

**TRƯỜNG CAO ĐẲNG LƯƠNG THỰC THỰC PHẨM
KHOA CÔNG NGHỆ SINH HỌC
BỘ MÔN CÔNG NGHỆ PROTEIN - ENZYME**

BÀI THỰC HÀNH CÔNG NGHỆ PROTEIN – ENZYME

Ngành:

CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Trình độ: Cao đẳng

Số giờ thực hành: 30 giờ

Năm 2015

Bài 1: TÁCH CHIẾT VÀ THU NHẬN BROMELIN TỪ DỨA VÀ ENZYME α -AMYLASE TỪ CANH TRƯỜNG VI KHUẨN BACILLUS SUBTILIS

1. Nguyên tắc

Độ hòa tan của dung dịch protein phụ thuộc vào nhiều yếu tố, ví dụ sự tích điện của phân tử protein, mức độ hydrat hóa, nhiệt độ, ... khi thay đổi các yếu tố này sẽ làm ảnh hưởng đến giá trị điện tích của protein và ảnh hưởng đến lớp vỏ hydrat của chúng, khi đó các phân tử sẽ kết tụ lại với nhau để tạo thành khối lớn, tách khỏi dung dịch, thường gọi là kết tủa protein.

- Các dung môi hữu cơ như aceton, ethanol ... có hằng số điện môi nhỏ, làm ngăn cản sự phân tán của các protein trong môi trường và xảy ra sự kết tủa protein.
- Các muối trung tính như NaCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$... vừa làm trung hòa điện (do các ion tác động tương hỗ với các nhóm điện tích trái dấu), vừa loại bỏ lớp vỏ của phân tử keo làm cho các phân tử protein kết tụ lại với nhau.

Các dung môi hữu cơ và các muối trung tính là những tác nhân kết tủa thuận nghịch protein, khi loại bỏ các tác nhân trên thì protein tan lại trong nước.

2. Nguyên liệu và hóa chất

Nguyên liệu: Quả thơm tươi, vỏ còn xanh.

Canh trường vi khuẩn *Bacillus Subtilis*

Hóa chất: Ethanol.

3. Thực hành

3.1. Thu nhận Bromelin từ dứa

Chọn quả thơm tươi, vỏ còn xanh, gọt bỏ phần vỏ bên ngoài, cắt nhỏ rồi cho vào máy xay sinh tố xay nát (không cho thêm nước), đổ ra trên vải màn, vắt thật kỹ, lấy nước đem ly tâm 4000 vòng/phút loại bỏ cặn, thu được nước thơm trong.

Cho từ từ Ethanol 96⁰ (đã được trữ lạnh) vào dịch nước thơm đã thu được theo tỉ lệ: Nước thơm : ethanol = 1:4

Khuấy đều, để yên trong tủ lạnh 1 giờ, sau đó đem li tâm 15 phút với tốc độ 4000 vòng/phút, loại bỏ phần dịch nổi bên trên, thu lấy phần kết tủa.

Đem phần kết tủa thu được, sấy ở 40⁰C trong khoảng từ 1 – 2 giờ để loại bỏ hoàn toàn lượng cồn, thu được chế phẩm bromelin thô.

3.2. Thu nhận enzyme α -amylase từ canh trường bacillus subtilis

Cân 10g canh trường vi khuẩn bacillus subtilis, cho vào 100 ml nước cất, để trên máy lắc trong 1 giờ.

Lọc qua vải màn, loại bỏ xác, dịch lọc đem li tâm 4000 vòng/phút trong 15 phút, loại bỏ cặn, thu lấy dịch α -amylase.

Cho từ từ ethanol 96⁰ (đã được trữ lạnh) vào dịch α -amylase mới thu được theo tỉ lệ: dịch α -amylase : ethanol = 1:3

Sau khi li tâm, loại bỏ dịch nổi bên trên, thu lấy kết tủa.

