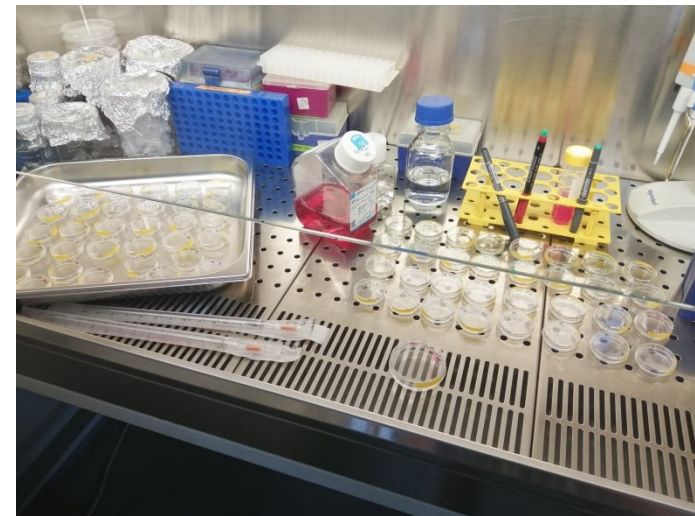
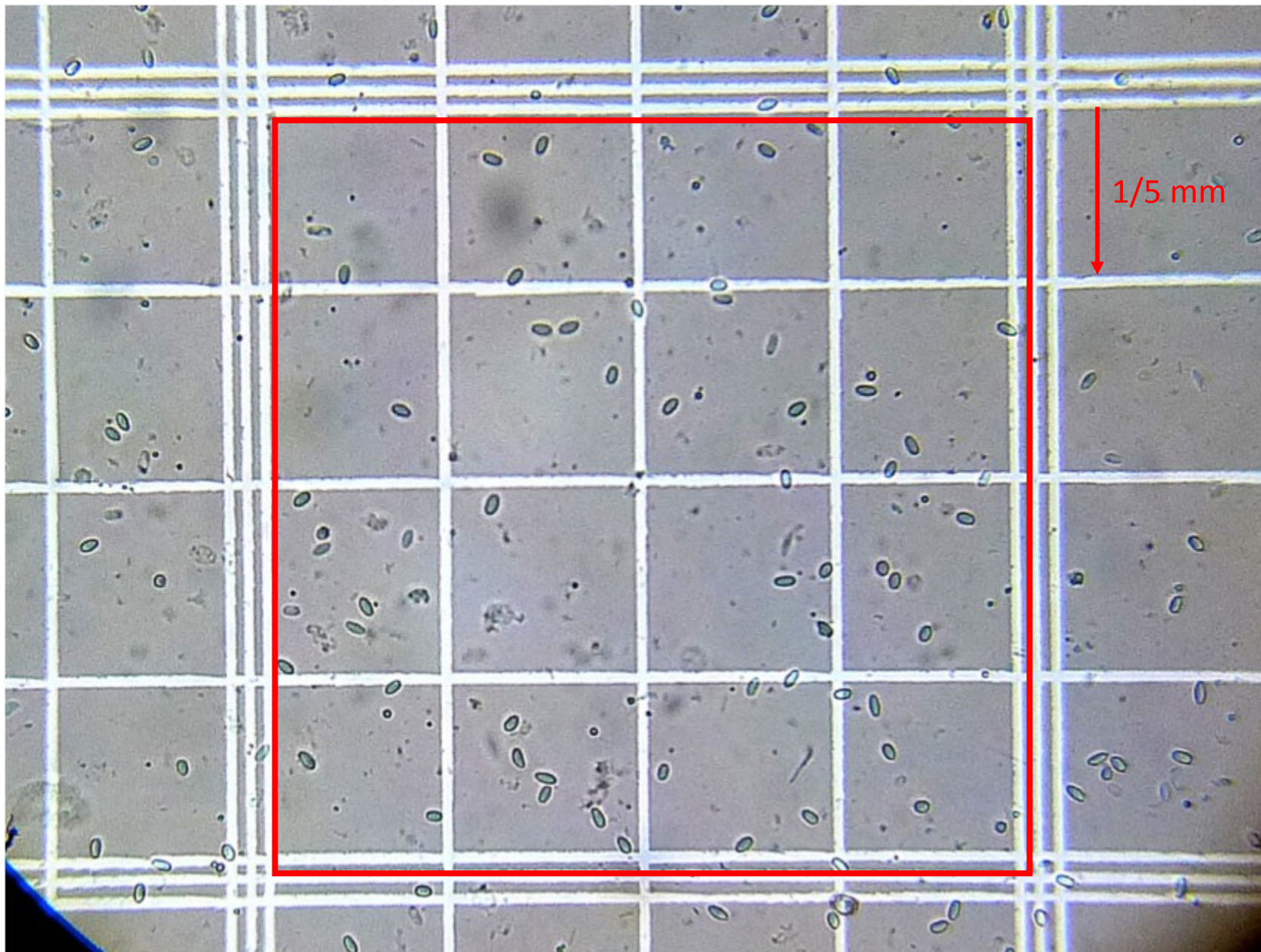


