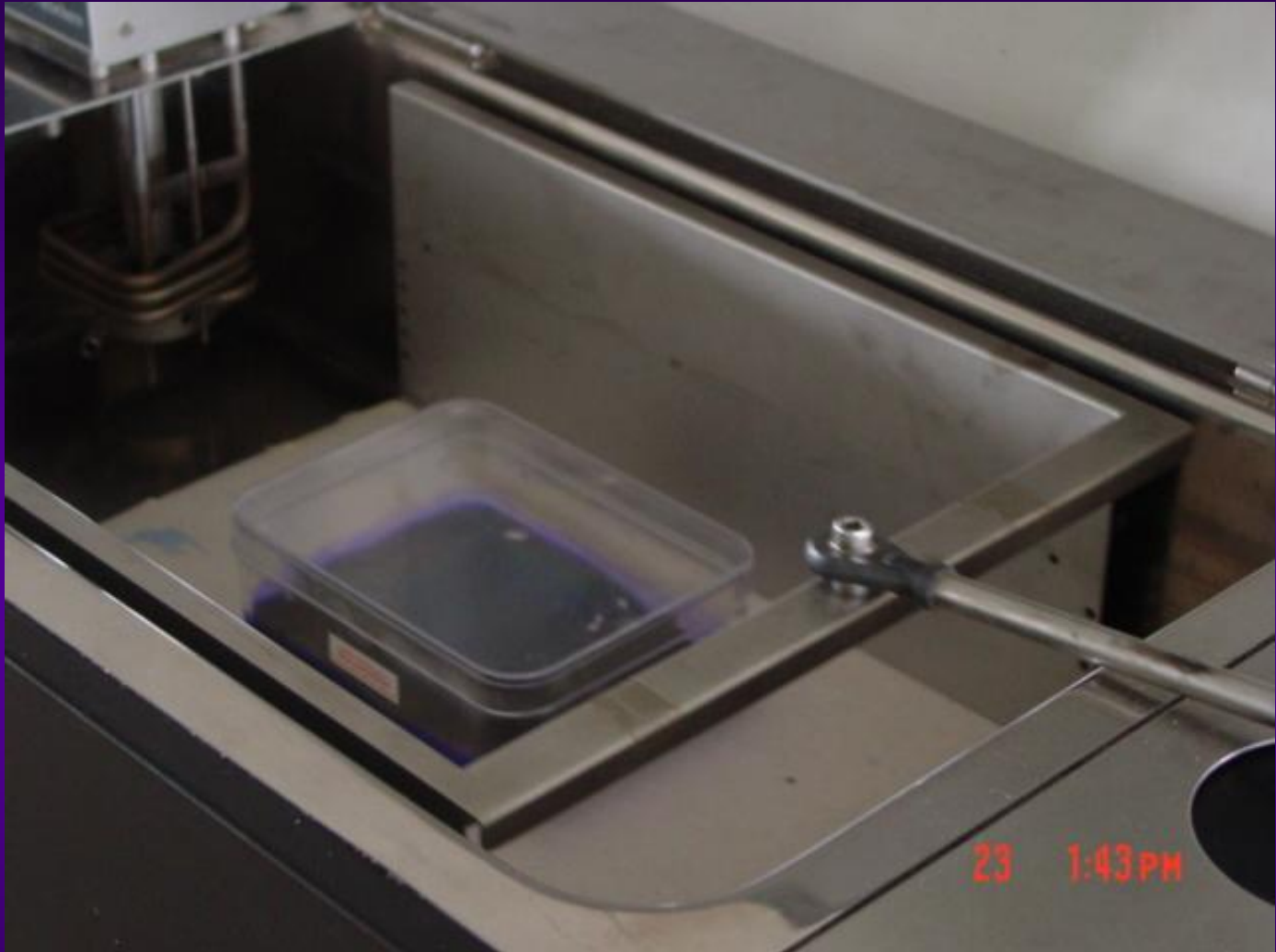
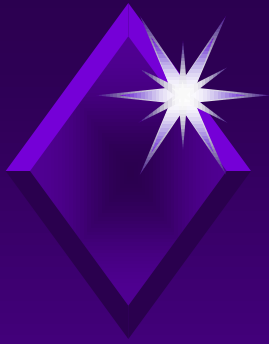
นำแผ่นกระจกออกจาก gel clamp assembly และวัดระยะทาง
การเคลื่อนที่ของ tracking dye โดยใช้ไม้บรรทัด เพื่อไปคำนวณ
หา relative mobility