Lượng kết tủa thu được, đem sấy ở 40⁰C trong khoảng 1 – 2 giờ, thu được chế phẩm α -amylase thô.

Bài 2: XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG PROTEIN TRONG CÁC CHẾ PHẨM THU ĐƯỢC

2.1. Xác định hàm lượng protein bằng phương pháp Lowry

Dùng để xác định lượng protein có trong 1 gam chế phẩm enzym (hay 1ml chế phẩm enzym lỏng), từ đó xác định hoạt tính riêng của enzym trên 1mg protein enzym. Phương pháp Lowry cũng được sử dụng để định lượng protein trong các nguyên liệu khác.

• Nguyên tắc :

Hầu hết các protein đều chứa Tyrosin và Tryptophan. Hàm lượng của những acid amin này tùy thuộc vào loại protein, vì vậy những protein cùng loại với nhau sẽ chứa hàm lượng acid amin này như nhau.

Khi cho tác dụng protein với thuốc thử Folin sẽ tạo thành một phức chất có màu, màu này tỷ lệ với hàm lượng Tyrosin và Tryptophan, vì thế có thể dùng phương pháp so màu để xác định hàm lượng protein. Phương pháp này có độ nhạy cao, cho phép phát hiện được protein trong dung dịch ở nồng độ $1\mu\text{g}/\text{cm}^3$.

• Hoá chất :

Dung dịch Albumin 0,1% : Cân chính xác 0,1 g Albumin pha với nước cất thành 100ml dung dịch.

Dung dịch A : Cân 2g Na_2CO_3 hoà tan trong NaOH N/10 thành 100ml dung dịch.

Dung dịch B : Cân 0,5g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ hòa tan trong dung dịch Citrat Natri 1% thành 100ml dung dịch.

Dung dịch C : Chỉ pha để dùng ngay trong ngày gồm hỗn hợp của 2 dung dịch A và B theo tỷ lệ 49/1.

Thuốc thử Folin : Cách pha (theo tài liệu)

• Cách tiến hành :

Hút 0,4 ml dung dịch có chứa protein, cho vào ống nghiệm sạch và sấy khô, thêm vào đó 2 ml dung dịch C, lắc đều và để yên ở nhiệt độ thường trong 10 phút. Sau đó thêm vào 0,2 ml thuốc thử Folin, lắc đều trong 5-10 phút, thêm nước cất cho đủ 5ml, đem đo mật độ quang ở bước sóng 750 nm hay 500 nm.

• Dựng đường chuẩn:

Ta thực hiện xây dựng đường chuẩn với một loại protein tinh khiết có sẵn, thông thường sử dụng Albumin tinh khiết. Hút 0,4ml dung dịch Albumin chuẩn có nồng độ theo thứ tự: 0; 50; 100; 150; 200; 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ vào các ống nghiệm sạch và sấy khô đã đánh số sẵn. Thực hiện phản ứng tương tự như đã ghi ở phần trên. Muốn vậy ta thực hiện như bảng sau để có được các dung dịch Albumin chuẩn có nồng độ như trên :

Ống nghiệm số	0	1	2	3	4	5
Nồng độ protein ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	0	50	100	150	200	250
Dung dịch Albumin 0,1% (ml)	0	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5
Nước cất (ml)	10	9,5	9,0	8,5	8,0	7,5

Vẽ đồ thị biểu diễn sự biến thiên của mật độ quang (ΔOD) theo nồng độ protein chuẩn ($\mu\text{g}/\text{ml}$).

• Tính kết quả :

Từ đồ thị chuẩn, trên cơ sở giá trị mật độ quang (trục tung) đo được của mẫu thí nghiệm có chứa protein cần xác định, ta suy ra hàm lượng protein của mẫu cần đo (tương ứng với giá trị trục hoành).

