ارزیابی پروتئین‌ها با روش SDS-PAGE

Evaluation of proteins by SDS-PAGE method

آیدین حسن‌زاده

Hasanzadeh.i@arc-ordc.ir

کارشناس ارشد بیماری شناسی گیاهی، مرکز تحقیقات کاربردی و تولید بذر، شرکت توسعه کشت دانه‌های روغنی

تکنیک SDS-PAGE یک روش کم هزینه، سریع و تکرارپذیر جهت مطالعه اولیه پروتئین‌ها می‌باشد. معمولا از این روش برای بررسی مراحل خالص‌سازی، محاسبه مقدار نسبی و تعیین وزن مولکولی پروتئین‌ها بکار می‌رود. اساس این روش تفکیک پروتئین‌ها بر اساس وزن مولکولی است. در تکنیک SDS-PAGE به دلیل استفاده از سدیم دودسیل سولفات (SDS) و ژل پلی‌اکریل‌آمید، قدرت تفکیک پروتئین‌ها مناسب می‌باشد. شوینده‌ای آنیونی SDS با اتصال به نواحی هیدروفوب پروتئین‌ها، آنها را دناتوره می‌کند. مولکول SDS با اتصال به پروتئین‌ها، بار طبیعی آنها را می‌پوشاند و توزیع یکنواختی از بارهای منفی روی آن ایجاد می‌نماید، در نتیجه، جداسازی پروتئین‌ها تنها بر اساس وزن مولکولی آنها صورت می‌گیرد. جهت خطی نمودن مولکول‌های پروتئینی و از بین بردن باندهای دی‌سولفید، آنها را به مدت پنج دقیقه در محلول SDS و حرارت ۹۵ درجه سلسیوس قرار می‌دهند. در این هنگام با بارگذاری پروتئین‌ها در الکتروفورز، جداسازی آنها تنها بر اساس وزن مولکولی صورت می‌پذیرد.

پروتئین‌ها دارای چهار ساختار متفاوت می‌باشند که واحدهای سازنده همه آنها، اسیدهای آمینه هستند. واحد اندازه‌گیری پروتئین، دالتون می‌باشد.

در روش SDS-PAGE برای ارزیابی پروتئین از الکتروفورز عمودی استفاده می‌گردد. اساس الکتروفورز، ایجاد میدان الکتریکی است.

از انواع ژل مورد استفاده در مطالعات زیست‌شناسی مولکولی می‌توان به نشاسته، آگارز و پلی‌اکریل‌آمید اشاره نمود که در روش SDS-PAGE از ژل پلی‌اکریل‌آمید استفاده می‌شود.

ژل پلی‌اکریل‌آمید از دو جز اصلی شامل اکریل (C_3H_5NO) و بیس اکریل ($C_7H_{10}N_2O_2$) تشکیل شده است. پلی‌اکریل‌آمید به دو روش Native-PAGE و Denatured-PAGE ساخته می‌شود. در روش Native-PAGE از SDS در هیچ‌یک از مراحل استفاده نمی‌شود و ساختار دوم پروتئین حفظ می‌گردد ولی در Denatured-PAGE از SDS در تهیه بافر و ژل استفاده شده و در نتیجه ساختار دوم پروتئین توسط SDS شکسته می‌شود.

روش Denatured-PAGE همان روش SDS-PAGE است. در این روش با افزودن SDS و گرما دادن، پروتئین‌ها ساختارهای دوم و سوم خود را از دست داده و به‌صورت خطی درمی‌آیند و بدین ترتیب بر

اساس وزن و اندازه از هم جدا می‌شوند. پروتئین در این حالت دارای بار منفی شده و در نتیجه در فرآیند الکتروفورز به سمت قطب مثبت بسته به اندازه و وزن مولکولی در درون ژل حرکت کرده و از یکدیگر تفکیک می‌شوند.

در روش SDS-PAGE، ژل اکریل‌آمید از دو بخش ژل بالا (Stacking gel) و ژل پائین (Seprating gel) تشکیل می‌شود (شکل ۱). غلظت اکریل‌آمید این دو ژل متفاوت بوده و در ژل پائین غلیظ‌تر است، بنابراین در ژل بالا که غلظت آن کم است (معمولا ۵ درصد)، پروتئین‌ها فقط به شکل خطی درآمده و مرتب می‌شوند تا در ژل پائین با غلظت بیشتر از هم تفکیک شوند. درصد ژل بالا و پائین متغیر بوده و به اندازه پروتئین موردنظر بستگی دارد، هر مقدار وزن مولکولی پروتئین مورد بررسی بزرگ‌تر باشد می‌بایست ژل با درصد کمتر تهیه شود.

