



# SEMMELWEIS EGYETEM

Orvosi Biokémiai Intézet  
1094 Budapest, Tűzoltó u. 37-47.

## SZABVÁNYMŰVELETI ELŐÍRÁS

BIO-RAD készüléken történő SDS-gélelektroforézis és blottolás

Készítette:

2008.10.31.

**Fodor Gábor**  
laborasszisztens

*Dátum*

Jóváhagyta:

2008.10.31.

**Dr. Kolev Kraszimir**  
részlegvezető

*Dátum*

MIR szempontból  
ellenőrizte:

2008.10.31.

**Dr. Kolev Kraszimir**  
minőségirányítási vezető

*Dátum*

<b>A dokumentáció kódja:</b>	SE-OBI-H-MU-01
<b>Változat száma:</b>	01
<b>Érvénybelépés időpontja:</b>	2008.10.31.
<b>Oldalak száma:</b>	9
<b>Mellékletek száma:</b>	0

Nyilvántartott példány:

Munkapéldány:

A példány sorszáma:

Ezen Szabványműveleti előírás a **Semmelweis Egyetem** szellemi tulajdona. Továbbadása, sokszorosítása írásos engedélyhez kötött. A Munkautasításban szereplő információt csak a minőség- és környezetirányítási rendszer működtetéséhez lehet felhasználni.



# SZABVÁNYMŰVELETI ELŐÍRÁS

BIO-RAD készüléken történő SDS-gélelektroforézis és blottolás

## MÓDOSÍTÁSOK JEGYZÉKE

Módosította Dátum/Aláírás	Módosított oldalszám	Jóváhagyta Dátum/Aláírás	Ellenőrizte Dátum/Aláírás	Kibocsátás időpontja



# SZABVÁNYMŰVELETI ELŐÍRÁS

BIO-RAD készüléken történő SDS-gélelektroforézis és blottolás

## TARTALOMJEGYZÉK

A SZABVÁNYMŰVELETI ELŐÍRÁS CÉLJA.....	4
A SZABVÁNYMŰVELETI ELŐÍRÁS ÉRVÉNYESÉGI TERÜLETE .....	4
ILLETÉKESÉG ÉS FELELŐSSÉG MEGHATÁROZÁSA .....	4
A SZABVÁNYMŰVELETI ELŐÍRÁS LEÍRÁSA .....	4



# SZABVÁNYMŰVELETI ELŐÍRÁS

## BIO-RAD készüléken történő SDS-gélelektroforézis és blottolás

### A SZABVÁNYMŰVELETI ELŐÍRÁS CÉLJA

Összefoglalja a rutinszerűen alkalmazott technológiai eljárás részleteit.

### A SZABVÁNYMŰVELETI ELŐÍRÁS ÉRVÉNYESÉGI TERÜLETE

Orvosi Biokémiai Intézet Hemosztázis részlege.

### ILLETÉKESÉG ÉS FELELŐSSÉG MEGHATÁROZÁSA

#### A dokumentum kidolgozásáért felelős:

Részlegvezető

#### A dokumentum alkalmazásáért felelős:

Kutatók, oktatók

#### A dokumentumban foglaltak végrehajtásáért felelős:

Laborasszisztensek.

#### A dokumentumban szabályozott tevékenység rendszer felülvizsgálat alkalmazásával történő felülvizsgálataért felelős:

A Minőségirányítási vezető

### A SZABVÁNYMŰVELETI ELŐÍRÁS LEÍRÁSA

Törzssoldatok

A) 100 ml 30%-os akrilamid oldat összetétele

-29.2 g acrilamid

-0.8 g N<sup>2</sup>-N'-bisz-metilén-akrilamid

-tárolás 1 hónapig hűtőben

B) 1.5 M TRIS-HCl pH8.8

C) 0.5 M TRIS-HCl pH6.8

D) 10 % SDS vízben

E) Mintakezelő puffer  
víz

4 ml



# SZABVÁNYMŰVELETI ELŐÍRÁS

## BIO-RAD készüléken történő SDS-gélelektroforézis és blottolás

“C” oldat	1 ml (0,0625 M ph= 6,8)
glicerin	0.8 ml (10%)
“D” oldat	1.6 ml (2%)
+/- β-merkaptotanol	0.4 ml (5,76mM)
0.05% brómfenolkék	<u>0.2 ml (0,1 mg)</u>
	8 ml