2.2. Xác định hàm lượng protein bằng phương pháp Bradford

Nguyên tắc:

Các protein khi phản ứng với xanh Coomassie (Coomassie Brilliant Blue – CBB) sẽ hình thành hợp chất màu có khả năng hấp thụ ánh sáng ở bước sóng 595nm, cường độ màu tỉ lệ với nồng độ protein trong dung dịch. Phương pháp này có độ nhạy cao cho phép phát hiện tới vài ug protein/ml, dễ thực hiện và tiết kiệm thời gian.

Hóa chất:

Thuốc nhuộm Bradford: Hòa tan 100mg thuốc nhuộm Coomassie Brilliant Blue vào 50ml ethanol 96⁰, thêm 100ml H₃PO₄ 85%, dẫn nước đến 1000ml.

Dung dịch Albumin 100μg/ml cân 10 mg pha với nước cất thành 100 ml.

Tiến hành thí nghiệm:

Ống nghiệm	1	2	3	4	5	6	7
Dung dịch Albumin 0,01%	0	1	2	4	6	8	10
Nước cất	10	9	8	6	4	2	0
Nồng độ protein (μg/ml)	0	10	20	40	60	80	100

Hút 1ml dung dịch protein vừa pha loãng như bảng trên, thêm vào 5ml thuốc nhuộm Bradford, lắc đều. Sau 10 phút đem đo OD tại bước sóng 595 nm.

Vẽ đồ thị biểu diễn sự biến thiên mật độ quang (ΔOD) theo nồng độ protein chuẩn ($\mu g/ml$)

- Xác định hàm lượng protein trong mẫu:

tương tự hút 1ml protein cần phân tích, thêm 5ml thuốc nhuộm Bradford, để yên 10 phút, đem đo OD tại bước sóng 595 nm.

Từ đường chuẩn suy ra hàm lượng protein cần phân tích.

Bài 3: XÁC ĐỊNH HOẠT TÍNH ENZYME PROTEASE (PHƯƠNG PHÁP ANSON)

1. Nguyên tắc:

Cho protease tác dụng với cơ chất là casein (hoặc hemoglobin), sản phẩm tạo thành là các peptid ngắn hay acid amin, trong các loại acid amin, tyrosine chiếm đa số. Xác định tyrosine bằng phản ứng màu với thuốc thử folin, từ đó xác định hoạt tính enzyme protease theo định nghĩa:

Hoạt tính của protease được biểu thị là số micromole tyrosine sinh ra do thủy phân Casein bởi 1ml dung dịch hay 1 mg hỗn hợp chứa protease trong 1 phút ở điều kiện chuẩn (35,5^oC, pH 7.6)

2. Hoá chất:

- Dung dịch Na₂HPO₄ 1/15M: hoà tan 5,96g Na₂HPO₄.12H₂O trong nước thành 250 ml
- Dung dịch KH₂PO₄ 1/15M: hoà tan 0,9072g KH₂PO₄ trong nước thành 100ml
- Dung dịch đệm Sorensen 1/15M, pH 7.6: trộn 177ml dung dịch Na₂HPO₄ 1/15M và 23 ml dung dịch KH₂PO₄. đo và chỉnh lại pH cho đúng.
- Dung dịch Casein 1%: đun sôi cách thủy 1g casein trong đệm Sorensen đến tan hoàn toàn rồi sau đó định mức bằng Sorensen cho đủ 100ml.
- Dung dịch TCA (trichloro acid) 10%: hoà tan 10g TCA trong nước cho đủ 100ml
- Dung dịch NaOH 0,5N: hoà tan 10g NaOH trong nước cho đủ 500 ml
- Dung dịch HCl 0,2N: trộn 4,25ml HCl đậm đặc với nước cho đủ 250 ml.
- Dung dịch tyrosin 20mM/l: khuấy nghiền 0,118 g tyrosin trong dung dịch HCl 0,2N vừa đủ 50ml
- Dung dịch tyrosin chuẩn 1mM/l: pha loãng 5 ml tyrosine 20mM/l trong HCl 0,2N thành 100 ml