# Kultivace buněk

- Velmi důkladný postup:  
[https://www.youtube.com/watch?v=nr1tV\\_LuqJk](https://www.youtube.com/watch?v=nr1tV_LuqJk)
- Rozmrazení buněk a rychlá pasáž
- [https://www.youtube.com/watch?v=7d\\_kDu-P964](https://www.youtube.com/watch?v=7d_kDu-P964)





Výpočet:

$$bb/ul = \frac{\sum \text{buněk} \times 250}{\text{počet čtverců}}$$

Koeficient 250

$$\frac{1}{5} \times \frac{1}{5} \times \frac{1}{10} = \frac{1}{250} = 0,004 \text{ mm}^3$$

$$0,004 \times 250 = 1 \text{ ul}$$

$2 \times 10^6$ ..... 1ml  
 $1,5 \times 10^6$ ... 0,75ml

30 w po 0,1 ml = 3 ml  
50x10\*3 na jamku  
1,5 x10\*6 buněk celkem

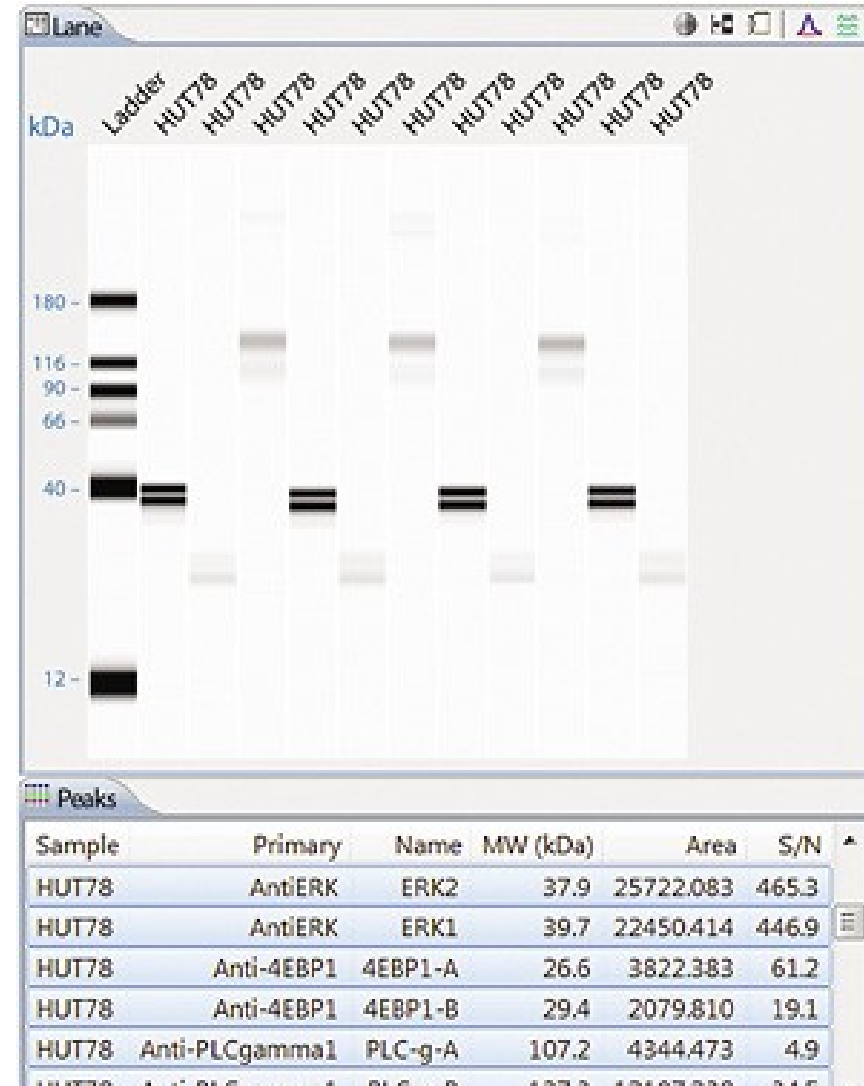
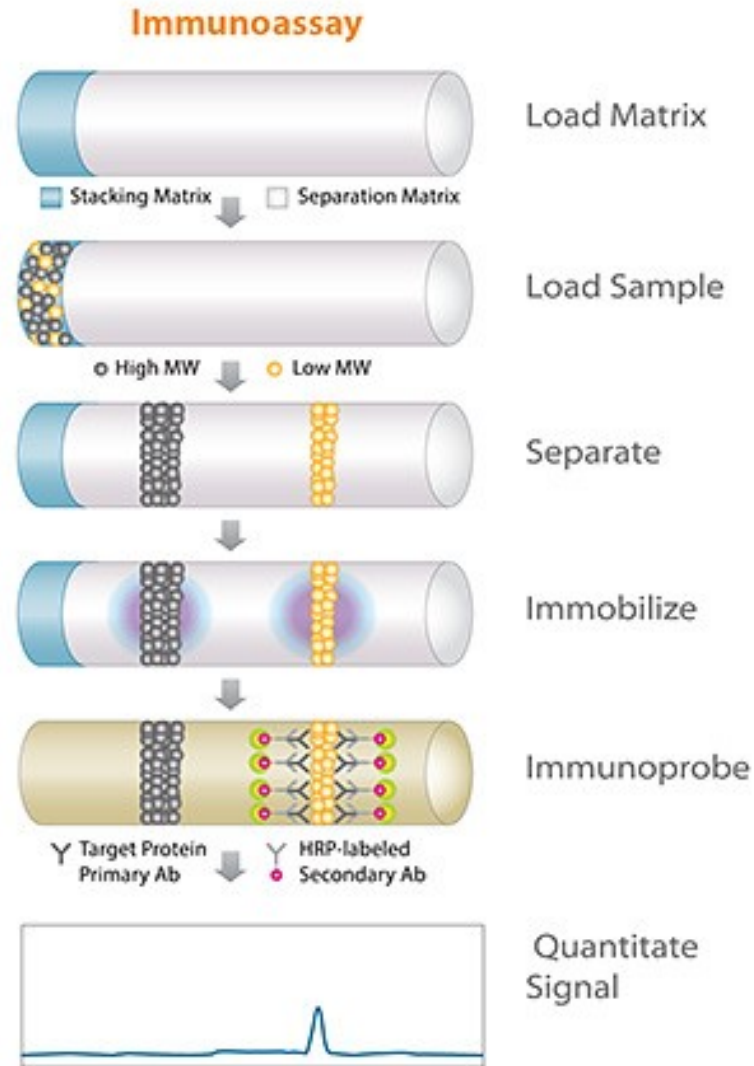
# Western blotting

