

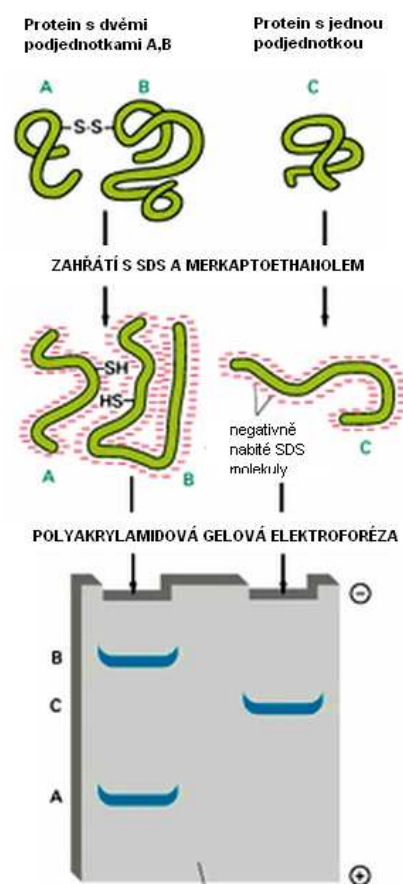
## SDS polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS PAGE)

### Princip

SDS polyakrylamidová gelová elektroforéza slouží k separaci proteinů na základě jejich velikosti (molekulové hmotnosti). Zahřátím vzorku za denaturačních a redukčních podmínek dochází k jeho denaturaci a navázání molekul SDS (dodecylsulfátu sodného), který udělí proteinu vysoký záporný náboj přímo úměrný jeho hmotnosti. Je to dáno tím, že SDS se váže na proteiny v poměru 1.4 g SDS na 1 g bílkoviny. Po nanesení vzorku (proteinu) na gel a umístění gelu do elektrického pole, dochází k migraci proteinů ke kladné elektrodě (anodě). Během této migrace jsou proteiny separovány na principu molekulového síta v polyakrylamidovém gelu (Obrázek 1.). Po následné vizualizaci separovaných proteinů v gelu se dá určit jejich relativní molekulová hmotnost srovnáním délky migrace se standardem o známé molekulové hmotnosti. Koncentrace akrylamidu použitého k přípravě gelu závisí na velikostech proteinů, které chceme separovat. Nízká koncentrace se používá k separaci proteinů o vysoké molekulové hmotnosti, zatímco vysoká koncentrace se používá k separaci proteinů o malé molekulové hmotnosti (viz tabulka 1).

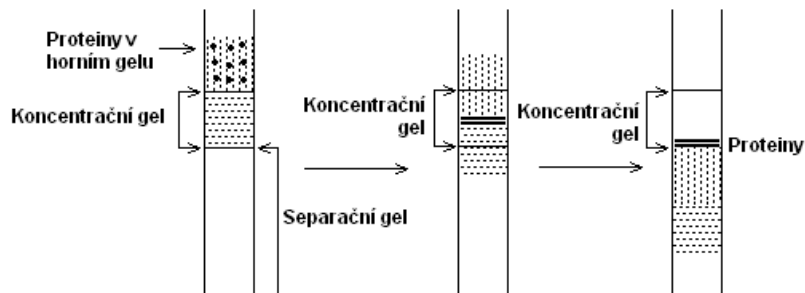
Tabulka 1. Separační schopnosti SDS-PAGE gelů

Koncentrace Akrylamidu (%)	Oblast separace (kDa)	lineární
15.0	12–43	
10.0	16–68	
7.5	36–94	
5.0	57–212	



