

SDS-PAGE elektroforéza

Příprava gelu	1
Recept na 0.75 mm gel (1 gel/2 gely)	2
Recept na 1.5 mm gel (1 gel/2 gely)	2
Příprava vzorku	3
Elektroforéza	3
Barvení gelů Blue Silver	4
Chemikálie a roztoky	5
Poznámky	7

Upozornění! – Během práce používat ochranné rukavice. Akrylamid je toxická látka.

Příprava gelu

- 1) Připravit si nalévací stojánek, spodní sklo se spacerem, krycí sklo, zelený držák skel, hřebínek. Pozor na tloušťku gelu
- 2) Zkontrolovat, zda jsou spodní i horní skla a hřebínek bez nečistot. Pokud ne, je třeba je umýt kartáčkem s trochou jaru, poté vodou, ultračistou vodou a nakonec lihometanolem (nepoužívat lihobenzín). Nechat oschnout ve svislé poloze.
- 3) Položit skla na sebe a vložit je do zeleného držáku. Spodní část zajistit parafilmem. Vše vložit do nalévacího stojánku.
- 4) Připravit si roztok na separační gel (viz recept). Promíchat roztok a okamžitě jej nalít mezi skla, dokud hladina nedosáhne horní hrany zelených svorek, kterými se zajišťují skla.
- 5) Opatrně převrstvit malým množstvím vodou nasyceného isobutanolu (cca 300 μ l). Nechat polymerovat aspoň 30–40 minut.
- 6) Slít isobutanol, promýt ultračistou vodou a opatrně vysušit zbytek vody filtračním papírem. Nedotýkat se gelu!
- 7) Připravit si roztok na zaostřovací gel (viz recept). Promíchat roztok a okamžitě jej nalít mezi skla, dokud hladina nedosáhne horní hrany krycího skla. Vložit hřebínek až nadoraz. Pozor, gel může vystříknout. Nechat polymerovat aspoň 90 minut.

Recept na 0.75 mm gel (1 gel/2 gely)**Upozornění!** – Během práce používat ochranné rukavice. Akrylamid je toxická látka.**Separační gel (12.7%)**

Ultračistá H ₂ O	1.6 ml	3.2 ml
1.5M Tris-HCl, pH 8.8	1.25 ml	2.5 ml
10% SDS	50 µl	100 µl
30% roztok akrylamidu	2.1 ml	4.2 ml
Zahájení polymerace:		
10% APS	50 µl	100 µl
TEMED	2.5 µl	5 µl

Zaostřovací gel (4%)

Ultračistá H ₂ O	953 µl	1.91 ml
0.5M Tris-HCl, pH 6.8	391 µl	782 µl
10% SDS	16 µl	32 µl
30% roztok akrylamidu	203 µl	406 µl
Zahájení polymerace:		
10% APS	32 µl	64 µl
TEMED	1.6 µl	3.2 µl

Recept na 1.5 mm gel (1 gel/2 gely)**Upozornění!** – Během práce používat ochranné rukavice. Akrylamid je toxická látka.**Separační gel (12.7%)**

Ultračistá H ₂ O	3.2 ml	6.4 ml
1.5M Tris-HCl, pH 8.8	2.5 ml	5 ml
10% SDS	100 µl	200 µl
30% roztok akrylamidu	4.2 ml	8.4 ml
Zahájení polymerace:		
10% APS	100 µl	200 µl
TEMED	5 µl	10 µl

Zaostřovací gel (4%)

Ultračistá H ₂ O	1.91 ml	3.81 ml
0.5M Tris-HCl, pH 6.8	782 µl	1.56 ml
10% SDS	32 µl	64 µl
30% roztok akrylamidu	406 µl	812 µl
Zahájení polymerace:		
10% APS	64 µl	128 µl
TEMED	3.2 µl	6.4 µl

Příprava vzorku

- 1) Rozmrazit zásobní roztok vzorkového pufru (5× koncentrovaný). Pokud již není obsažen, přidat 2-merkaptoethanol (pracovat v digestoři) v množství 25 µl ME na 200 µl vzorkového pufru.
- 2) Rozmrazit molekulový marker (1 mikrozkušavka obsahuje 2 dávky).
- 3) Předehřát termoblok na 96 °C.
- 4) Přidat ke vzorkům vzorkový pufr v dostatečném množství (1 díl vzorkového pufru na 4 díly vzorku). Krátce stočit v centrifuze, aby došlo k usazení roztoků na dně mikrozkušavky.
- 5) Vařit cca 4 minuty. Poté nechat vychladnout. Krátce stočit v centrifuze, aby došlo k usazení kondenzátů na dně zkumavky. Protřepat na třepačce.