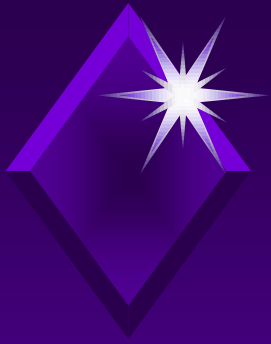
นำแผ่น gel ออกจากแผ่นกระจก



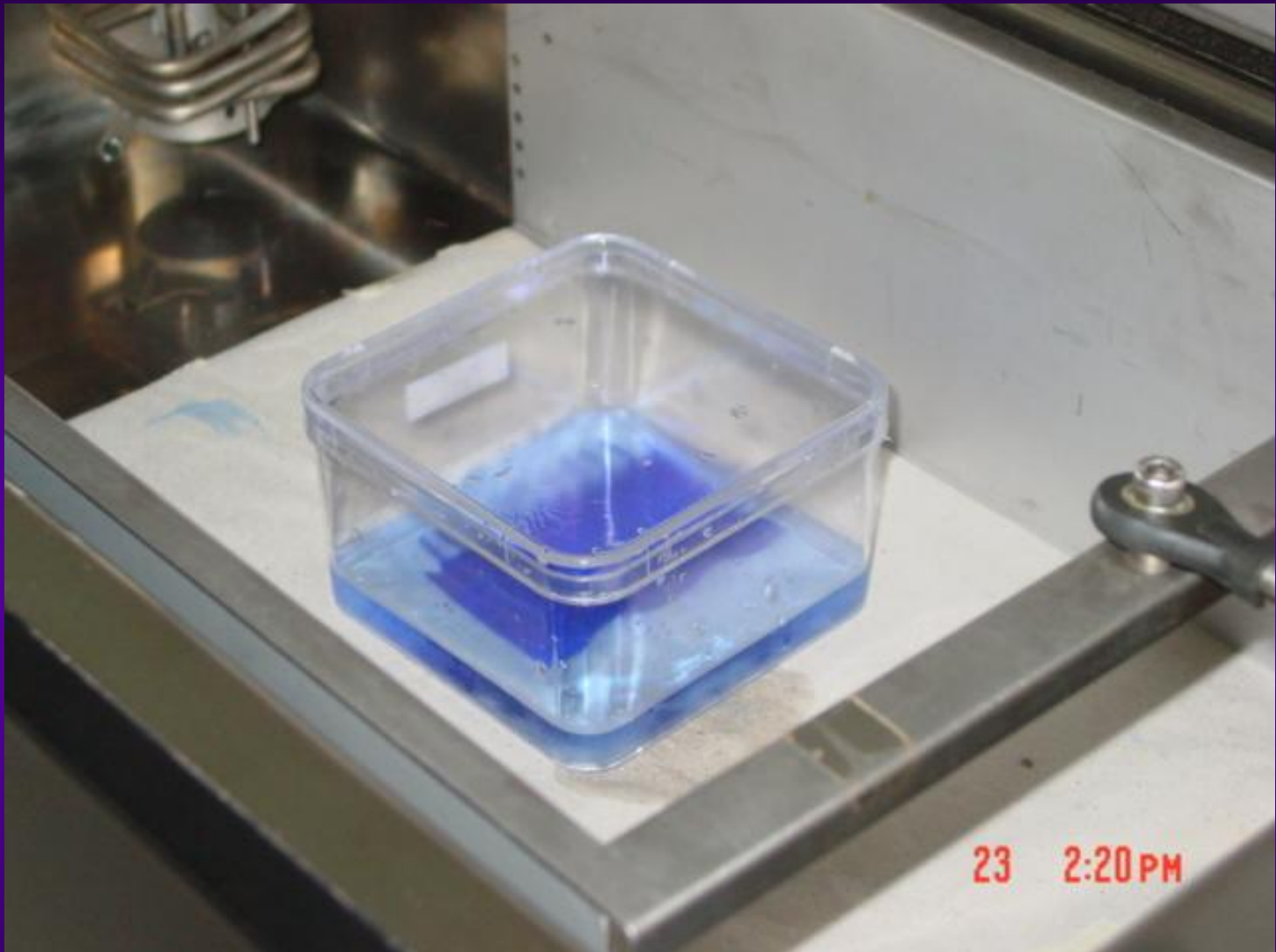
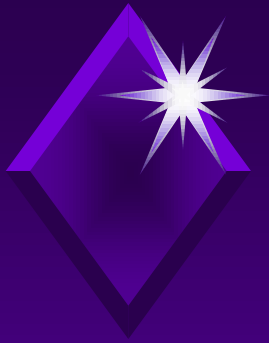
ตรึงและย้อมสีด้วยสีย้อม Coomassie blue
R-250 นาน 30 นาที