Obrázek 1. Princip SDS PAGE separace

V praxi se pro separace proteinů velmi často používá tzv. diskontinuální elektroforéza skládající se ze dvou gelů, koncentračního a separačního (Obrázek 2). Tyto gely mají různá pH, kdy koncentrační gel má pH cca. 6,8, při kterém mají ionty obsažené v gelu nízkou mobilitu. Na rozdíl od toho, separační gel má pH cca. 8,8, kdy mobilita iontů v gelu je vysoká. Protože systémem protéká konstantní proud, musí dle Ohmova zákona být R koncentračního gelu vyšší než R separačního gelu. Při dostatečně odlišné koncentraci pufru v koncentračním a separačním gelu, bude napětí v koncentračním gelu dostatečně vyšší než napětí v separačním gelu, aby kompenzovalo rozdíl v mobilitách iontů. V systému je poté mobilita separovaných proteinů následující:  $m_{\text{konc. gel}} < \text{proteiny} < m_{\text{sep. gel}}$ . Díky této své mobilitě se separované proteiny na rozhraní gelů zkoncentrují a seřadí dle svých mobilit. Důležité je, aby koncentrační gel obsahoval nízkou koncentraci polyakrylamidu a nebránil tak proteinům v pohybu.



Obrázek 2. Princip diskontinuální elektroforézy

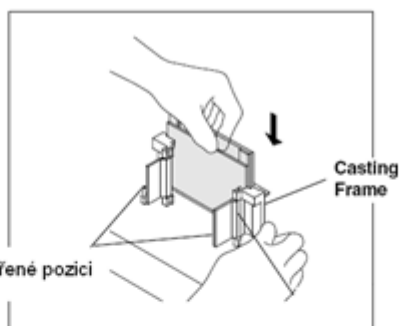
### Příprava gelu

Složení sendvičové kazety pro nalití gelu

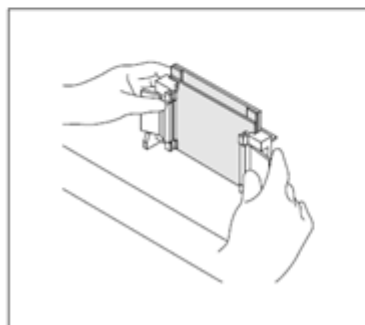
- Umístěte nalévací stojan a rámečky na rovnou podložku.
- Vezměte delší skla se spacersy o tloušťce 1.0 mm a umístěte na ně kratší skla.
- Umístěte skla do nalévacího rámečku tak, že popis na delším skle je orientován nahoru.
- Zaklapněte skla oběma klipsami zároveň.
- Umístěte nalévací rámeček se skly na nalévací stojan (nezapomeňte umístit na stojan těsnící podložku) a přitlačte je pomocí pružinky.



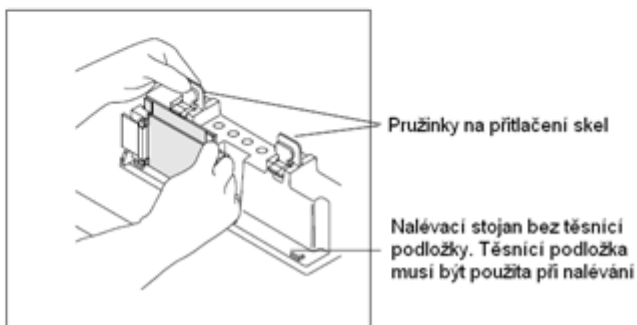
Bod b.)



Bod c.)



Bod d.)



Bod e.)

### Nalévání separačního gelu

- Na základě Tabulky 2. namíchejte směs pro 10% separační gel do 100 ml erlenmayerovy baňky a promíchejte. Jako poslední přidejte persíran amonný.
- Pomocí 5 ml pipety nalijte připravený gel mezi připravená skla tak, aby od okraje kratšího skla zůstala mezera cca. 1 cm.
- Převrstvěte opatrně nalitý gel tenkou vrstvou vodou.
- Po 20 minutách vyndejte nalévací rámeček se skly z nalévacího stojanu a pomocí filtračního papíru odsajte vodu na povrchu polymerovaného gelu.
- Vraťte nalévací rámeček se skly do nalévacího stojanu.