3. Tiến hành thí nghiệm:

Dụng đường chuẩn tyrosin:

Ống nghiệm	0	1	2	3	4	5
Dung dịch tyrosin chuẩn 1mM/l	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
Dung dịch HCl 0,2N (ml)	1	0.8	0.6	0.4	0.2	0
Dung dịch NaOH 0,5N (ml)	2	2	2	2	2	2
Thuốc thử Folin (ml)	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
Lượng tyrosin (micromol)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1

Lắc và để yên 10 phút đem đo mật độ quang ở bước sóng 660 nm
Vẽ đồ thị biểu diễn sự biến thiên mật độ quang (OD) theo lượng tyrosin ở các ống.

Xác định lượng tyrosin trong dung dịch nghiên cứu:

Dung dịch hoá chất	Ống nghiệm	
	Thử thật (3 ống)	Thử không (3 ống)
Casein 1% (ml)	5	5
TCA 10% (ml)	0	5
Dịch enzyme mẫu (ml)	1	0
Lắc đều và giữ ở 35,5°C, trong 30 phút		
TCA 10% (ml)	5	0
Dịch enzyme mẫu (ml)	0	1
Lọc, lấy 1ml dịch lọc thực hiện phản ứng màu		
Dịch lọc (ml)	1	1
Dung dịch NaOH 0.5N (ml)	2	2
Thuốc thử Folin (ml)	0.6	0.6
Lắc đều, để yên 10 phút, đo OD ở bước sóng 660 nm		

4. Cách tính:

Hoạt tính protease:

$$HT (UI) = \frac{x.V.K}{t.v}$$

x: số μ mol tyrosin suy ra từ đường chuẩn

V: tổng thể tích hỗn hợp phản ứng enzyme (11 ml)

v: thể tích dịch lọc đem phân tích (1ml)

K: độ pha loãng mẫu

t: thời gian phản ứng (30 phút)

1 UI (Anson) = 1 micromol Tyrosine/ml/phút ;

hoặc = 1 micromol/mg/phút

Bài 4 : XÁC ĐỊNH HOẠT TÍNH ENZYME α -AMYLASE THEO PHƯƠNG PHÁP HEINKEL, 1956.

1. Nguyên tắc:

Amylase xúc tác phản ứng thủy giải tinh bột thành đường (đường đơn, đường đôi hay dextrin phân tử lớn). Lượng tinh bột còn lại phản ứng màu với iod. Xác định lượng tinh bột bị thủy giải, từ đó tính ra hoạt tính amylase theo định nghĩa:

Hoạt tính amylase được biểu thị là số mg tinh bột bị thủy giải bởi 1ml dịch enzyme (hay 1mg nguyên liệu chứa enzyme) trong 1phút ở điều kiện chuẩn 50⁰C, pH 6)

2. Hóa chất:

- Dung dịch NaH_2PO_4 0,05M: hòa tan 1,9502g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ trong nước thành 250 ml.
- Dung dịch Na_2HPO_4 0,05M: hòa tan 0,8962g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ trong nước thành 50 ml.
- Dung dịch đệm phosphate 0,05 M pH 6: trộn 87,7ml dung dịch NaH_2PO_4 0,05M và 12,3ml dung dịch Na_2HPO_4 0,05M thêm 100ml nước cất, đo lại pH bằng máy pH
- Dung dịch tinh bột 1% pha trong pH 6: lấy 50ml dung dịch đệm phosphat 0,05M pH 6 đem đun sôi. Cân 1 g tinh bột tan, hòa vào một ít đệm, khuấy đều, đổ vào dung dịch đệm đang sôi, vừa khuấy vừa đun sôi trong 3 phút cho đến khi dung dịch trong suốt. Định mức tới 100ml bằng dung dịch đệm.
- Dung dịch Iod: 1g I_2 và 2g KI, thêm nước thành 100ml, bảo quản lạnh. Khi dùng pha loãng 500 lần.
- Dung dịch HCl 1N: 8,4ml HCl đậm đặc pha thành 100ml
- Dung dịch HCl 0,1N: pha loãng từ dung dịch HCl 1N
- NaCl 0,1%