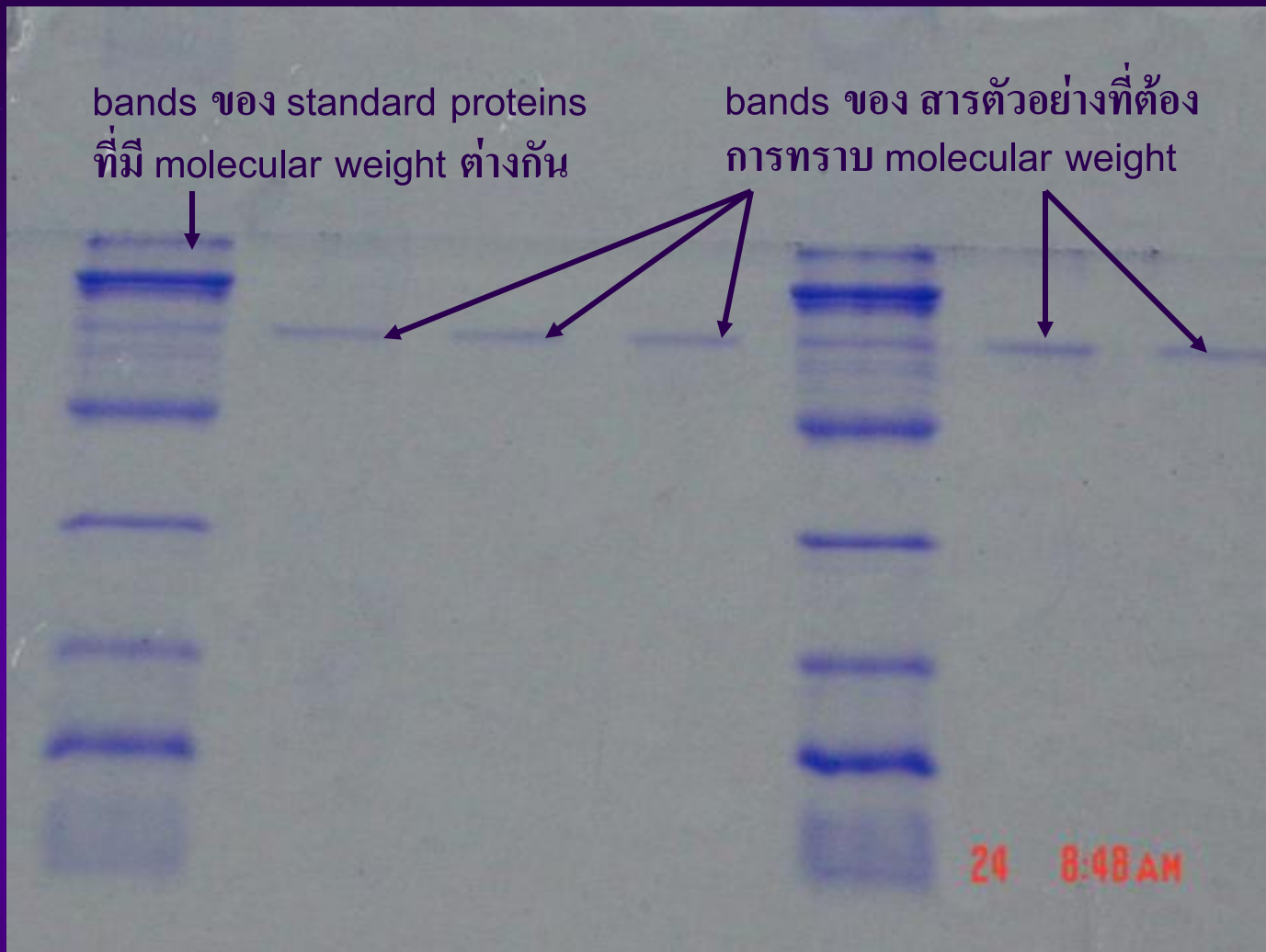
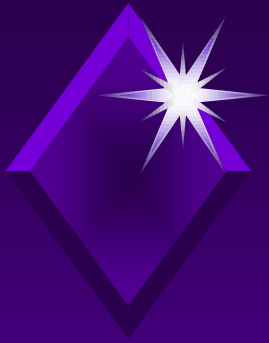
เขย่าแผ่น gel ระหว่างการตรึงและย้อมสี gel



