

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 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)
H ₂ O	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 μ l vzorku + 245 μ l 4x ředěného 0,5M Tris pH 6,8 (ředění 50x)

2. krok: 10 μ l 50x ředěného vzorku + 10 μ l SAMPLE pufru + 7 μ l 2-merkptoethanol + 73 μ l 4x ředěného 0,5M Tris pH 6,8

Inkubace vzorků na vodní lázni 5 min /90°C

5. 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 nanese do jednotlivých jamek v hřebínkovém gelu - nanáší se 10 μ l.
6. 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 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 MetOH + 100 ml kys. octová + 600 ml dH₂O