3. Tiến hành thí nghiệm:

Dụng đường chuẩn tinh bột:

Ống nghiệm	1	2	3	4	5	6
Tinh bột 10mg/ml (ml)	0	1	2	3	4	5
Dung dịch đệm (ml)	5	4	3	2	1	0
Nồng độ tinh bột (mg/ml)	0	2	4	6	8	10

Hút 0,1ml dung dịch từ các ống nghiệm thêm 0,9 ml đệm, thêm vào 9 ml dung dịch I_2KI đã pha loãng 500 lần.

Đem so màu ở bước sóng 560nm.

Vẽ đồ thị biểu thị mối tương quan giữa nồng độ tinh bột và giá trị ΔOD .

Phản ứng enzyme

	Thử thật (3 ống)	Thử không (3 ống)
Tinh bột 1% (ml)	1	1
NaCl 0,1% (ml)	1	1
Đệm Phosphate pH 6 (ml)	2	2
Lắc đều, để ổn nhiệt ở 50°C trong 5 phút		
Dung dịch enzyme (ml)	1	0
Để ổn nhiệt ở 50°C, 10 phút		
Dung dịch HCl 0.1N (ml)	5	5
Dung dịch enzym (ml)	0	1

- Hút 1ml dung dịch từ các ống nghiệm trên. Thêm vào mỗi ống nghiệm 9ml dung dịch I₂KI đã pha loãng 500 lần.
- Lắc đều, đem đo OD tại bước sóng 560nm.

Công thức tính toán: Hoạt độ α -Amylase trong 1ml dịch enzym

$$\frac{X * K}{t * v}$$

Trong đó :

- X : Số mg tinh bột suy ra từ đường chuẩn.
- K : Hệ số pha loãng.
- v : Thể tích enzym cho vào hỗn hợp phản ứng enzym
- t : Thời gian enzym phản ứng

BÀI 5. ĐÁNH GIÁ ĐỘ SẠCH CỦA CÁC CHẾ PHẨM ENZYME THU ĐƯỢC BẰNG PHƯƠNG PHÁP ĐIỆN DI CÓ SDS

1. Nguyên tắc

Trong phương pháp này các protein được phản ứng với các chất hoạt động bề mặt mang điện tích âm là SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) để tạo thành một phức hợp mang điện tích âm, và sẽ di chuyển về cực dương của điện trường. thêm vào đó một chất khử là mercaptoethanol hoặc dithithreitol (DTT) để phá vỡ cầu nối S-S của protein (và các tiểu đơn vị của chúng). Nhờ đó sự di chuyển trong gel của các phân tử protein trong cùng một điều kiện chỉ phụ thuộc vào kích thước, những phân tử có kích thước lớn sẽ di chuyển chậm hơn so với những phân tử có kích thước nhỏ.

Mục đích của phương pháp điện di được sử dụng để đánh giá độ tinh sạch và xác định phân tử lượng của protein, người ta thường so sánh với một thang phân tử chuẩn là hỗn hợp protein có trọng lượng phân tử khác nhau đã biết.

Tốc độ di chuyển của protein trong phương pháp điện di phụ thuộc vào:

- pH của môi trường
- Hình dáng và trọng lượng phân tử
- Cường độ của điện trường
- Nhiệt độ
- Tính chất của giá mang (giấy, acetate, cellulose ...) sẽ ảnh hưởng ít nhiều lên sự di chuyển của protein.
- Thời gian điện di.