- Sestavení gelů (naše aparatura)
  - Naše aparatura [https://www.youtube.com/watch?v=EDi\\_n\\_0NiF4](https://www.youtube.com/watch?v=EDi_n_0NiF4)
  - Sestavení gelů (modrá aparatura) <https://www.youtube.com/watch?v=hY3PnKrRh5k>
  - Sestavení gelů (stojánek co se v něm rovnou jede) (<https://www.youtube.com/watch?v=hY3PnKrRh5k>)
  - Multicasking [https://www.youtube.com/watch?v=0S\\_LSdQbneE](https://www.youtube.com/watch?v=0S_LSdQbneE)
- 
- Postup <https://www.youtube.com/watch?v=uFu8aie4QFI>
- 
- 
- 
- 
- 
- 
- 
- 
- 
- 
- Novinka: <https://www.youtube.com/watch?v=pn7opcdXHq0>

# Protein simple

[https://www.proteinsimple.com/simple\\_western\\_overview.html](https://www.proteinsimple.com/simple_western_overview.html)

[https://www.youtube.com/watch?v=gil1vWU\\_6Vw](https://www.youtube.com/watch?v=gil1vWU_6Vw)



# Lyzační pufry

## Radioimmunoprecipitation assay buffer

- 10-50 mM [Tris-HCl](#), pH 7–8
- 150 mM **NaCl**
- **1% Triton X-100**
- 0.1-0.5% [deoxycholate](#),
- 0.1-0.5% [SDS](#)

## SDS lyzate buffer

- 100 mM TRIS pH 7,4
- 10% SDS
- 10% glycerol
  
- Proteázový inhibitor
- Fosfatázový inhibitor

## Kvantifikace

## Koncovka

10% 2-ME  
BB

## Laemmli buffer

Reagent	Molecular weight	Concentration (M or %)			Add for 50 ml of 2X	Add for 50 ml of 4X
		1X	2X	4X		
Tris base <sup>1</sup>	121.14	0.0625 M	0.125 M	0.250 M	0.747 g	1.514 g
SDS <sup>2</sup>	288.37	0.07 M (2%)	0.14 M (4%)	0.28 M (8%)	2 g	4 g
glycerol	92.09	10%	20%	40%	10 ml	20 ml
2-mercapto-ethanol	78.13	5%	10%	20%	5 ml	10 ml
Bromphenol blue <sup>3</sup>	691.94	-	-	-	100 mg	200 mg

# Další pufry nutné pro WB

10x elektroforetický/transferový pufir	Dest. H <sub>2</sub> O	Glycin	TRIS
	1 l	144 g	30,3 g
1x elektroforetický pufir	Dest. H <sub>2</sub> O	10x elektrofor./transfer. pufir	20 % SDS
	9 l	1 l	50 ml
1x transferový pufir	Dest. H <sub>2</sub> O	10x elektrofor./transfer. Pufir	Metanol
	1400 l	200 ml	400 ml
Promývací pufir (doplňen dest. H <sub>2</sub> O do 1 l)	NaCl SS: 5 M WS: 150 mM	TRIS pH 7,4 SS: 2 M WS: 20 mM	Tween SS: 20% WS: 0,06%
	30 ml	10 ml	3 ml

# Kvantifikace proteinů



- BioRad DC protein assay
  - Založeno na Lowryho metodě – princip poměření proteinů, redukce Folinova reagens
  - 5 ul standardů a vzorků
  - 20 ul A+S
  - 200 ul B
  - Inkubace 10' / RT
  - Měření absorbance při 700 nm