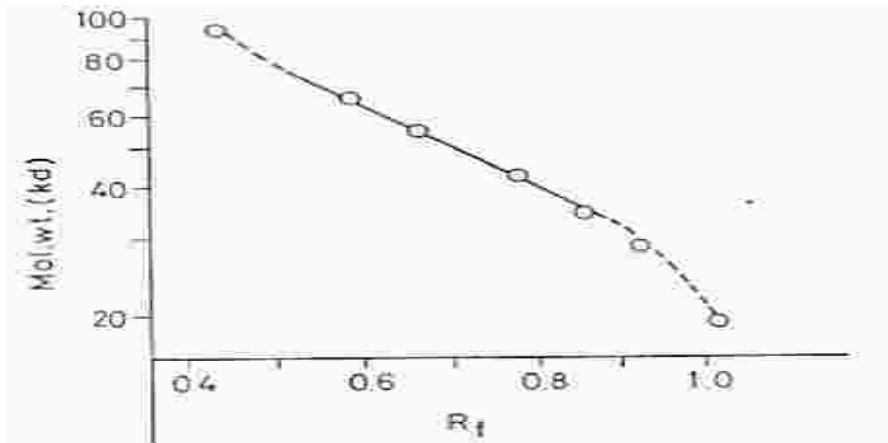


## Elektroforéza v přítomnosti SDS – SDS PAGE

Elektroforéza v přítomnosti SDS – SDS PAGE je jednoduchá, rychlá a reprodukovatelná metoda pro kvalifikovanou charakterizaci a srovnání bílkovin. Tato metoda separuje bílkoviny na základě rozdílné relativní molekulové hmotnosti. SDS se zde váže na bílkovinný řetězec v poměru 1.4 g SDS na 1g bílkoviny, přičemž délka komplexu SDS – bílkovina je úměrná jeho molekulové hmotnosti. Na základě srovnání relativních mobilit neznámé bílkoviny a standardů je pak možné určit její relativní molekulovou hmotnost.

$$\text{Relativní mobilita (Rf)} = \frac{\text{elektromigrační dráha neznámé bílkoviny}}{\text{celková délka elektroforézy}}$$

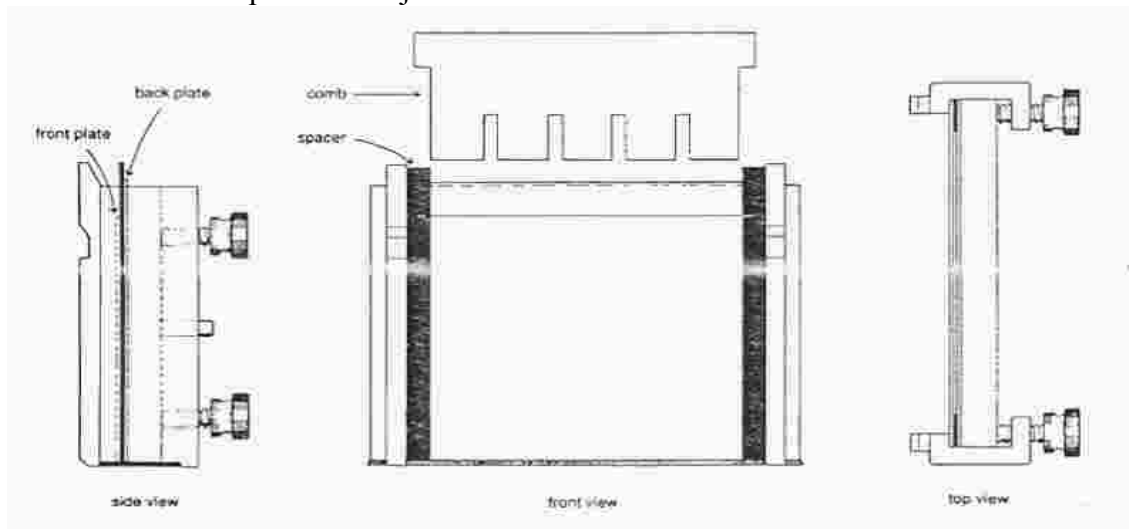
### Kalibrační závislost $\text{Log MW} = f(\text{Rf})$



## I. Příprava gelu

### A. Sestavení gelového sendviče

Na stojánek položte držák, k jeho vnitřní straně umístěte delší sklo, na ně spacers a pak kratší sklo. Držák stáhněte a upněte ve stojánku.