جدول ۱. مواد و مقادیر مورد نیاز برای تهیه کوماسی‌بلو

ماده	مقدار
متانول	۴۰۰ میلی‌لیتر
کوماسی‌بلو	۱ گرم
اسید استیک	۱۰۰ میلی‌لیتر
آب مقطر	۵۰۰ میلی‌لیتر

اجزای تشکیل‌دهنده ژل اکریل‌آمید شامل آب‌مقطر (که خلوص آن بسیار مهم است)، مخلوط اکریل و بیس‌اکریل، تریس ۱/۵ مولار (Tris, pH 8.8)، SDS ۱۰ درصد، آمونیوم پرسولفات (APS) ۱۰ درصد و TEMED می‌باشد. در تهیه ژل باید توجه نمود که APS و TEMED باید در آخرین مرحله به سایر مواد اضافه شوند، زیرا به سرعت سبب پلیمره (سفت) شدن ژل خواهند شد.

برای خروج گازها و جلوگیری از تشکیل حباب در ژل، می‌بایست از پمپ خلا استفاده نمود.

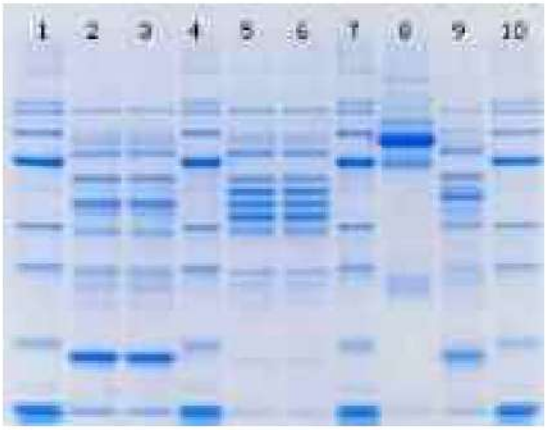
در ساخت ژل ابتدا باید ژل پائین تهیه و به کاست منتقل گردد. برای یکنواخت شدن سطح ژل و کاهش تماس آن با هوا، روی ژل می‌توان مقدار کمی ایزوپروپانول افزود و پس از پلیمره شدن ژل، آن را تخلیه نمود. سپس ژل بالا تهیه شده و به داخل کاست و روی ژل پائین افزوده و شانه در محل خود جایگذاری می‌شود. پس از تهیه ژل پلی‌اکریل‌آمید و بافر و خارج کردن شانه از روی ژل، کاست حاوی ژل به داخل تانک منتقل و بافر به داخل تانک افزوده می‌گردد. در این مرحله نمونه‌های پروتئین بارگذاری می‌شوند. ولتاژ دستگاه الکتروفورز برای ژل بالا در حدود ۵۰ ولت با شدت جریان حدود ۲۰-۱۸ میلی‌آمپر تنظیم می‌شود، زیرا همان‌طور که پیش‌تر گفته شد، در ژل بالا قطعات پروتئین می‌بایست به آرامی به شکل خطی درآیند تا در ژل پائین از هم تفکیک شوند. با رسیدن قطعات پروتئین به ژل پائین (با Dye قابل تشخیص است)، ولتاژ دستگاه را می‌توان تا ۱۲۰-۱۰۰ ولت افزایش داد.

شکل ۱. نمایی از ژل پلی‌اکریل‌آمید

یکی از روش‌های رنگ‌آمیزی ژل استفاده از کوماسی‌بلو (Coomassie blue) است (جدول ۱). پس از اتمام مرحله الکتروفورز، ژل با احتیاط خارج و به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه در محلول کوماسی‌بلو غوطه‌ور می‌گردد. سپس ژل را از محلول کوماسی‌بلو خارج و برای رنگ‌بری، به مدت ۶۰-۴۵ دقیقه در محلول دی‌استین (Diacetin) قرار می‌گیرد (جدول ۲). با پایان این مرحله، ژل آماده ارزیابی و تفسیر نتایج خواهد بود (شکل ۲).

جدول ۲. مواد و مقادیر مورد نیاز برای تهیه دی‌استین

ماده	مقدار
متانول	۲۰۰ میلی‌لیتر
اسید استیک	۱۰۰ میلی‌لیتر
آب مقطر	۷۰۰ میلی‌لیتر



شکل ۲. نمایی از ژل رنگ‌آمیزی شده با کوماسی بلو

منبع

Schägger, H., & Von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Analytical biochemistry, 166(2), 368-379.