ЭЛЕКТРОФОРЕЗ В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ ПО ЛЭММЛИ.

Подготовка образца для электрофореза 1D

Содержание солей в пробе не должно составлять более 100 мМ.

При низком содержании белка в образце рекомендуется осаждать белок 10% ТХУ. Для этого к аликвоте образца прилить такое же количество 20% р-ра ТХУ и оставить образец на 30 мин при 4°С, затем центрифугировать 10 мин при 14000 об/мин. К осадку добавить холодный ацетон (-20°С) в трехкратном количестве и центрифугировать 1 мин при 16000 об/мин. Процедуру отмывки повторить. Остаток ацетона высушить в эксикаторе.

Растворы

1. ***30% раствор акриламида на 50 мл***: 14,6г. акриламида и 0,4 г. бисакриламида
2. ***44% раствор акриламида на 50 мл***: 21,4 г акриламида и 0,55 г бисакриламида
3. ***10% раствор ДСН***: 5 г на 50 мл
4. ***0,1 М р-р ЭДТА***: 2,6 г. на 100 мл
5. ***1,5 М трис- HCl буфер pH 8,8*** 18,5г триса. на 100 мл
6. ***0,5 М трис-HCl буфер pH 6,8*** 3,2 г триса на 50 мл
7. ***50% р-р глицерина***
8. ***Электродный буфер:*** pH 8,34, содержащий 0,1% ДСН. 28,8 г. глицина растворить в 900 мл воды, оттитровать сухим трис до pH 8,34, добавить 20 мл 10% ДСН, довести водой до 1 л.

ПЕРЕД ПРИМЕНЕНИЕМ РАЗБАВИТЬ ВОДОЙ В 2 РАЗА

9. ***0,05% р-р бромфенолового синего*** 50 мг на 100 мл
10. ***Буфер для растворения образца:***

Реагент	**Количество, мл**
0,5 М трис-HCl буфер pH 6,8	2,5
100% глицерин	2
0,1 М ЭДТА	0,16
в-меркаптоэтанол или ДТТ (0,31 г)	0,4
10% ДСН	4
0,05% бромфеноловый синий	0,2 мл
Вода	До 10 мл

Пробка

1 мл акриламида (30%)+1 мл воды+30 мкл ПСА (50 мг/0,5 мл)+5 мкл ТЕМЕД

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАЗДЕЛЯЮЩЕГО ГЕЛЯ

Реагент	Концентрация геля %		
	10	**13**	**25**
Вода	1,25	0,750	1,2
1,5М трис-HCl буфер pH 8,8	1,25	1,25	7,5
30% р-р акриламида	1,65	2,15	17 (44% р-р)
50% глицерин	0,75	0,75	3
ДЕГАЗИРОВАТЬ!			
10% SDS	50 мкл	50 мкл	300 мкл
Персульфат аммония (50 мг/0,5 мл)	50 мкл	50 мкл	200 мкл
ТЕМЕД	4 мкл	4 мкл	4 мкл

ПРИГОТОВЛЕНИЕ КОНЦЕНТРИРУЮЩЕГО 5% ГЕЛЯ

Реагент	количество	
Вода	3,7 мл	1,9 мл
0,5 М трис-HCl буфер pH 6,8	2,5 мл	1,25 мл
30% р-р акриламида	1,5 мл	0,75 мл
ДЕГАЗИРОВАТЬ!		
10% SDS	100 мкл	50 мкл
Персульфат аммония (50 мг/0,5 мл)	50 мкл	15 мкл
ТЕМЕД	5 мкл	4 мкл

Фиксаж:
в растворе этанол:уксусная кислота:вода в соотношении 40:10:60

Окрашивание геля с помощью Кумасси ярко голубого (чуствительность 0.3-1.0 µg белка).
1. Раствор для окрашивания (0,025% Кумасси ярко голубой R 250, 10% уксусная кислота).
Растворите в 1 л 10% уксусной кислоты 0,25 г. Кумасси ярко голубого R 250.
Раствор хранится при комнатной температуре не более 6 месяцев.
2. Раствор для проявления
15% уксусная кислота
Раствор хранится при комнатной температуре.

Окрашивание геля с помощью коллоидного Кумасси ярко голубого G-250 (чуствительность ~10 ng белка).
250 мг Кумасси G-250 и 24 г. $(NH_4)_2SO_4$ растворить в 100 мл этанола прилить 4,8 мл фосфорной кислоты, раствор довести водой до 300 мл

Электрофорез пептидов
отличается только концентрацией разделяющего геля и катодным буфером
Приготовление разделяющего геля