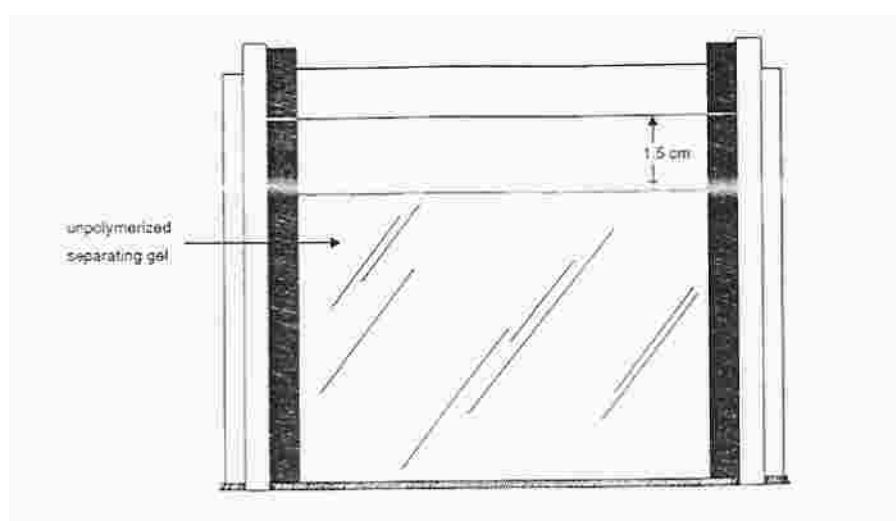
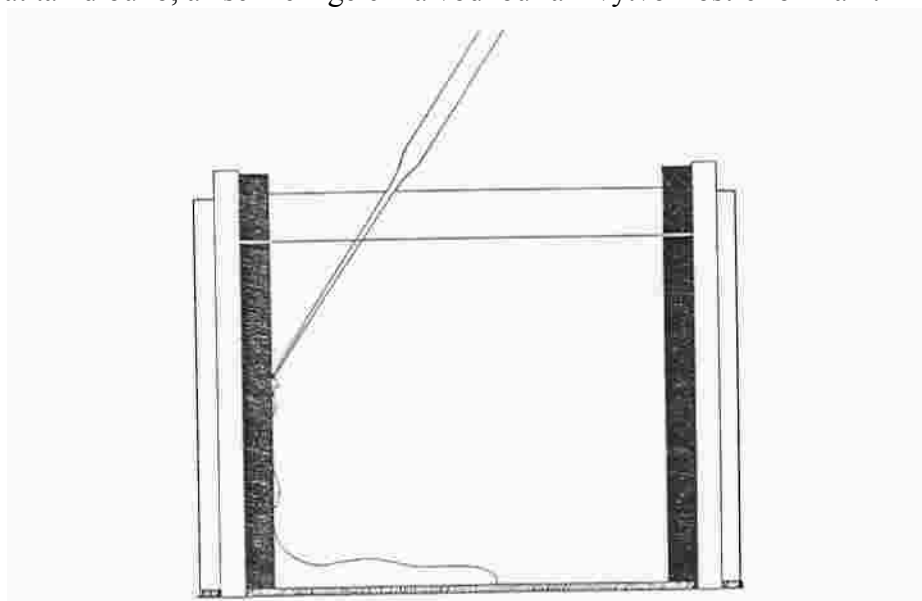


### ***B. Nalévání separačního gelu.***

Na elektromagnetickou míchačku dejte kádinku s míchadlem a do ní pipetujte roztoky podle schématu, **roztoky nepipetujte ústy!**

- 1.3 ml separačního pufru pH 8.3
- 1.3 ml roztoku akrylamidu
- 2.5 ml destilované vody
- 50  $\mu$ l 10 % persíranu amonného
- 5  $\mu$ l TEMEDu

Promíchejte polymerizační směs zvýšením otáček a nasajte ji do injekční stříkačky. Směs opatrně nastříknete mezi skla do výše zářezu a převrstvíte n-butanolem. Ponechte polymerovat tak dlouho, až se mezi gelem a vodnou fází vytvoří ostré rozhraní.