Lớp gel gom mục đích làm cho các protein trong mẫu được gom lại tạo thành một băng mỏng, lớp gel phân tích sẽ tạo ra các băng protein có kích thước khác nhau từ cùng một điểm xuất phát ban đầu.

2. Dụng cụ và hóa chất

Dụng cụ:

Bộ nguồn điện di, hộp điện di, dụng cụ làm gel (tấm kính, lược, kẹp ...). Pipet, máy khuấy từ, máy hút chân không.

Cấu tạo của một khung gel: Gel được chuẩn bị trong một khoảng hẹp, được tạo thành bởi hai tấm kính, phân cách nhau bởi một tấm đệm bằng chất dẻo hoặc nguyên liệu thích hợp, miếng đệm dài hơn tấm kính khoảng 1cm chiều rộng và có độ dày 0,5 mm, các giếng nơi mẫu cho vào được tạo thành từ các răng lược chạy dài ngang đỉnh gel có cùng chiều dày với miếng đệm, các răng lược dài khoảng 1 cm, rộng 2 – 10mm, khoảng cách giữa các răng khoảng 3mm.

Hóa chất:

1. Dung dịch acrylamide hay dung dịch đơn hợp

Acrylamide (FW 71,08) 30g

Bis-acrylamide 0,8g

Dẫn nước đến 100ml. Bảo quản ở 4⁰C nơi tối trong 3 tháng.

Dung dịch này độc có khả năng gây ung thư nên phải mang găng tay trong khi làm thí nghiệm.

2. Đệm gel phân tách (stock separating gel) hay 4X đệm gel lỏng (1,5Tris-Cl, pH8,8)

Hòa tan 3,63g Tris (FW 121,1) trong 15ml H₂O.

Chỉnh pH = 8,8 bằng HCl 4N.

Thêm nước cất vào cho đủ 20ml. Bảo quản nơi tối ở 4⁰C trong 3 tháng.

3. Đệm stacking gel

Hòa tan 1,5g Tris (FW 121,1) trong 20ml H₂O.

Chỉnh pH = 6,8 bằng HCl 4N.

Thêm nước cất vào cho đủ 25ml. Bảo quản nơi tối ở 4°C trong 3 tháng.

4. Dung dịch SDS 10% (có thể bảo quản trong 6 tháng)

5. Dung dịch Amonium Persulphate 10% (dùng trong ngày)

6. TEMED

7. Dung môi pha mẫu

Đệm gel Stacking	25ml
Dung dịch SDS 10%	4ml
Glycerol	2ml
Bromophenol Blue	2mg
b-mercapto ethanol	1ml

Dẫn nước đến 10ml, bảo quản ở -20°C trong 6 tháng

8. Gel phủ lòng (0,375M tris-HCl 0,1% SDS pH8,8)

Đệm stacking gel	25ml
SDS 10%	1ml

9. Đệm điện di (pH 8,3)

Tris(FW 121,1)	3,028g
Glycine	14,413g
SDS	1g

Dẫn nước đến 1000ml. Dung dịch không cần kiểm tra lại pH, bảo quản trên 1 tháng ở nhiệt độ phòng.

10. n-butanol bão hòa nước.

n-butanol	50ml
H ₂ O	5ml

Lắc đều, cho vào bình lỏng, để yên sẽ tạo thành 2 pha, pha trên là n-butanol bão hòa nước.

11. Dung dịch nhuộm protein

Coomasie blue G-250	0,6g
Acid acetic	100ml

Thêm nước cho đủ 1000ml. Dung dịch chứa trong chai có màu, bảo quản ở nhiệt độ phòng.

12. Dung dịch rửa màu

Acid acetic	70ml
Methanol	50ml

13. Dung dịch cố định màu nhanh

Isopropanol	250ml
Acid acetic	100ml

Thêm nước cho đủ 1000ml

Tiến hành thí nghiệm theo các bước sau:

- Bước 1: chuẩn bị mẫu

Mẫu khô hoặc dung dịch được hòa tan trực tiếp trong dung môi pha mẫu sao cho có nồng độ 0,5 – 1,5 mg protein/ml, đun sôi cách thủy trong 5 phút, để nguội.