A minta legalább négyszeresére híguljon, a felvitt fehérje 5-10 µg legyen 20-30 µl-ben.

F) 5-ször tömény futtató puffer összetétele

-15 g/l TRIS

-72 g/l glicin

-5 g/l SDS

Egy futtatáshoz 48 ml-t a fenti pufferből kell hígítani 240 ml-re vízzel.

### 7.5%-os gél készítése

Az oldatot légteleníteni kell szobahőn a 10% ammónium perszulfát és a TEMED hozzáadása előtt!

víz	4.85 ml
“B” oldat	2.5 ml
“D” oldat	0.1 ml
“A” oldat	2.5 ml
10% ammónium perszulfát (friss)	0.05 ml
TEMED	0.005 ml

A lapok közötti teret fel kell tölteni olyan szintre, ami a fésű alatt 1 cm-ig terjed. Rá kell rétegezni vizet. Polimerizáció 1h.

### 4%-os bekoncentrázó gél készítése

Az oldatot légteleníteni kell szobahőn a 10% ammónium perszulfát és a TEMED hozzáadása előtt!

víz	6.1 ml
“C” oldat	2.5 ml
“D” oldat	0.1 ml
“A” oldat	1.3 ml
10% ammónium perszulfát (friss)	0.05 ml
TEMED	0.01 ml

### Futtatás 200 V-tal kb.45 min.

#### Blottolás

Transzfer -puffer (TP): 25 mM Tris 192 mM glicin 20%v/v metanol (Készítése: 3.03 g Tris, 14.4 g glicin feloldása 500 ml deszt. vízben, + 200 ml metanol + kiegészíteni 1 l-re vízzel) **pH-t nem szabad állítani!**

Készítsünk jeget a hűtő-rekeszben!

Mindig kesztyűben dolgozzunk!

Az elektroforézis után a géleket 15 percig áztassuk TP-ben.

A NC-membránt vágjuk a gél mérete szerint és utána 45°-os szögben itassuk fel a TP-vel 30 perc alatt.

Méretre vágott szűrőpapírt és a szivacs-párnákat TP-ben áztassuk bele.

Töltsünk TP-t a kádba (400 ml) és tegyük bele a hűtő-rekeszt valamint egy mágneskeverőt.

Állítsuk össze a szendwicht: a fekete lapon 1. szivacs; 2. szűrőpapír; 3. 2 ml TP; 4. gél; 5. 5 ml TP; 6. NC-membrán (két szélénél fogva először a membrán közepe érintse a gél); 7. kémcsővel összepréseljük a membránt a gélhez buborékmentesre; 8. 5 ml TP; 9. szűrőpapír; 10. szivacs. Zárjuk a kazettát és tegyük be a blottoló egységbe (fekete lap a fekete elektróda felé- negatív pólus!).

Töltsük a kádat TP-vel (kb. 650 ml kell összesen).



# SZABVÁNYMŰVELETI ELŐÍRÁS

## BIO-RAD készüléken történő SDS-gélelektroforézis és blottolás

Blottolás 90 min 100 V, 250mA mellett, közben a kádat jégben tartjuk.

Blottolás után Coomassie-val megfestjük a geleteket.

