ภาคผนวก จ

การหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนโดยการทำเจลอิเลกโตรโฟรีซิส

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. Acrylamide/bisacrylamide (30%T, 2.67%C)

เตรียมโดยสารละลาย Acrylamide 29.2 กรัม และ Bisacrylamide 0.8 กรัม ในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร กรองสารละลายผ่านกระดาษกรอง (Whatman No. 1) เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะเก็บไว้ใช้ได้ประมาณ 1 เดือนหลังจากเตรียม

2. 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8

ละลาย Tris-base 18.17 กรัม ในน้ำกลั่นประมาณ 60 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้เป็น 8.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1 นอร์มอล ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. 0.5 M tris-HCl, pH 6.8

ละลาย Tris-base 6.06 กรัมในน้ำกลั่นประมาณ 60 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้เป็น 6.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1 นอร์มอล ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. 10% SDS

ละลาย SDS 10 กรัม ในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

5. Stock sample buffer

0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	1.2 มิลลิลิตร
10% SDS	2.0 มิลลิลิตร
40% Glycerol	1.0 มิลลิลิตร
0.5% Bromophenol blue	0.5 มิลลิลิตร

น้ำกลั่น 4.8 มิลลิลิตร

6. SDS reducing buffer

เตรียมโดยผสม 50 ไมโครลิตร ของ 2-mercaptoethanol ใน stock sample buffer 0.95 มิลลิลิตร ก่อนจะใช้

7. 5x electrode (Running) buffer, pH 8.3

Tris-base	9.0 กรัม
Glycine	43.2 กรัม
SDS	3.0 กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

8. Catalyst

8.1 10% Ammonium persulphate (APS) เตรียมก่อนที่จะใช้

8.2 TEMED (N, N, N', N' -tetramethyl ethylenediamine)ใช้ TEMED ได้โดยตรงโดยไม่ต้องมีการทำให้เจือจาง

9. ชุดโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล Low Molecular Weight

Low Molecular Weight (LMW) Calibration kit (Phamacia) ประกอบด้วย phosphorylase b, bovine serum albumin, ovalbumin, carbonic anhydrase, trypsin inhibitor และ α-lactalbumin มีน้ำหนักโมเลกุล 94,000, 67,000, 43,000, 30,000, 20,100 และ 14,400 ดาลตันตามลำดับ

10. การเตรียมสารละลายโปรตีนสำหรับทำโพลีอะคริลาไมด์เจล อิเล็กโตรฟอรีซีส

10.1 การเตรียมโปรตีนสำหรับ nondenaturing-PAGE

โดยละลายโปรตีนตัวอย่างใน 10 mM Tris-HCl, pH 6.8 ซึ่งประกอบไปด้วย 2 mM EDTA, 2.5% กลีเซอรอล และ 0.01% โบรโมฟีนอลบลู (bromophenol blue) ให้ได้ความเข็มข้นของโปรตีนประมาณ 4-6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

10.2 การเตรียมโปรตีนสำหรับ SDS-PAGE

โดยละลายโปรตีนตัวอย่างใน 10 mM Tris-HCl, pH 6.8 ซึ่งประกอบไปด้วย 2.5% SDS, 1% β-mercaptoethanol, 2.5% กลีเซอรอล และ 0.01% โบรโมฟีนอลบลู ให้ได้ความเข็มข้นของโปรตีนประมาณ 4-6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 4 นาที

11. การย้อมสีแถบโปรตีน

ย้อมสีแถบโปรตีนด้วยโคมาสซีบริลเลียนท์บลู (Coomassie brilliant blue R-250) ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (Staining solution) (โดยละลาย 0.1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 ใน 40 % Methanol และ 10 % Acetic acid เมื่อสีละลายแล้ว ให้กรองด้วยกระดาษกรอง เก็บสารละลายที่ได้ในขวดสีชา) โดยใช้เวลาในการแช่แผ่นเจลประมาณ 2-3 ชั่วโมง และล้างสีส่วนเกินด้วยสารล้างสี (Destaining solution) (เตรียมโดยละลาย 40% Methanol กับ 10% Acetic acid) โดยเปลี่ยนสารละลายที่ใช้ล้างสีส่วนเกินออกหลายๆครั้งจนสามารถเห็นแถบโปรตีนได้ชัดเจน

12. ส่วนประกอบของเจลสำหรับการทำโพลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรฟอรีซิส

ตารางภาคผนวก จ1 ส่วนประกอบของเจลสำหรับ SDS-PAGE

ส่วนประกอบของเจล	Stacking gel 4%	Separating gel 12%
30% acrylamide – 0.8% bisacrylamide (ml)	0.65	2.0
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8 (ml)	1.25	-
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8 (ml)	-	1.25
10% SDS (μl)	50	50
10% ammonium persulfate (μl)	25	25
TEMED (μl)	5	5
Distill water (ml)	3.02	1.67
Total volume (ml)	5.0	5.0

ตารางภาคผนวก จ2 ส่วนประกอบของแผ่นเจลสำหรับ Native-PAGE

ส่วนประกอบของเจล	Stacking gel	Separating gel	
	4%	10%	15%
30% acrylamide – 0.8% bisacrylamide (ml)	0.52	0.595	0.7
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8 (ml)	1.00	-	-
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8 (ml)	-	0.455	0.455
10% ammonium persulfate (μl)	20	19.5	17.5
TEMED (μl)	4.0	1.25	1.25
Distill water (ml)	2.416	0.665	0.56
Total volume (ml)	4.0	1.75	1.75