### Nalévání koncentračního gelu

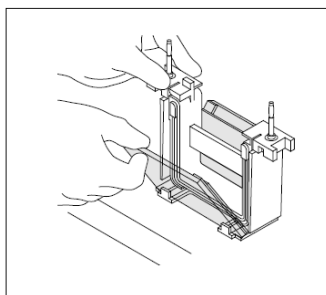
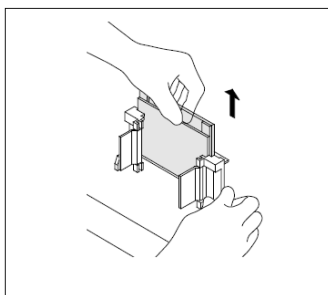
- Na základě Tabulky 2. namíchejte směs pro koncentrační gel do 100 ml erlenmayerovy baňky a promíchejte. Jako poslední přidejte persíran amonný.
- Pomocí 5 ml pipety nalijte připravený gel mezi připravená skla na již ztuhlý separační gel tak, aby koncentrační gel byl nalit až po okraj kratšího skla.
- Poté opatrně zasuňte mezi skla hřebínek o tloušťce 1.0 mm.
- Po 20 minutách vyndejte nalévací rámeček se skly z nalévacího stojanu, vyndejte opatrně hřebínek a vzniklé jamky propláchněte mili-Q vodou.

Tabulka 2. Složení směsi pro nalévání gelu

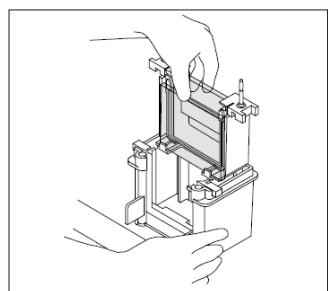
<b>Koncentrační gel</b>		<b>Separací gel</b>	
Procentní gel (%)	5	Procentní gel (%)	10
30% Akrylamid (ml)	1.7	30% Akrylamid (ml)	6.7
1M Tris(pH6.8) (ml)	1.25	1.5M Tris(pH8.8) (ml)	5
10% persíran amonný (ml)	0.1	10% persíran amonný (ml)	0.2
10% SDS (ml)	0.1	10% SDS (ml)	0.2
TEMED (ml)	0.01	TEMED (ml)	0.008
H <sub>2</sub> O (ml)	6.8	H <sub>2</sub> O (ml)	7.9
Celkový objem (ml)	10	Celkový objem (ml)	20

## Sestavení aparatury

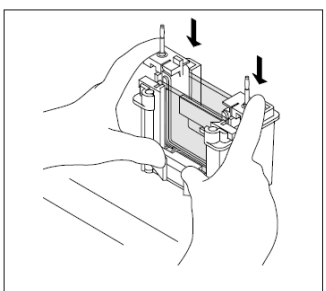
- Vyjměte skla z nalévacího rámečku a umístěte je každé sklo do drážek v elektrodovém držáku. Skla musí být umístěna tak, že kratší skla jsou orientována dovnitř směrem k sobě, čímž vytváří vaničku pro nalití pufru.
- Takto připravený elektrodový držák se skly zasuněte do upínacího rámečku.
- Gely přitlačte na zelené těsnění pomocí klipsen.
- Upínací rámeček poté vložte do elektrodové vany.
- Do komůrky mezi skly v elektrodovém držáku nalijte elektrodový pufr (až po okraj, cca. 125 ml). Do elektrodové vany nalijte potom asi 200 ml elektrodového pufru.



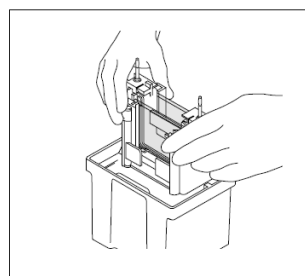
Bod a.)



Bod c.)



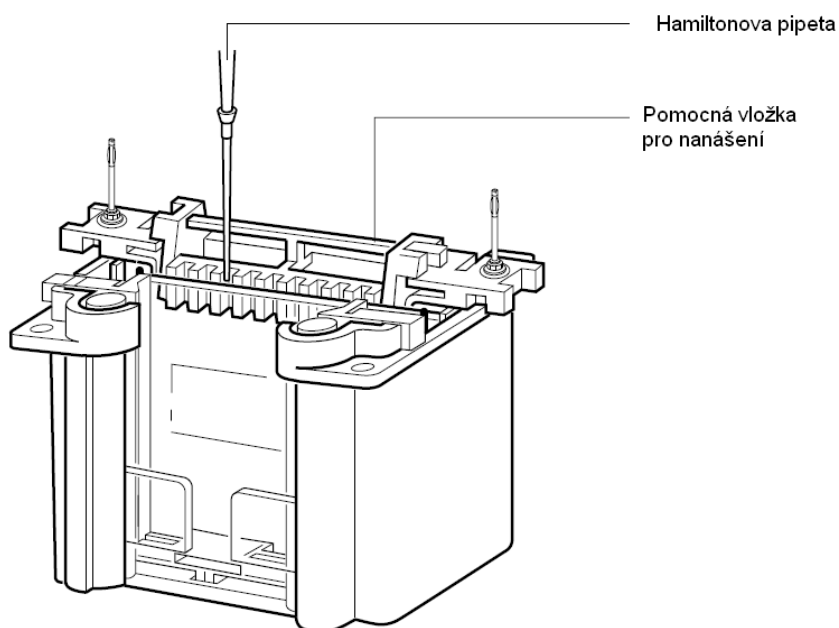
Bod c.)