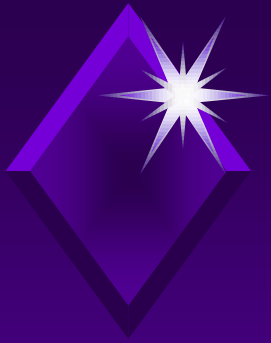
ล้างสีด้วย destaining reagent จนกระทั่งเห็น band ของ protein ชัดเจน พื้นหลัง (background) ไม่ติดสี



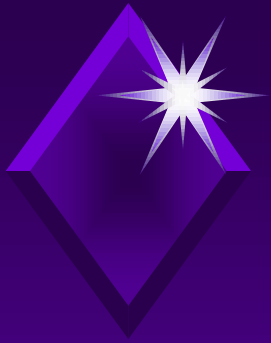
แช่ gel ระหว่างการล้างสีข้อมด้วย destaining reagent



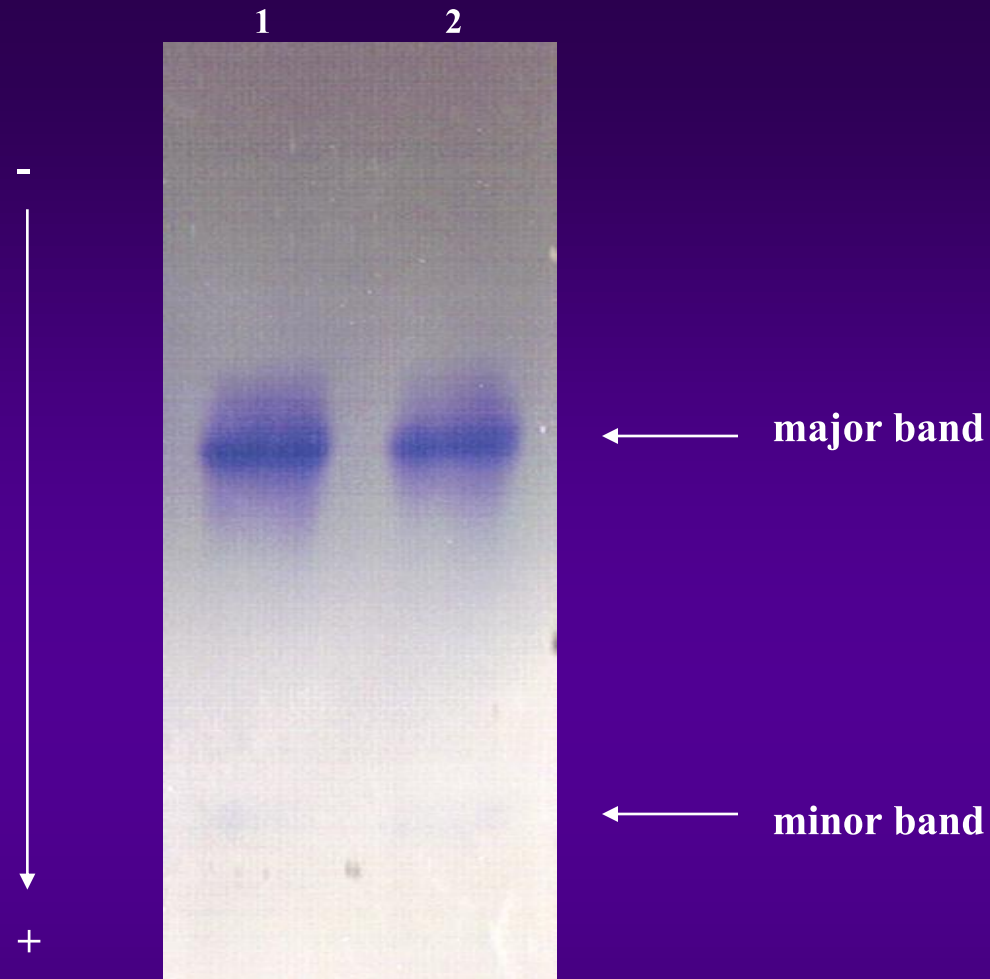
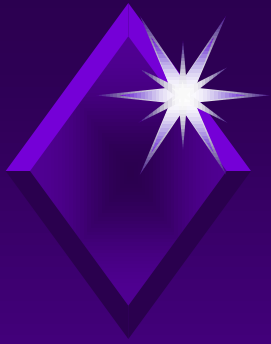
สังเกตเห็น band ของ protein ที่แยกออกจากกันตามความแตกต่างของ molecular weight วัดระยะทางการเคลื่อนที่ของแต่ละ band โดยใช้ไม้บรรทัด เพื่อไปคำนวณหา relative mobility



นำแผ่น gel ไปวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง imaging densitometer โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์