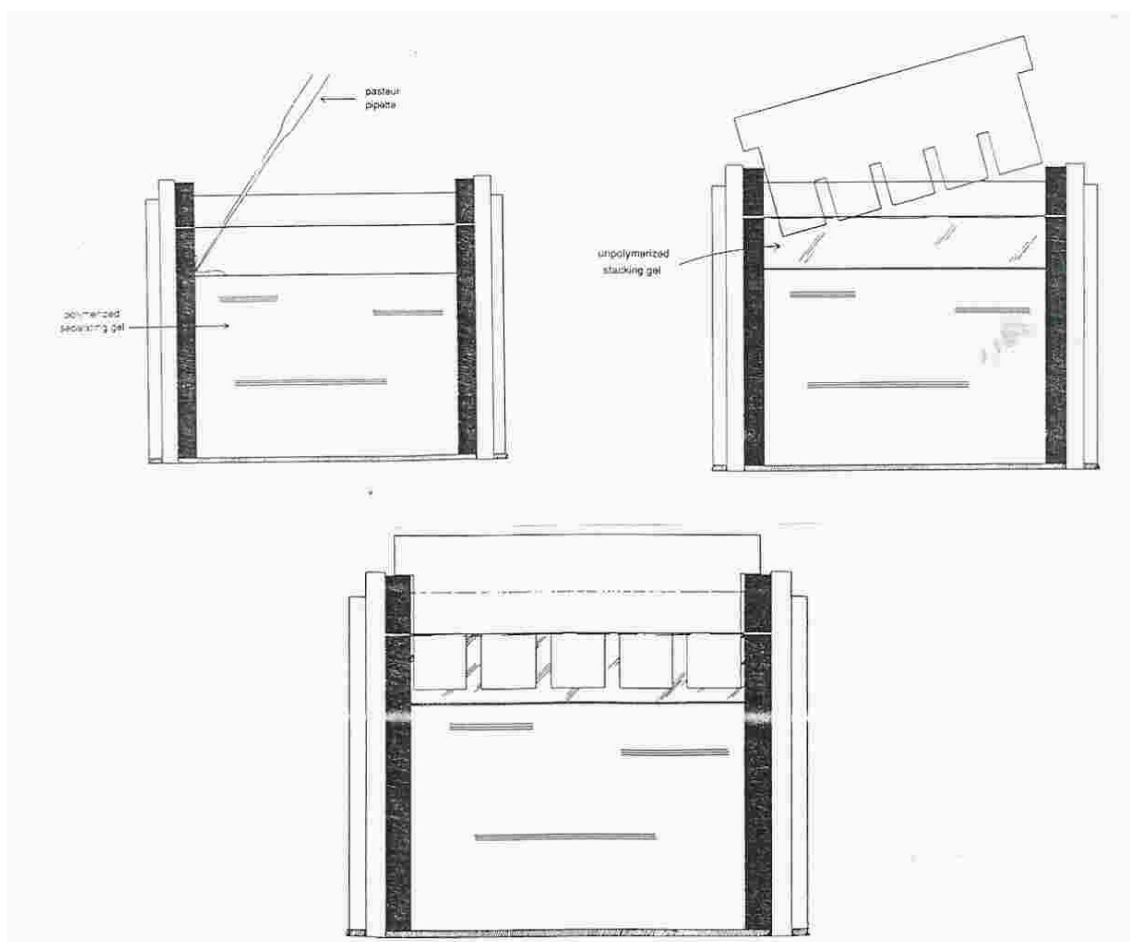
Slijte nezpolymerovanou část, promyjte vodou ze stříčky a odsajte přebytek kapaliny filtračním papírem.

### C. Nalévání koncentračního gelu

Na elektromagnetickou míchačku dejte kádinku s míchadlem a do ní pipetujte roztoky podle schématu, **roztoky nepipetujte ústy!**

- 1.2 ml koncentračního pufru pH
- 0.7 ml roztoku akrylamidu
- 3.1 ml destilované vody
- 50 ul 10 % persíranu amonného
- 5 ul TEMEDu

Promíchejte polymerizační směs zvýšením otáček a nasajte ji do injekční stříkačky. Mezi skla nastříknete polymerizační směs a vložte do ní hřebínek. Ponechte polymerovat.