Elektroforéza

- 1) Opatrně odstranit hřebíček z gelu. Odstranit parafilm. Vyjmout skla s gelem z držáku.
- 2) Připravit si elektroforetickou celu. Vložit skla s gelem do cely tak, aby krycí sklo směřovalo dovnitř. Pokud je používán pouze jeden gel, je nutné na místo druhého gelu vložit plastovou náhradu. Zajistit zelenými svorkami.
- 3) Naplnit vnitřní část cely zředěným elektrodovým pufrům (160 ml 5× koncentrovaného zásobního elektrodového pufru, 640 ml ultračisté vody) tak, aby hladina byla výše než vnitřní krycí sklo.
- 4) Nanést 5 µl molekulového markeru do jedné jamky. Vzorky nanést do dalších jamek. Prázdné jamky zaplnit stejným množstvím vzorkového pufru, jako je v upravených vzorcích.
- 5) Vložit celu do elektroforetické nádoby – pozor na barevné označení. Nalít elektrodový pufr po značku na nádobě. Doplnit elektrodový pufr do vnitřní cely.
- 6) Přikrýt víkem – pozor na barevné označení. Připojit ke zdroji.
- 7) Vybrat si „Methods“ – „SDS“ a spustit tlačítkem s běžícím panáčkem. Metoda je nastavena na 100 V/20 min a poté 150 V/75 minut. K vypnutí dojde automaticky, ke konci nutno kontrolovat čelo gelu (modrý pruh), aby nedošlo k „vyjetí“ z gelu.
- 8) Vyjmout celu s gely, slít pufr do elektroforetické nádoby a poté vyjmout skla z cely. Použitý elektrodový pufr vrátit zpět do zásobní lahve (lze použít až 5×).
- 9) Opatrně rozevřít skla zeleným nástrojem. Odstranit zaostřovací gel. Dle dalšího postupu přenést gel do nádoby pro barvení Blue Silver nebo jej namočit do blotovacího pufru (anodový pufr 2).

Barvení gelů Blue Silver

Pokud má být gel použit k western blottingu, není možné jej barvit Coomassie Blue.

- 1) Gel zalít dostatečným množstvím (cca 100 ml) fixačního roztoku (viz recept) a třepat jej na orbitální třepačce cca 15-30 minut (cca 75 rpm).
- 2) Slít fixační roztok zpět do lahve a gel 3× promýt ultračistou vodou, která se ihned vylije a poté 3× 10 minut ultračistou vodou.
- 3) Protřepat barvicí roztok Blue Silver (viz recept), aby došlo k uvolnění usazené CBBG ze dna. Přidat jej do nádoby ke gelu a promíchávat na orbitální třepačce, dokud nebudou viditelné proužky na gelu – čas se liší dle množství proteinu (5 minut – přes noc)
- 4) Slít barvicí roztok zpět do lahve a gel odbarvovat ultračistou vodou do čírého pozadí.

Chemikálie a roztoky

1.5M Tris-HCl, pH 8.8

18.5 g Tris, přidat 75 ml ultračisté vody. Upravit pH na 8.8 pomocí koncentrované HCl. Doplnit ultračistou vodou do 100 ml. Uchovávat v lednici.

0.5M Tris-HCl, pH 6.8

6.0 g Tris, přidat 75 ml ultračisté vody. Upravit pH na 6.8 pomocí koncentrované HCl. Doplnit ultračistou vodou do 100 ml. Uchovávat v lednici.

10% SDS

10 g SDS rozpustit v 80 ml ultračisté vody. Doplnit do 100 ml. Uchovávat při laboratorní teplotě.

10% APS (připravovat v čas potřeby)

0.010 g APS (ammonium persulfate) rozpustit ve 100 µl ultračisté vody.

30% akrylamid (AA) + 0.8% bis-akrylamid (bis-AA)

30.0 g AA + 0.8 g bis-AA rozpustit ve 100 ml ultračisté vody. Uchovávat v lednici.

5× zásobní elektrodotový pufr

15.1 g Tris

72.0 g glycin

5.0 g SDS

Přidat 900 ml ultračisté vody, upravit pH na 8.3 pomocí koncentrované HCl.

Doplnit ultračistou vodou do 1000 ml.

5× zásobní vzorkový pufr

6.25 ml 0.5M Tris-HCl, pH 6.8

3.75 ml glycerol

1 g SDS

2.5 µg Bromophenol Blue (BFB)

Uchovávat ve 200 µl objemech při -20 °C. Před použitím rozmrazit a přidat

2-merkптоethanol (25 µl ME na 200 µl zásobního vzorkového pufru).

Isobutanol nasycený vodou

Smíchat čistý isobutanol s ultračistou vodou. Isobutanol je horní vrstva.

Fixační roztok

50 ml ultračisté vody

40 ml methanolu

10 ml koncentrované kyseliny octové

Barvicí roztok Blue Silver

10 ml ultračisté vody

8 ml 85% kyseliny fosforečné

Promíchat

10 g síranu amonného

Promíchat

0.12 g Coomassie Brilliant Blue G (CBBG)

Doplnit ultračistou vodou do 80 ml

20 ml methanolu

Uchovávat v hnědé lahvi při laboratorní teplotě. Vydrží až 6 měsíců. Před použitím protřepat, aby došlo k uvolnění usazené CBBG ze dna.

Poznámky



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Publikace je spolufinancovaná Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky. Registrační číslo projektu: CZ.1.07/2.3.00/20.0235, název projektu: TEAB.