**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 0,1-1µg 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 µl 40% formaldehydu,

 doplnit do 50 ml vodou

**3. 96% etanol 20 min.**

**4. destilovaná voda 20 min.**

1. **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

1. **10. opláchnout gel vodou**
2. **11. 2,5% uhličitan sodný v 0,02% formalínu 3 x 2,5min.**

 3,75 g uhličitanu sodného + 75 µl formaldehydu + 147 ml vody

**12. opláchnout gel vodou**

**13. 1% kys.octová 5 min.**

500 µl do 49,5 ml vody

**14. destilovaná voda, opláchnout, pak v ní uchovávat**

**Barvení Coomassie Brilliant Blue:**

* **30-60 min. v barvícím 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](http://cs.wikipedia.org/wiki/Methanol), 455 ml destilované vody, 90 ml ledové [kyseliny octové](http://cs.wikipedia.org/wiki/Kyselina_octov%C3%A1))
* **po obarvení se gel odbarví cca 30 min. ve směsi metanolu, vody a kyseliny octové v poměru 5:5:1** (455 ml [methanolu](http://cs.wikipedia.org/wiki/Methanol), 455 ml destilované vody, 90 ml ledové [kyseliny octové](http://cs.wikipedia.org/wiki/Kyselina_octov%C3%A1))