คำนวณหา molecular weight ของสารตัวอย่างโดยใช้
โปรแกรมคอมพิวเตอร์

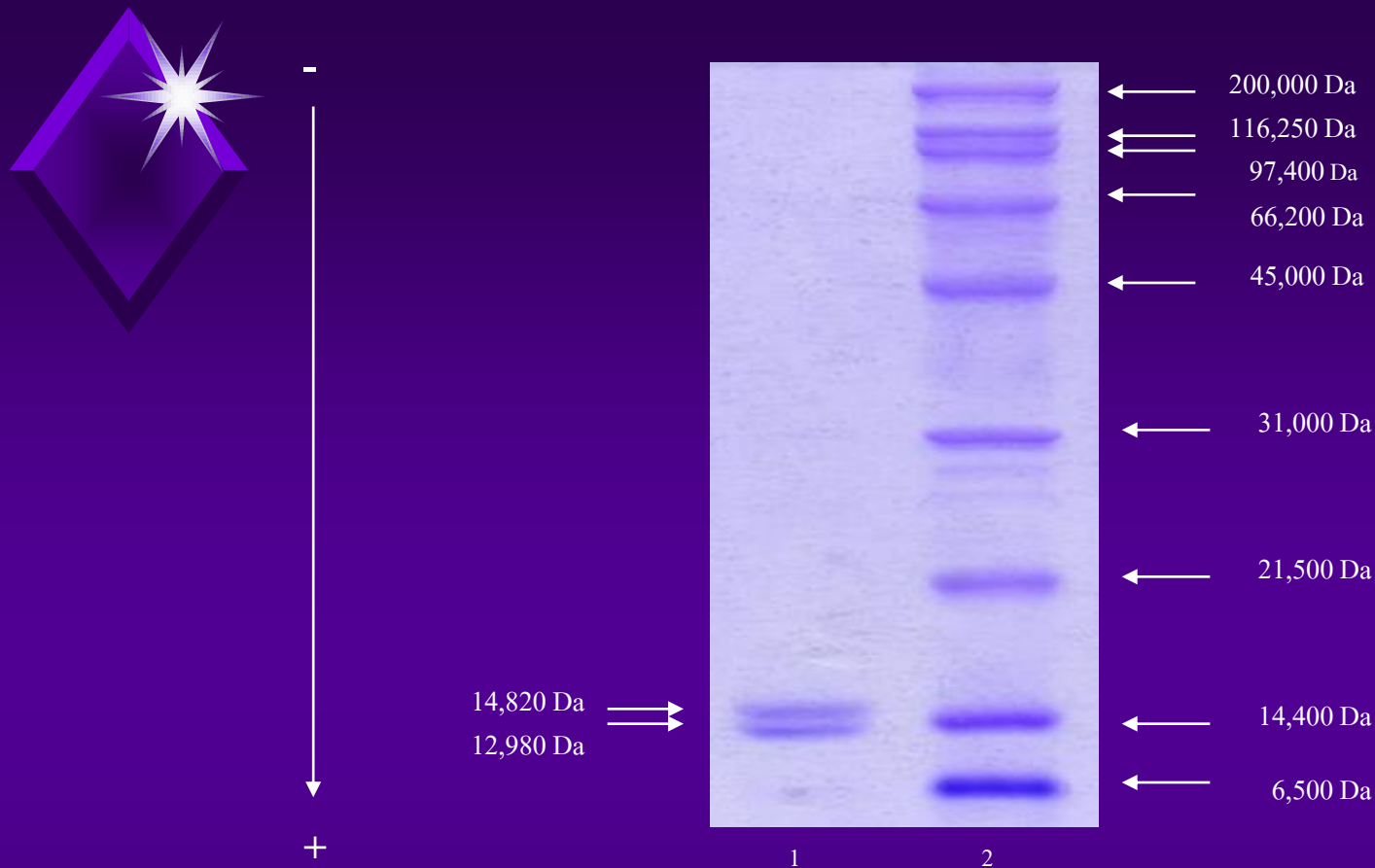


Phenotype of Hbs by native PAGE, pH 8.3, 10 % T and 2.6 % C (200 volts constant, 60 mA, 45 min).

Lane 1 - 2 were Hbs of Thai Bangkaew dogs from Hb fractions.

ที่มา : Identification and Characterization of Hemoglobin in Thai Bangkaew Dog using Chromatographic, Electrophoretic and Mass Spectrometric Techniques, Jatuporn Noosud, Sittiruk Roytrakul, Chaiwat Boonkaewwan and Apassara Choothesa,⁴⁹

Kasetsart J. (Nat. Sci.) 44(6) : 1144-1152, 2010



SDS - PAGE of denatured Hb fractions of Thai Bangkaew dogs from Sephadex column, exhibited two bands with average molecular weights of 14,820 daltons and 12,980 daltons. Lane 1 Hb subunits of Thai Bangkaew dogs, Lane 2 Protein standards (prestained broad range M.W. standard, Bio - Rad, U.S.A.) : Myosin 200,000 daltons, β - galactosidase 116,250 daltons, Phosphorylase b 97,400 daltons, Bovine serum albumin (BSA) 66,200 daltons, Ovalbumin 45,000 daltons, Carbonic anhydrase 31,000 daltons, Soybean trypsin inhibitor 21,500 daltons, Lysozyme 14,400 daltons and Aprotinin 6,500 daltons