

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

### Roztoky a pufr:

**akrylamid + N, N' - methylenbisakrylamid (30:0,822):** 0,0822 g bis na 10 ml 30% akrylamidu.  
Přidat amberlit (vyváže kyselinu akrylovou).

**1,5M Tris-Cl pH 8,8:** 18,171 g Tris, 0,298 g EDTANa<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, přidat asi 80ml dH<sub>2</sub>O, upravit pH na 8,8 pomocí HCl, doplnit do 100 ml.

**0,5M Tris-Cl pH 6,8:** 6,057 g Tris, 0,298 g EDTANa<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, přidat asi 60ml dH<sub>2</sub>O, upravit pH na 6,8 pomocí HCl, doplnit do 100 ml.

**running pufr:** 14,4 g glycin, 3 g Tris, 1 g SDS, doplní se na 1000 ml dH<sub>2</sub>O, pH se upraví na 8,3.

**vzorkový pufr:** 3,03 g TRIS, 0,37 EDTA, 24,98 sacharóza, 1,85 g SDS, 0,015 bromfenolová modř, vše do 50 ml dH<sub>2</sub>O

<b>Rozpis na 2 gely</b>	<b>10% (separační)</b>	<b>5% (hřebínkový)</b>
akryl+bis (30:0,822)	3,25	2,45 (akryl + bis 32:032)
0,5M Tris-Cl, pH 6,8		3,75
1,5M Tris-Cl, pH 8,8	2,5	
10% SDS	0,1	
H <sub>2</sub> O	4,1	8,65
10% amonium persulfát	0,05	0,08
TEMED	0,005	0,015
<b>celkem</b>	<b>10 ml</b>	<b>15 ml</b>

1. Sestavíme nalévací stojánek. **Jedno sklo je menší, druhé větší, pozor na jejich správnou orientaci, při nalévání je menší směrem ven!** Připravíme separační gel, amonium persulfát (vždy čerstvý) a TEMED se přidá jako poslední. Nalejeme separační gel zvolené koncentrace (asi 2 cm pod horní okraj) a opatrně převrstvíme 1:3 pufrům 8,8 : H<sub>2</sub>O. Necháme tuhnout při laboratorní teplotě cca 45 min.
2. Po dané době převrstvení odstraníme filtračním papírem.
3. Nalejeme 5% hřebínkový gel a zasuneme hřebínek. Pod jamkami by mělo být minimálně 0,5 cm hřebínkového gelu. Dáváme pozor, aby nebyly na dně jamek bublinky. Necháme polymerizovat, možno skladovat déle jak týden v lednici.
4. Příprava vzorků:
  1. krok: 10 µl vzorku + 490 µl 4x ředěného pufru pH 6,8 (ředění 50x)

2. krok: 10  $\mu$ l 50x ředěného vzorku + 10  $\mu$ l SAMPLE pufru + 7  $\mu$ l 2-merkptoethanol + 73  $\mu$ l 4x ředěného pufru pH 6,8

Inkubace vzorků na vodní lázni 5 min /90°C

- nanáší se 10  $\mu$ l.

5. Umístíme gely do elektroforetické vany a vzorky nanese do jednotlivých jamek v hřebínkovém gelu. Do spodního anodového prostoru nalejeme Running pufr (bude potřeba až 700 ml). Do horního katodového prostoru je třeba použít vždy čerstvý running.
6. Připojíme elektroforetickou vanu ke stejnosměrnému zdroji proudu. Na aparaturu (Bio-Rad) přivedeme napětí 200 V asi po dobu jedné hodiny (nebo 130V asi dvě hodiny, program TV-H, nutné nastavit čas, ale lze kdykoliv vypnout po vyjetí čela..., zdroj drží V, mA a W nenastavujeme), dokud zóna bromfenolové modři nedoputuje ke spodnímu okraji gelu.
7. Po sjetí rozmontujeme držáky gelu, spacers opatrně vytáhneme. Spacerem odřízneme hřebínkový gel.
8. Fixace: 300 ml 96%EtOH + 100 ml kys. octová do 1000 ml dH<sub>2</sub>O