

Obsah Protein Gel Electrophoresis Kitu a jeho skladování

Protein Gel Electrophoresis Kit obsahuje veškerý potřebný materiál provádění vertikální polyakrilamidové gelové elektroforézy.

Experiment provádějí osoby zaškolené na práci s danými přístroji.

Při přípravě vzorků a jejich analýze jsou dodržovány bezpečnostní postupy dle zásad správné laboratorní práce.

Chemikálie a reagenty obsažené v kitu

Množství	Reagenty	Skladování	Stabilita od dodání
500 g	TRIS	RT	
1 kg	Glycine	RT	
40 g	Acryl/Bis™ 37.5:1	RT	
200 ml	Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), 20% Solution	RT	
25 ml	TEMED	RT	
25 g	Ammonium Persulfate (APS)	RT	
25 g	Bromphenol Blue	RT	
10 g	Coomassie Brilliant Blue R-250	RT	
100 ml	Glycerol	RT	
100 ml	2-Mercaptoethanol	RT	
250 µl	Blue Protein Ladder	4°C -20°C	3 měsíce 2 roky

Materiál a přístrojové vybavení, které není součástí kitu

Napěťový zdroj 300V

Aparatura pro vertikální elektroforézu

Destilovaná voda

Kyselina chlorovodíková (HCl)

Kyselina octová

Kyselina trichloroctová (TCA)

Methanol

Špičky do automatických pipet, na jedno použití

Mikrozkumavky



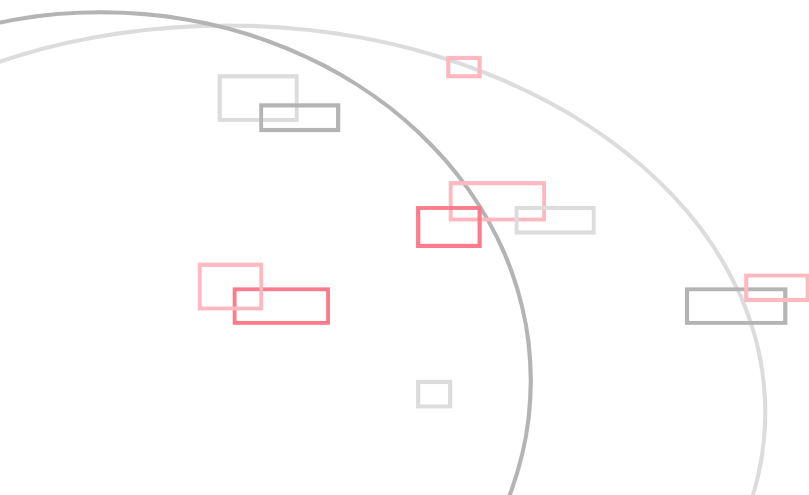
Latexové rukavice

Laboratorní váhy

pH metr

Laboratorní digestoř

Vyhřívaná vodní lázeň



Návod k použití

Vertikální polyakrylamidová gelová elektroforéza slouží k separaci proteinů na základě jejich velikosti (molekulové hmotnosti). Po následné vizualizaci separovaných proteinů v gelu se dá určit jejich relativní molekulová hmotnost srovnáním délky migrace se standardem o známé molekulové hmotnosti. K dělení proteinů se využívá vlastnosti odlišné pohyblivosti záporně nabitých molekul, přímo úměrný jejich hmotnosti, ve stejnosměrném elektrickém poli. Koncentrace akrylamidu použitého k přípravě gelu závisí na velikosti proteinů, které chceme separovat. Nízká koncentrace se využívá k separaci o vysoké molekulové hmotnosti, zatímco vysoká koncentrace k separaci o nízké molekulové hmotnosti.

Příprava separačního a koncentračního gelu

Pro separaci proteinů se používá tzv. diskontinuální elektroforéza skládající se ze dvou gelů o různém pH – zaostřovacího 6,8 pH (mobilita iontů v gelu je nízká) a separačního 8,8 pH (mobilita iontů v gelu je vysoká). A jelikož systémem protéká konstantní proud, musí být dle Ohmova zákona R koncentračního gelu vyšší než R separačního gelu. Je důležité, aby koncentrační gel obsahoval nízkou koncentraci polyakrylamidu a nebránil tak v pohybu proteinů.

