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

**Roztoky a pufry:**

**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 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.

**running pufr**: 14,4 g glycin, 3 g Tris, 1 g SDS, doplní se na 1000 ml dH2O, 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 dH2O

**10% APS**: 100 mg amonium persulfát, 1 ml dH2O

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Rozpis na 4 gely** | **7,5%** (separační) | **2,5%** (hřebínkový) |
| H2O | 11,5 ml | 3,2 ml |
| 1,5M Tris-Cl, pH 8,8 | 6 ml | - |
| 0,5M Tris-Cl, pH 6,8 | - | 1,25 ml |
| akryl+bis (30:0,822) | 6 ml | 420 µl |
| 10% SDS | 240 µl | 50 µl |
| 10% amonium persulfát | 240 µl | 50 µl |
| TEMED | 24 µl | 5 µl |
| **celkem** | **24 ml** | **5 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 dH2O. Necháme tuhnout při laboratorní teplotě cca 45 min.
2. Po dané době převrstvení odstraníme filtračním papírem.
3. Nalejeme 2,5% hřebínkový gel a zasuneme hřebínek. Pod jamkami by mělo být minimálně 0,5 cm hřebínkového gelu. Dáváme pozor, aby nebyly na dně jamek bubliny. Necháme polymerizovat, možno skladovat déle jak týden v lednici.
4. Příprava vzorků:

1. krok: 5 µl vzorku + 245 µl 4x ředěného 0,5M Tris pH 6,8 (ředění 50x)

2. krok: 10 µl 50x ředěného vzorku + 10 µl SAMPLE pufru + 7 µl 2‑merkaptoethanol + 73 µl 4x ředěného 0,5M Tris pH 6,8

Inkubace vzorků na vodní lázni 5 min /90°C

1. Umístíme gely do elektroforetické vany. Do spodního anodového prostoru nalejeme Running pufr (bude potřeba až 700 ml). Do horního katodového prostoru je třeba použít vždy čerstvý running. Vzorky naneseme do jednotlivých jamek v hřebínkovém gelu - nanáší se 10 µl.
2. Připojíme elektroforetickou vanu ke stejnosměrnému zdroji proudu. Na aparaturu (Bio-Rad) přivedeme napětí 100 V asi po dobu dvou hodin (program TV-H, nutné nastavit čas, ale lze kdykoliv vypnou po vyjetí čela…, zdroj drží V, mA a W nenastavujeme), dokud zóna bromfenolové modři nedoputuje ke spodnímu okraji gelu.
3. Po sjetí rozmontujeme držáky gelu, spacery opatrně vytáhneme. Spacerem odřízneme hřebínkový gel.
4. Fixace: 300 ml MetOH + 100 ml kys. octová + 600 ml dH2O