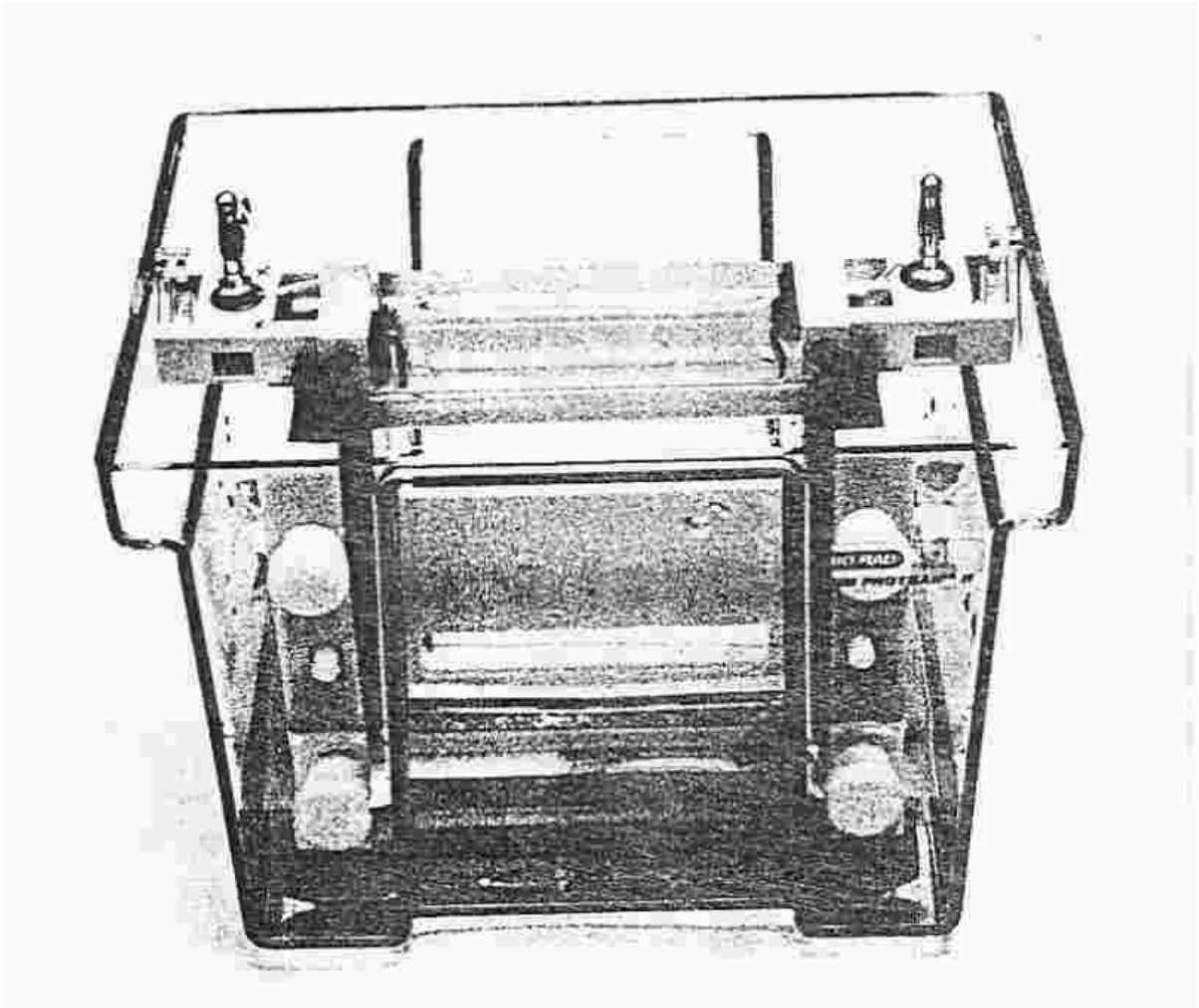
Vyjměte hřebínek z gelu a vzorkové jamky vypláchněte destilovanou vodou. Gel vložte do vlhké komůrky.