Nejprve si připravíme podle tabulky 1 zásobní roztoky, které budeme později využívat na přípravu jednotlivých gelů a vlastní chod elektroforézy.

Tabulka 1: Zásobní roztoky pro elektroforézu

Roztok	Složky	Množství	Poznámka
Gelový pufr 8,8: 0,75 M TRIS-HCl pH 8,8	TRIS Destilovaná voda	45,5 g TRIS do 500 ml	-upravit pH na 8,8 přidáním HCl -skladovat v chladničce
Gelový pufr 6,8: 0,25 M Tris-HCl pH 6,8	TRIS Bromfenolová modř Destilovaná voda	6,1 špetka do 200 ml	-upravit pH na 6,8 přidáním HCl -skladovat v chladničce
10% roztok SDS	SDS Destilovaná voda	5 g do 50 ml	skladovat za lab. teploty
10% Ammonium persulfate (APS)	APS Destilovaná voda	0,5 g do 5 ml	připravovat vždy čerství
Zásobní elektrodotový pufr: 0,25 M Tris; 1,92 M glycin pH 8,3	TRIS Glycin SDS Destilovaná voda	30,3 g 144 g 10 g Do 1000 ml	skladovat za lab. podmínek
Provozní pufr	Zásobní elektrodotový pufr Destilovaná voda	100 ml 900 ml	připravovat vždy čerstvý
0,08 M Tris-HCl pH 8,0	TRIS Destilovaná voda	4,844 g rozpustit a doplnit do do 500 ml	-upravit pH na 8,0 přidáním HCl -skladovat v chladničce

Vzorkový pufr	SDS Glycerol Bromfenolová modř 2-Merkaptoethanol 0,08 M Tris-HCl pH 8,0	2 g 40 ml 0,02 g 1 ml do 100 ml	
----------------------	---	---	--

Jestliže jsou připravené zásobní roztoky, můžeme přejít k přípravě gelu. Připravte si čistou kazetu pro nalití gelů, která je upevněna z boku nádrže ve svislé poloze. Nyní si připravíme jednotlivé gely. Podle tabulky 2 nejprve namícháme směs pro 10% separační gel. Jednotlivé složky přidávat za pomalého míchání v pořadí jak se uvedeno v tabulce 2. Pomocí ml pipety nalijte připravený gel mezi skla, tak aby od okraje kratšího skla zůstala mezera 30 mm. Takto nalitý gel ihned převrstvěte (injekční stříkačkou) tenkou vrstvou destilované vody. Po zatuhnutí (cca 20 min) odlijte a filtračním papírem odsajte vodu z povrchu gelu. Připravte směs pro 5% koncentrační gel viz. tabulka 2. Pomocí ml pipety nalijte připravený gel na již zatuhlý separační gel, tak aby koncentrační gel byl nalit až po okraj kratší hranice skla. Poté opatrně zasuněte mezi skla hřebínek pro tvorbu jamek. Polymerace probíhá cca 60 min. Bezprostředně před vlastní elektroforézou vyndejte opatrně hřebínek a vzniklé jamky propláchněte elektrodovým provozním pufrem pomocí injekční stříkačky.

Tabulka 2: Složení gelových roztoků

Koncentrační gel (5%)		Separací gel (10%)	
Složky	Množství	Složky	Množství
40% Akryl/Bis 37,5:1	1,7 ml	40% Akryl/Bis 37,5:1	6,7 ml
1M TRIS (pH 6,8)	1,25 ml	1,5M TRIS (pH 8,8)	5 ml
10% SDS	0,1 ml	10% SDS	0,2 ml
TEMED	0,01 ml	TEMED	0,008 ml
Destilovaná voda	6,8 ml	Destilovaná voda	7,9 ml
10% APS	0,1 ml	10% APS	0,2 ml
Celkový objem	10 ml	Celkový objem	20 ml

Nanesení vzorku

Množství nanášeného extraktu závisí na velikosti jamky (hřebínku). Doporučené množství činí 15–20 μ l extraktu na jednu jamku. Před nanesením vzorku na gel je potřeba jej smíchat se vzorkovým pufrem (viz. tab. 1) v poměru 1:1. Do nové 1,5 ml mikrozkušavky přeneseme 100 μ l extraktu a smícháme se 100 μ l vzorkového pufru. Necháme 15 min inkubovat na suchém bloku při 65°C a poté 3 min. centrifugovat (10 000 x g). Naneste vzorky a délkový standard na gel. Kazetu s gelem umístíme do nádrže, která již obsahuje provozní pufr.

