

## Akrylamidová elektroforéza (SDS PAGE, Mini-Protean II, Bio-Rad ) proteinů tělních tekutin:

### barvení gelů

Gely budou barveny stříbrem podle Kirkebiho (Kirkeby et al. 1993). Výhodou metody je její citlivost, obarví 2-10 ng proteinu / band oproti 0,1-1 $\mu$ g u Coomassie Brilliant blue (např. podle návodu Marshak et al. 1996, Bollag et al. 1996) nebo Amido černi (viz Hoefer Scientific Instruments – Protein electrophoresis applications guide, Bollag et al. 1996).

2 gely obarvit Coomassie Brilliant Blue a dva stříbrem (porovnání citlivosti)

### Barvení stříbrem:

1. **40% etanol, 10% kyselina octová** **10 min.**  
5 ml kyseliny octové + 20,8 ml 96%etanolu + voda do 50 ml
2. **0,05% glutaraldehyd, 0,01% formaldehyd, 40% etanol** **5 min.**  
20,8 ml 96% etanolu + 0,1 ml 25% glutaraldehydu + 12,5  $\mu$ l 40% formaldehydu,  
doplnit do 50 ml vodou
3. **96% etanol** **20 min.**
4. **destilovaná voda** **20 min.**
5. **0,5% Farmerův zeslabovač ( 30% ferrikyanid draselný, 60% thiosíran sodný, 10% uhličitan sodný)** **2,5 min.**  
75 mg ferrikyanidu draselného + 150 mg thiosíranu sodného + 25 mg uhličitanu sodného (bezvodý, stejně jako v dalších krocích) do 50 ml vody
6. **destilovaná voda** **30 min.**
7. **0,1% dusičnan stříbrný v destilované vodě** **20 min.**  
50 mg do 50 ml vody
8. **opláchnout gel vodou**
9. **2,5% uhličitan sodný v destilované vodě** **5 min.**  
1,25 g uhličitanu sodného do 49 ml vody
10. **opláchnout gel vodou**
11. **2,5% uhličitan sodný v 0,02% formalínu** **3 x 2,5min.**  
3,75 g uhličitanu sodného + 75  $\mu$ l formaldehydu + 147 ml vody
12. **opláchnout gel vodou**
13. **1% kys.octová** **5 min.**  
500  $\mu$ l do 49,5 ml vody
14. **destilovaná voda, opláchnout, pak v ní uchovávat**

### **Barvení Coomassie Brilliant Blue:**

- **30-60 min. v barvicím roztoku** - 0,07 % Coomassie Brilliant Blue R 250; 7,5 % kyselina octová a 50 % metanol (2,5 g Coomassie Brilliant Blue R, 455 ml methanolu, 455 ml destilované vody, 90 ml ledové kyseliny octové)
- **po obarvení se gel odbarví cca 30 min. ve směsi metanolu, vody a kyseliny octové v poměru 5:5:1** (455 ml methanolu, 455 ml destilované vody, 90 ml ledové kyseliny octové)