- Bước 2: chuẩn bị gel để điện di

Trước hết ta cần biết được chiều dài, chiều rộng và chiều dày của khuôn gel để tính được thể tích gel cần điều chế để tránh lãng phí.

Giả sử cần điều chế 30ml dung dịch gel để điện di, phải cần các dung dịch gốc theo tỉ lệ sau:

Bảng: Pha chế hỗn hợp dung dịch gel điện di

Nồng độ (%)	5	7,5	10	12,5	15
Dung dịch acrylamide (ml)					
Đệm gel Stacking (ml)					
SDS 10% (ml)					
H ₂ O (ml)					
Cho vào một Erlen có nhánh nối với một máy hút chân không , vừa hút vừa khuấy bằng máy khuấy từ cho đến khi hết bọt khí .					
Ammonium Persulphate (μl)	150	150	150	150	150
TEMED (μl)	10	10	10	10	10
Lắc nhẹ cho tan hết					

Bước 3; cho gel điện di vào khuôn đúc gel

Cho gel đặc vào khuôn đúc gel, cho đến khi cách chân răng lược khoảng 3 – 5mm.

Đổ lên mặt trên của gel đặc 300μl n-butanol bão hòa để tránh hiện tượng oxid hóa ngăn cản sự polymer hóa của gel.

Sau 1-2 giờ đã polymer hóa xong và đông đặc lại , nghiêng đổ n-butanol ra ngoài, tráng ngay lại bằng dung dịch phủ gel lỏng (khoảng 0,3ml).

Thêm vào 0,5ml dung dịch phủ gel lỏng để cố định gel.

Bước 4: chuẩn bị gel Stacking

Để có 10ml dung dịch gel stacking, tiến hành như sau:

Dung dịch Acrylamide	1,32ml
Đệm Stacking	2,49ml
SDS 10%	99ml
H ₂ O	6,09ml
Khuấy từ và hút chân không để loại bọt khí	
Ammonium persulphate	50,1ml
TEMED	4,95ml

Lắc nhẹ cho tan hết.

Bước 5: Điện di

Đổ dung dịch phủ trên gel điện di ra và cho 0,5ml gel stacking vừa điều chế xong để tráng bề mặt của gel, đổ bỏ.

Đổ cho đầy gel stacking vào và đặt lược vào để thành các giếng . Chú ý không để tạo bọt khí dưới các răng lược. Để gel cố định ít nhất 60 phút.

Nhẹ nhàng lấy lược ra khỏi gel, tránh làm hỏng các vách ngăn cách.

Tráng lại giếng bằng dung dịch điện di, sau đó đổ bỏ dung dịch điện di.

Đặt gel đúng trong hộp điện di , thêm dung dịch điện di vào hộp điện di , bơm 5-10μl có nồng độ khoảng 1μg/μl mẫu protein đã được xử lý bằng dung dịch pha mẫu vào giếng. Đóng điện và tiến hành điện di.

Sau khoảng 1 giờ, khi vạch chỉ thị xuống gần đến đáy của gel, tắt điện và lấy gel ra nhuộm.

Bước 6: Nhuộm và đọc kết quả

Đặt gel trong dung dịch cố định màu nhanh trong 30 phút, thỉnh thoảng lắc nhẹ.

Chuyển gel qua dung dịch nhuộm protein trong vài giờ , thỉnh thoảng lắc nhẹ đến khi nào các vạch màu xuất hiện lên.

Cuối cùng cho gel vào dung dịch tẩy màu , dung dịch này được thay 2 lần trong 1 ngày đến khi nào gel trong.

Gel hoàn tất có thể được bảo quản trong acid acetic 7% hoặc nước.