### Az NC-membrán ECL-festése

1. 1 h inkubálás blokkoló oldatban szobahőn, vagy ha úgy adódik egy éjszakán át 4°C-on. (10ml kell egy blotthoz)
2. Mosások (mindegyik 50 ml membránonként):
  - a. 2x 15 min PBS-T-vel
  - b. 2x 5 min PBS-T-vel
3. Inkubálás 1 h 1:1500 anti- $\alpha_2$ -antiplasmin antitesttel PBS-ben oldva (25ml)
4. Mosások (mindegyik 50 ml membránonként):
  - a. 2x 15 min PBS-T-vel
  - b. 2x 5 min PBS-T-vel
5. Inkubálás 1:10 000 anti-rabbit antitesttel PBS-ben 1 h alatt (25 ml)
6. Mosások (mindegyik 50 ml membránonként):
  - a. 2x 15 min PBS-T-vel
  - b. 2x 5 min PBS-T-vel

### „Fényképezés”

1. A fotokazettába alulra írásvetítő fóliát helyezünk.
2. ECL reagenst összekeverni 1:1 arányban 1. és 2. reagensekből (0.125 ml/cm<sup>2</sup> mennyiség szükséges)
3. A membránt 1 percig inkubáljuk az ECL oldatban szobahőn.
4. A fóliára tesszük a membránt úgy, hogy a protein oldala felfelé nézzen.
5. Újabb fóliával befejezzük a szendvicset, majd egy szűrőpapírral is letakarjuk.
6. Bezárjuk a kazettát.

### A sötétkamra

7. Az előre beírt időpontra felmegyünk. Kulcs a határidő napló mellett!
8. Felkapcsoljuk a kisvillanyt, és elindítjuk a gépet
9. Kinyitjuk a kazettát, és letöröljük az esetleg kifolyt ECL folyadékot.
10. Elsötétítünk.
11. Kibontunk egy filmet. A többi filmet visszacsomagoljuk. (Ajánlott betartani, mert 50 000 HUF egy dodoz ára!)
12. Vágással megjelöljük az egyik sarkát, majd a kazettába helyezük.
13. Zárt kazettában az antitest függvényében 1-20 percig reagáltatjuk a filmet.
14. A bekapcsolt készülékbe bemeneti nyílásának jobb oldalára helyezük a filmet (orientáció nem számít).
15. A gép automatikusan beszedi, és előhívja. (pár perc)
16. Ellenőrizzük, h sikerült-e! Ha nem, ismétlés!
17. Lekapcsolni mindent (gép, villanyok).
18. Bezárni a kamrát, kulcsot visszavinni, felírni a füzetbe hányat hívtunk elő!
19. Elpakolni a kellékeket, membránt fóliákkal együtt kidobni! (Vagy új reakcióba vinni!)



# SZABVÁNYMŰVELETI ELŐÍRÁS

## BIO-RAD készüléken történő SDS-gélelektroforézis és blottolás

### **DAB festés**

Mosásokhoz PBS-T-t használunk (100 mM foszfát 100 mM NaCl pH 7.5): 11.5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.96 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5.84 g NaCl 0.1% Tween-20 .

10 g/l BSA PBS-T-ben lesz a blokkoló oldat. Ebben 1 h alatt áztassuk a membránokat (100 ml kell) szobahőn vagy ha úgy adódik egy éjszakán át 4°-on.

Mosások (mindegyik 100 ml membránonként):

2x 15 min PBS-T-vel

2x 5 min PBS-T-vel

Inkubálás 1 h 1 µg/ml antitesttel (mouse) PBS-ben (50 ml-ben).

Mosások (mindegyik 100 ml membránonként):

2x 15 min PBS-T-vel

2x 5 min PBS-T-vel

Festés (kesztyűben: a DAB karcinogén!)

- festő oldat 0.05% diaminobenzidin 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.02% NiCl<sub>2</sub> PBS-ben (készítése: DAB-ot 15 perccel a munka előtt kivenni a mélyütőből; 100 mg DAB-ot feloldani 50 ml vízben és kiegészíteni 196 ml-re vízzel; utána hozzáadni 4 ml 1% NiCl<sub>2</sub>-t; 20 perc inkubáció, ha csapadék lesz, akkor a nikkelt kihagyni; +2 ml 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

-festési idő

A keletkező képeket a kísérlet jegyzőkönyvéhez csatoljuk és a SE-OBI-ME-01 eljárás szerint iktatjuk és archiváljuk.