## II. Elektroforéza

### *A. Sestavení aparatury*

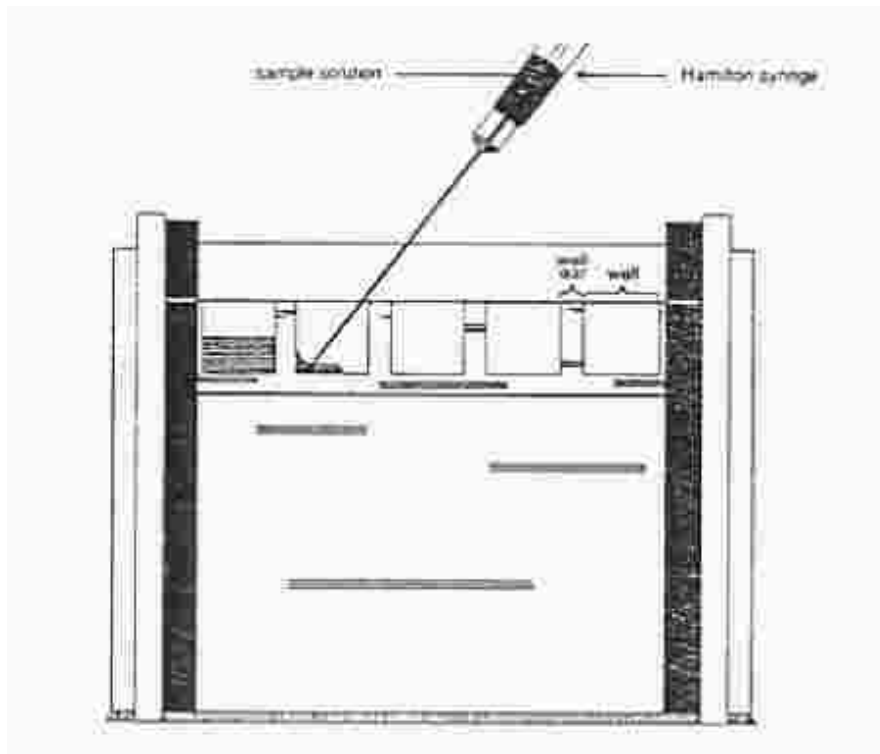
Ke vnitřnímu elektrodovému prostoru připevněte gel a prázdný držák s kratším sklem. Takto sestavený vnitřní elektrodový prostor vložte do nádoby a naplňte elektrodovým puřem.

### **Elektroforetická aparatura Mini Protean II**



### ***B. Nanesení vzorku.***

Do vzorkových jamek naneste pomocí stříkačky 20  $\mu\text{l}$  vzorku, tak abyste je podvrstvlili pod elektrodový pufr. Mezi jednotlivými vzorky stříkačku vypláchněte destilovanou vodou.



### ***C. Vlastní elektroforéza***

Elektroforetickou aparaturu uzavřete víkem a připojte ji ke zdroji stejnosměrného napětí. Na zdroji nastavte konstantní napětí 125 V a po zapnutí ponechte elektroforézu probíhat tak dlouho, až zóna bromfenolové modři doputuje ke spodnímu okraji gelu.

### ***D. 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 fixačního roztoku.

**III. Detekce bílkovin stříbrem**

krok	roztoky	čas
1.	60 ml 50 % acetonu, 1.5 ml 50 % TCA , 25 $\mu$ l 37 % HCHO	5 min
2.	opláchněte 3x deionizovanou vodou	3 x 5 s
3.	promytí deionizovanou vodou	5 min
4.	opláchněte 3x deionizovanou vodou	3 x 5 s
5.	60 ml 50 % acetonu	5 min
6.	100 $\mu$ l 10 % $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ v 60 ml deionizované vody	1 min
7.	opláchněte 3x deionizovanou vodou	3 x 5 s
8.	0.8 ml 20 % $\text{AgNO}_3$ , 0.6 ml 37 % HCHO , 60 ml $\text{H}_2\text{O}$	8 min
9.	opláchněte 2x deionizovanou vodou	2 x 5 s
10.	60 ml 2 % $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 25 $\mu$ l 37 % HCHO , 25 $\mu$ l 10 % $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	10-20 s
11.	1 % HAc	30 s
12.	promytí deionizovanou vodou	10 s

**IV. Sušení gelu**

Gel přeneste do 1 % roztoku glycerínu a ponechte jej zde 15 minut ekvilibrovat. Do stejného roztoku vložte na 5 minut celofánovou folii, gel a zalijte jej trochou glycerínového roztoku. Gel překryjte celofánovou folií a pomocí skleněné tyčinky vytlačte gel gumovou membránou a vrchním víkem. Zapněte sušičku a ponechte gel sušit asi 2 hodiny při 80 °C.

**!!!!!! Důležité upozornění !!!!!**

Monomery používané pro přípravu gelu jsou neurotoxiny a proto :

- roztoky nikdy nepipetujte ústy
- pracujte v rukavicích
- pracujte v digestoři