

EXPERIMENT 7

SDS-PAGE



Separation

* Experiment - Gel Electrophoresis

DNA و protein و sugars *

* Moving charged Molecules in Solution → by applying an electric field

* Speed على إشرح تفسر؟

- ① charged → كبره ان عليه شحنة رة يكون أسرع
- ② Shap → هل الشحنة موجودة بالخارج كالمادة ممكنة كان بالداخل؟
- ③ Size → M.W

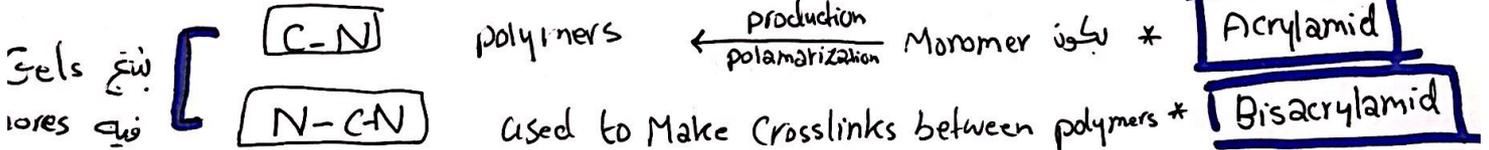
* Sodium Dodecyl Sulfate - polyacrylamide gel Electro phoresis

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

To : Separate + identify protein according: M.W
فاد الرتبة

* SDS-page

Acrylamide ① : مادة من (Gel) يتكون منها
Bisacrylamide ②



Conc. * Size و pores يعتمد على ال (كمية ال Acrylamide) أو ال polymers

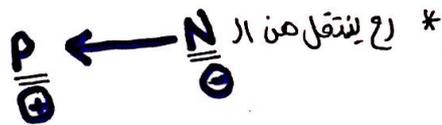
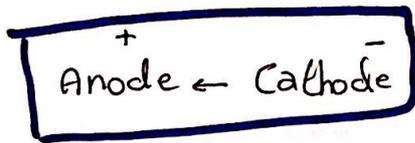
* كلما كان ال Conc. كلما كان ال pores size رة يكون أسرع علاقة طرديّة ..

* قدرته للفصل رة تكون أفضل ال Smaller protein .. أما ال Large رة يكون أفضل أهبط ..

لأن أهبط أقصر من ال pores لأن أهبط أصغر

* كلما كان M.W أهبط ← بروج خيار ال Conc. الأمثل .

protein أو DNA سواء Mixture of MacroMolecules



* مع تكون شحنة الـ protein في Negative

* الأيونات تفرق بسرعة

* مع يصلح على الـ Gels مثل bands شرع مخيرة

1 Assessment of purity of the preparation

* استخدام الـ SDS page

* بي اسوف مري نقاسه .. الـ protein بالهدو لا أكثر إذا في Mixture مع يكون في أكثر من band

2 Estimation of approximate quantity of protein

* مع أنزيم كيميائي البروتين عند مبريق الـ Standard

3 Measurement of the Size of the protein

* مع الـ Standard عند تقدير

* الـ M.W هو العامل الذي يحدد .. بار ← الـ SDS page

* لأننا نأنا ما نتعل على الـ protein و الـ Electrophoresis

بجاء لنا الـ denaturation ← بضيف مواد مثل الـ β-Mercaptoethanol أو الـ DTT

reduction على الفرق الـ tertiary structure ← الـ disulfide bond كيكسروا الـ مع ينكسر

* بضيف الـ (SDS) ← على الـ charge N⁻ بيفي denaturation for protein و بضيف الـ Coating

Net charge. فالبوتين بغير شحنة -
← بدل في تأثير الـ Charge

ولما على الـ Denaturation الـ Shape تغير فيصل الـ الـ أي دور و تخلص بالـ SDS

* الـ M.W هو العامل الذي يحدد الـ M.W

Stacking gel :

+ کمیہ آقل
Conc. ۱۱ آقل

- 0.875 mL 1.0 M Tris-HCl, pH = 6.8
 - 0.583 mL 30% acrylamide / bisacrylamide
 - ~~0.083~~ 0.035 mL 10% SDS
 - 2.007 mL water
- * 5 μ → Temed
- * 30 N 10% Ammonium persulfate
- * insert the comb to create the wells and leave to Congral .
۱۳.

Loading Sample & running ..

(using Tris, Glycine buffer)

Running buffer - 1
Tris buffer

* 25 mM Tris

* 192 mM Glycine, pH 8.8

← SDS ~~في~~ ~~في~~ ← * 0.1% SDS

Remove the Comb to produce wells & load the sample - r

* عينات ارف ال (M.W) لا protein بجا M.w standards (Marker) بالاول والاخر اذ العينات كثيرة بالاول فقط اذا العينة قليلة.

SDS - page preparation:

Stain the gel → using staining buffer

Coomassie : يكون

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

denaturation
cross links
do not diffuse

binds protein ← blue color ← dye جاز Coomassie ال عينات

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

* Glacial Acid
* Methanol] just

... زي زائج بيبيلين ..

See Colored bands under white lamp light.

Saja dwaiikat .. ♡