Vlastní elektroforéza

Elektroforetickou aparaturu uzavřete a připojte ji ke zdroji stejnosměrného napětí. Na zdroji nastavte konstantní proud 25 V a po zapnutí ponechte elektroforézu probíhat tak dlouho, až zóna bromfenolové modři doputuje ke spodnímu okraji gelu.

Barvení gelu v Coomassine Brilliant Blue R 250

Po rozdělení proteinů do frakcí je nutno proteiny v gelu fixovat. Fixace způsobuje denaturaci proteinů. Gel opatrně vyjměte z aparatury a dejte do vaničky s fixačním roztokem (viz. tabulka 3) a fixujeme cca 60 min. Slijte fixační roztok a gel přelijte směsným roztokem (viz. tabulka 3) a v tomto roztoku ponechejte gel 30 min. Po uplynutí stanovené doby, slijte směsný roztok a gel přelijte barvicím roztokem (viz. tabulka 3). Gel se barví přes noc. Druhý den odstraňte barvicí roztok a gel přelijte směsným roztokem pro odbarvení pozadí gelu po dobu 60 min. Nakonec odstraňte směsný roztok a gel přelijte destilovanou vodou.

Tabulka 3: Roztoky pro fixaci, barvení a sušení gelů

Pozn.: uvedené roztoky lze použít opakovaně (max. 10x)

Roztok	Složky	Množství	Poznámka
Fixační činidlo: 20% TCA	TCA- kys. trichloroctová	200 g	skladovat za lab. teploty
	Destilovaná voda	Do 1000 ml	
Směsný roztok	Methanol	250 ml	skladovat za lab. teploty
	Kyselina octová	100 ml	
	Destilovaná voda	650 ml	
Barvicí roztok	Coomassine brilliant blue R 250	0,25 g	skladovat za lab. teploty
	Směsný roztok	do 500 ml	
2% roztok glycerolu	Glycerol	20 ml	skladovat v chladničce
	Destilovaná voda	980 ml	

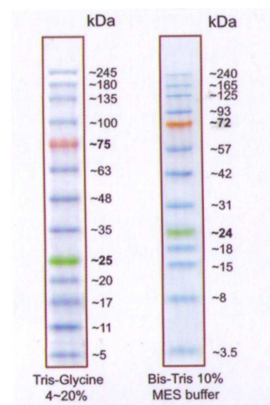
Sušení

Připravte skleněnou desku (rozměry desky musí být větší než velikost výsledného gelu). Dále je nutno připravit dva obdélníky z celofánu (rozměry prvního obdélníku se rovnají rozměrům skleněné desky (strany druhého obdélníku jsou cca o 2 cm delší než strany skleněné desky). Takto připravený celofán a gel ponořit do připraveného 2% roztoku glycerolu (viz. tabulka 3) na cca 2 hodiny. Poté 1. celofánový obdélník položit na skleněnou desku, na něj umístit gel a přikrýt 2. celofánovým obdélníkem. Okraje celofánu přehnout pod skleněnou desku a plochu eventuálně vyhladit plastovým válečkem (odstranění vzduchových bublin). Sušit při laboratorní teplotě v dostatečné vzdálenosti od zdrojů tepla a světla. Nyní lze vyhodnotit výsledky.

Blue Protein Ladder

Blue Protein Ladder obsahuje 13 předbarvených proteinů pokrývajících velikostní rozmezí 3,5 až 245 kDa. 11 proteinů obsahuje kovalentně navázanou modrou barvičku. Dva proteiny slouží jako referenční a obsahují zelenou barvičku (25 kDa) nebo červenou barvičku (75 kDa). Velikosti odpovídají migraci na SDS-PAGE s použitím Tris-glycinového pufru.

Doporučené použití 5 μ l na jamku při použití 10ti jamkového minigelu.



Duševní vlastnictví: Společnost Central European Biosystems s.r.o. je vlastníkem veškerých práv duševního vlastnictví ve vztahu k tomuto dokumentu, pokud není výslovně uvedeno jinak. Reprodukce, převod, rozšiřování částí nebo celého obsahu v jakékoliv podobě bez předchozího písemného souhlasu společnosti Central European Biosystems s.r.o je zakázáno.