

- **Roztoky a pufry**

- akrylamid + N, N'- methylenbisakrylamid**

- (30:0,822): 0,0822 g bis na 10 ml 30% akrylamidu. Přidat amberlit (vyváže kyselinu akrylovou). Skladovat při 4°C.

- 1,5M Tris-Cl pH 8,8**

- 18,171 g Tris

- 0,298 g EDTANa₂ · 2H₂O,

- přidat asi 80ml dH₂O, 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 EDTANa₂ · 2H₂O, přidat asi 60ml dH₂O, upravit pH na 6,8 pomocí HCl,

- doplnit do 100 ml. Skladovat při 4°C.

- 5x koncentrovaný Running pufr**

- 36 g glycin

- 7,5 g Tris

- 2,5 g SDS

- doplní se na 500 ml dH₂O, pH se upraví na 8,3. Uskladnit při 4°C, pokud nastane precipitace, zahřát na 37°C, před použitím zředit 1:4.

- vzorkový pufr (používá se redukující nebo neredukující)**

- nereduující: 4,8 ml dH₂O

- 1,2 ml 0,5M Tris-HCl

- 1,0 ml glycerol

- 2,0 ml 10 % SDS

- 0,1% bromfenolová modř

- skladujeme při R.T.

- reduující: 25 µl 2-merkptoethanol

- 475 µl neredukující vzorkový pufr

- připravit těsně před použitím

- Pufry 6,8 a 8,8 i SAMPLE mohou být stejné jako při „velké“ ELFO

SDS PAGE

Rozpis na 2 gely	4% (hřebínkový)	10% (separační)
akryl+bis (30:0,822)	0,52	3,244
0,5M Tris-Cl, pH 6,8	1	
1,5M Tris-Cl, pH 8,8		2,5
10% SDS	0,04	0,1
H ₂ O	2,416	4,1
10% amonium persulfát	0,02	0,05
TEMED	0,004	0,005
celkem	4 ml	10 ml

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 izobutanolem nasyceným vodou, **nebo 1:3 pufrem 8,8**. Necháme tuhnout při laboratorní teplotě cca 45 min.
2. Po dané době izobutanol odstraníme a povrch opláchneme dH₂O. Přebytek tekutiny odstraníme filtračním papírem.
3. Nalejeme 4% hřebínkový gel (Tris pH 6,8) a zasuneme hřebínek. **Tento gel tuhne pomalu, použít gel podle návodu pro „velkou“ elfo...** Pod jamkami by mělo být minimálně 0,5 cm hřebínkového gelu. Dáváme pozor, aby nebyly na dně jamek bublinky. Necháme polymerizovat alespoň 3 hodiny v uzavřeném sáčku. Gel je lépe nechat nejméně do druhého dne “vyzrát” (rozloží se amonium persulfát použitý k indukci polymerizace). Možno skladovat déle jak týden v lednici.
4. Příprava vzorků je stejná jako pro „velkou“ elfo, **nanáší se 10 µl**.
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 a barvení stejné jako na „velké elfo“.**