Bod d.)

## Nanesení vzorku

- Před nanesením vzorku smíchejte 42  $\mu\text{l}$  vzorku s 8  $\mu\text{l}$  nanášecího pufru a umístěte vzorek a délkového standard na 5 minut do termobloku vyhřátého na 95°C.
- Poté vzorek a standard zchlaďte na ledu.
- Do horní vaničky si vložte pomocnou vložku pro nanášení vzorku.
- Do jednotlivých jamek nanášejte pomocí Hamiltonovy pipety 20  $\mu\text{l}$  vzorku. Do jedné jamky poté naneste 10  $\mu\text{l}$  délkového standardu.



## Vlastní elektroforéza

Elektroforetickou aparaturu uzavřete víkem a připojte ji ke zdroji stejnosměrného napětí. Na zdroji nastavte konstantní proud 30 mA/gel a po zapnutí ponechte elektroforézu probíhat tak dlouho, až zóna bromfenolové modři doputuje ke spodnímu okraji gelu.

## Ukončení elektroforézy

Vypněte zdroj, otevřete elektroforetickou aparaturu, vyjměte z ní vnitřní elektrodový prostor, a slijte elektrodový pufr. Uvolněte z vnitřního elektrodového prostoru držák s gelem a opatrným zapáčením od sebe uvolněte skla. Z gelu odstraňte koncentrační část a zbytek přeneste do vody.

## Protokol pro barvení gelů stříbrem

- a. Ponořte gel na 7 minut do 7% k. octové
- b. Ponořte gel na 10 minut do 50% metanolu
- c. Znovu ponořte gel na 10 minut do 50% metanolu
- d. Připravte si roztok A: 0.8 g dusičnanu stříbrného + 4 ml vody
- e. Propláchněte gel po dobu 10 minut v 100 ml vody
- f. Propláchněte gel po dobu 10 minut v 100 ml vody
- g. 5 minut před posledním promytím připravte roztok B: 21 ml vody + 25 ul 30% NaOH + 1.4 ml 14.8 M hydroxidu amonného
- h. Připravte barvicí roztok: Roztok B umístěte na míchačku a za neustálého míchání přidejte po kapkách roztok A. poté přidejte 76 ml mili-Q vody.
- i. Ponořte gel na 15 minut do barvicího roztoku.
- j. Propláchněte gel po dobu 5 minut v 100 ml vody
- k. Znovu propláchněte gel po dobu 5 minut v 100 ml vody
- l. Připravte vyvíjecí roztok: Smíchejte 200 ml mili-Q vody s 1 ml 1% k. citronové a 100  $\mu$ l 37% formaldehydu.
- m. Ponořte gel do vyvíjecího roztoku a inkubujte ho, dokud nejsou viditelné proužky (obvykle 2-10 minut).
- n. Ukončete vyvíjení propláchnutím 3 x 200 ml vody

## Složení pufrů

### Nanášecí pufr:

250 mM TrisHCl pH6.8  
10% SDS  
30% Glycerol  
5%  $\beta$ -merkaptoethanol (nebo 0.5M DTT)  
0.02% bromfenolová modř

### 10 x SDS elektroforetický pufr

TRIS	30.3 g
Glycine	144 g
SDS	10 g

Doplnit do 1l vodou (pH se neupravuje, směs má hodnotu cca. 8,8)