EXPERIMENT 7
SDS-PAGE

Scanned with CamScanner

Seperation

* Experiment - Gel Electrophoresis

* موفقط لل protein كمان لل DNA

* Moving charghed Molecules in Solution → by applying an electric fitld

* الـ Speed على إيش رح تعتمد؟

① charged → كُل ما كان عليه شحنة رح يكون أسرع (سالبة)

② Shap → هل الشحنة موجودة بالخارج كالعادة ممكن كمان بالداخل؟

③ Size → M.w

---

* Sodium Dodecyl Sufate - polyacrylamide gel Electro phoresis

* used on : biochemistery - forensics - genetics and Molecular biology

to : Seperate + identify protein (according : M.w) هاد الرئيسي

---

* SDS-page

عبارة عن (Gel) يتكون من : Acrylamide ① Bisacrylamide ②

* Acrylamid يكون Monomer → production / polamarization → polymers [C-N]

* Bisacrylamid used to Make Crosslinks between polymers [N-C-N]

ينتج Gels فيه pores

* الـ Size لل pores بتعتمد على الـ (كمية Conc. الـ Acrylamide) أو الـ polymers

* كُل ما كان الـ Conc. كلما كان الـ pores size رح يكون أصغر علاقة عكسية..

* قدرته للفصل رح تكون أحسن لل Smaller protein .. أما الـ large رح يكون فصله أصعب.. لأنه صعب تمر من الـ pores لأنها ضيقة.

* كُل ما كان M.w أصغر ← بروح لخيار الـ Conc. الأعلى.

Scanned with CamScanner

* بجدا Mexture of MacroMolecals سواء DNA أو protein

* رح ينتقل من الـ N ⊖ ← P ⊕

| + Anode ← Cathode − |

* رح تكون شحنة الـ protein هي Negative

* الأصغر رح تحرق اسرع ..

* رح يطلع على الـ Gels مثل bands شرائح صغيرة

* استخدامات الـ SDS page

1. Assessment of purity of the preparation
* بدي اشوف هرك نقاوه .. هل protein واحد ولا أكثر
إذا في Mixture رح يكون في أكثر من band

2. Estimation of approximate quantity of protein → * ممكن أعرف كمية البروتين عن طريق Standard

3. Measurement of the Size of the protein → * بنقارنهم مع الـ Standard عشان أقدر ..

---

* ليه بس الـ M.W هو العامل اللي بحدد .. ؟ بالـ ← SDS page

* لأن أنا ما بشتغل على الـ protein وبعمله Electrophoresis
بعملنا denaturation ← بنضيف مواد مثل الـ β-Mercaptoethanol أو DTT
↙ بكسروا الـ diSulfide bond ← tertiary structure رح ينكسر عن طريق الـ reduction

* بنضيف (SDS) ← عليه charge N⊖ بعطي denaturation for proteine وبعمله Coating

فالبروتين بصير شحنته ⊖ net charge. ← بطل في تأثير للـ Charge

ولما عملنا Denaturation الـ Shape تغير فبطل إله أي دور وتدخل بالـ SDS

* So العامل الوحيد لهون الـ M.W

Standard Gels → two layers

1) the first Layer → top Gel → Stacking layer

pH = 6.8
Conc. = 6%
ثابت

2) Separating gel ⟷ bottom gel

pH = 8.8

ال Conc. فتغير حسب ال M.W لل protein اللي حنتي .

* High Conc. → M.W ↓
* Low Conc. → M.W ↑

Conc. = (5% - 15%)

the difference in pH 8.8 - 6.8 = 2

↓

* Sharper bands
* Higher resolution

* ليش ال Conc. بال Stacking Gel قليل ؟ لما أعطي ال Sample مجال في الفروض تتركيز البروتين

* إذا ما استخدمت ال Stacking Gels ممكن الصغيرة تعلق بالكبيرة فبتقل ال efficiency .

---

* عملية تحضير SDS-page :

* أول شي بحضر ال protein Sample ← بحضر Sample buffer → heating block at 95 C → 5m

* ما بحضر ال Sample buffer ← بجيبه Stock ← بدي بعمل dilution

5X

* 2% (W/V) SDS → Coating for protein
* 60 mM Tris/Hcl , PH = 6.8
* 25% Glycerol → denser
  * لما أحطها بال well رح تنزل أما إذا ما ضفت رح تطلع
* 14.4 mM β Merapoethanol → reducing agent → disulfide bond بكسر ال
* 1% Bromophenol blue → die → بتلون العينة عشان انتبه للعينة تتوصل منها ، + بمشي أسرع .. لو كان مو موجودة مارح انتبه إلها .

* عملية تحضير ال gel :

* 2 Glass plate → between them spacer

*Acrylamide first:
Monomer → toxic

| 37.5 — 1 |
| A — B | → Ratio

* crosslinking → N.N' — Methylene bisacrylamide

* resolving Gel :

عملية صب الجيل.

- 1.5 mL 1.5 M tris-Hcl , PH = 8.8 → Buffer for separation → 750 ML بجدد مرتين
- 2 mL 30% Acrylamide / Bisacrylamide → polyamerization. formation of pores
- 0.06 mL 10% SDS → Denaturation
  ↳ 60 ML
- 2.44 mL water → 3 ε (بنقسم) → (813) ML

بنضيفهم آخر شي.
* 5 M temed → Accelerate polymerization
* 30 M 10% Ammonium persulfate → initiate polymerization

بعد ما خلصت عملية الصب :

لما يكون طالع ونازل رح تكون ال Band متموجة. ← Leveling Gel ← n-butanol or isopropanol بختار

≈600 MM

* مجرد ما polymerizationصار خلص ، كيف رح أعرف ؟
ال Beaker الي فيه الخلطة بكون نبل فيه شوي جد ، معناها ال Gel الي بين ال Glass بريحه جد

Stacking gel : كمية أقل +
ال Conc. إله أقل

- 0.875 mL 1.0 M Tris-HCl , PH = 6.8
- 0.583 mL 30% acrylamide / pisacrylamide
- ~~0.083~~ 0.035 mL 10% SDS
- 2.007 mL water

* 5 μ → temed
* 30 μ 10% Ammonium persulfate

* insert the comb to create the wells and leave to Congeal.

يجمد.

Scanned with CamScanner

Loading Sample & running ..

(using tris , Glycine buffer)

١- أضيف ال Gel لل tank بضيف ال Running buffer

*25 mM tris

*192 mM Glycine , pH 8.8

* 0.1 % SDS → كلهم فيهم SDS

٢- remove the Comb to produce wells & load the Sample

---

* عشان أعرف ال M.W لل protein بحط M.w standards (Marker) بالأول وللآخر إذا العينات كثيرة بالأول فقط إذا العينة قليلة .

SDS-page preparation:

Stain the gel → using staing buffe

Coomassie Staining Solution بتكون من :

→ 10% Acetic Acid
→ 25% Methanol
→ 0.05 Coomassie R-250 or Bio-Safe Coomassie Staining Solution

(Acetic Acid, Methanol) → denaturation, cross links do not diffuse

وظيفة ال Coomasie بتعمل dye ← blue color ← binds protein

De-Stain the gel: → use De-staining buffer

* Glacial Acid
* Methanol

] just

أي زوائد رح بشيلها ..

See Colored bands under white lamp light.

Saja dwaikat ..♡

Scanned with CamScanner