# SZABVÁNYMŰVELETI ELŐÍRÁS

BIO-RAD készüléken történő SDS-gélelektroforézis és blottolás

## Szeparáló gél

5%-os gél	1db	2db	3db	4db
deszt. Víz	2.845	5.690	8.535	11.380
1,5 M Trisz-HCl pH=8,8	1.250	2.500	3.750	5.000
10% SDS	0.050	0.100	0.150	0.200
30% AA törzsoldat	0.830	1.660	2.490	3.320
10% APS	0.025	0.050	0.075	0.100
TEMED	0.0025	0.005	0.0075	0.010

7,5%-os gél	1db	2db	3db	4db
deszt. Víz	2.425	4.850	7.275	9.700
1,5 M Trisz-HCl pH=8,8	1.250	2.500	3.750	5.000
10% SDS	0.050	0.100	0.150	0.200
30% AA törzsoldat	1.250	2.500	3.750	5.000
10% APS	0.025	0.050	0.075	0.100
TEMED	0.0025	0.005	0.0075	0.010

10%-os gél	1db	2db	3db	4db
deszt. Víz	2.010	4.020	6.030	8.040
1,5 M Trisz-HCl pH=8,8	1.250	2.500	3.750	5.000
10% SDS	0.050	0.100	0.150	0.200
30% AA törzsoldat	1.667	3.333	5.000	6.666
10% APS	0.025	0.050	0.075	0.100
TEMED	0.0025	0.005	0.0075	0.010

12,5%-os gél	1db	2db	3db	4db
deszt. Víz	1.675	3.350	5.025	6.700
1,5 M Trisz-HCl pH=8,8	1.250	2.500	3.750	5.000
10% SDS	0.050	0.100	0.150	0.200
30% AA törzsoldat	2.000	4.000	6.000	8.000
10% APS	0.025	0.050	0.075	0.100
TEMED	0.0025	0.005	0.0075	0.010

15%-os gél	1db	2db	3db	4db
deszt. Víz	1.175	2.350	3.525	4.700
1,5 M Trisz-HCl pH=8,8	1.250	2.500	3.750	5.000
10% SDS	0.050	0.100	0.150	0.200
30% AA törzsoldat	2.500	5.000	7.500	10.000
10% APS	0.025	0.050	0.075	0.100
TEMED	0.0025	0.005	0.0075	0.010

19,8%-os gél	1db	2db	3db	4db
deszt. Víz	0.375	0.750	1.125	1.500
1,5 M Trisz-HCl pH=8,8	1.250	2.500	3.750	5.000
10% SDS	0.050	0.100	0.150	0.200
30% AA törzsoldat	3.333	6.666	9.999	13.332
10% APS	0.025	0.050	0.075	0.100

## Zimográfia

12,5% os gél:  
50 µl zselatin / gél  
(5ml)

3,7 - 3,75 ml  
fér az üveglapok  
közé





# SZABVÁNYMŰVELETI ELŐÍRÁS

BIO-RAD készüléken történő SDS-gélelektroforézis és blottolás

TEMED	0.0025	0.005	0.0075	0.010
-------	--------	-------	--------	-------

## *Koncentráció gél*

4%-os gél	1db	2db	3db	4db
deszt. Víz	3.050	6.100	9.150	12.200
0,5 M Trisz-HCl pH=6,8	1.250	2.500	3.750	5.000
10% SDS	0.050	0.100	0.150	0.200
30% AA törzsoldat	0.650	1.300	1.950	2.600
10% APS	0.025	0.050	0.075	0.100
TEMED	0.0050	0.010	0.0150	0.020