

## Praktické cvičení č.

datum: \_\_\_\_\_ jméno: \_\_\_\_\_

### Téma:

## 1.Stanovení fenotypu haptoglobinu pomocí elektroforézy na polyakrylamidovém gelu

### Přístroje a pomůcky:

Elektroforetická aparatura Mini –Protean Tetra Cell ( Bio-Rad), stojánky, zkumavky, pipety, špičky, kádinky, převážky, michačka  
7,5% PAGE gely Mini Protean ( Bio-Rad), Tris-Puftr, metanol, vzorkový puftr (Bio-Rad), hemoglobin pro přípravu vzorků, destilovaná voda

### Úkoly:

**1. Připravit pracovní puftr –** připravte 1 l pracovního puftru:

- 100 ml Tris puftru (Bio-Rad)
- 200 ml methanolu
- 700 ml destl. vody

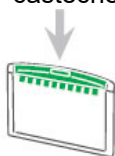
**2. Připravit vzorky:** do označených eppendorfrk napipetujte:

- 7  $\mu$ l vzorku (plazma, sérum)
- 5  $\mu$ l hemoglobinu
- 24  $\mu$ l vzorkového puftru

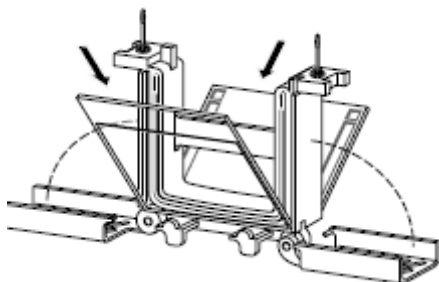
Promýchat před nanášením pipetou – nanést 30  $\mu$ l vzorku na jamku

**3. Příprava gelu a sestavení elektroforetické aparatury Bio-Rad Mini –Protean Tetra Cell**

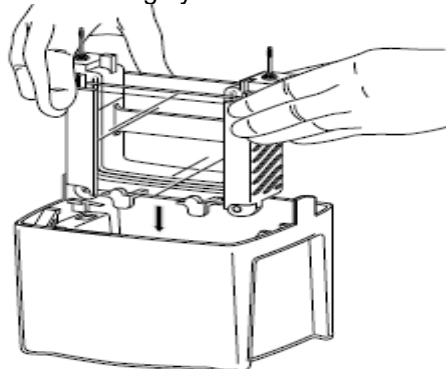
- po vyjmutí gelu z obalu je nutné odstranit proužek ze spodní části gelu a opatrně částečně vytáhněte hřebínek v horní části gelu



- umístěte polyakrylamidový gel do držáku



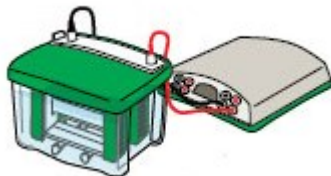
- vložte držák s gely do elektroforetické vany



- naplňte elektroforetickou vanu po rysku připraveným pufrem
- vytáhněte hřebínek v horní části gelu



- napipetujete připravené promýchané vzorky do jamek gelu - nanést 30 µl vzorku na jamku
- umístíte víko elektroforetické aparatury a připojíte zdroj



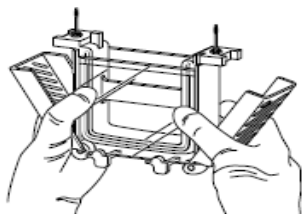
- nastavte zdroj na 150 V a spusťte elektroforetické dělení – „RUN“
- doba dělení asi 1,5 hod.

#### 4. Připravte vizualizační roztok – celkem 500 ml:

- Na předvážkách navážit 250 mg diaminobenzidinu,
- rozpustit v kádince na míchačce v 300 ml fosfátového pufru,
- po rozpuštění přelít do odměrné baňky a doplnit do 500 ml
- nalijte do nádoby pro vizualizaci gelu
- těsně před použitím přidat 1,2 ml 30% peroxidu vodíku

#### 5. Po ukončení elektroforetického dělení:

- vypněte a odpojte zdroj
- sundejte víko
- vyjměte držák s gely z elektroforetické vany



- pomocí skalpelu odstraňte kryt gelu a gel ponořte do nádoby s vizualizačním roztokem
- vizualizace probíhá asi 20-30 min., poté gel opatrně vyjměte a položte na připravenou skleněnou desku

#### 6. Určete typ fenotypu haptoglobinu pro jednotlivé vzorky

| vzorek číslo         | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|----------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|
| fenotyp haptoglobinu |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |

## 2.ELEKTROFORÉZA BÍLKOVIN V SÉRA

**PRINCIP:** metoda slouží k rozdělení a kvantifikaci šesti hlavních frakcí (albumin, alfa1, alfa2, beta1, beta2 a gama frakce) proteinů lidského séra elektroforézy na agarosovém gelu v prostředí alkalického pufru (pH 8,5).

**REAGENCIE:** Souprava Hydragel 30  $\beta$ 1- $\beta$ 2 (výrobce Sebia)

- agarosový gel, připraven k použití,
- kontaktní proužků, pufrovaných, připraveno k použití
- aplikátory vzorků
- filtrační papíry

### PRACOVNÍ POSTUP:

#### 1. Migrace:

- zapněte HYDRASYS
- vyberte program: **15/30 B1-B2 prog. č. 4**
- vybalte aplikátory (hřebeny) z krabičky
- položte aplikátory na plochu pracovního stolu čísly (jamkami) směrem k sobě
- aplikujte 10  $\mu$ l séra do každé jamky.
- po aplikaci posledního vzorku vložte aplikátor zuby směrem nahoru do vlhké komůrky, kde nechte séra dále difundovat do aplikátoru ještě 5 minut (po nanesení posledního vzorku).
- otevřete víko migrační komory a zvedněte nosič elektrod a aplikátorů
- vybalte gel
- krátce odsajte přebytek roztoku z povrchu gelu tenkým filtračním papírem
- aplikujte 200  $\mu$ l destilované vody na migrační destičku, na přední část předtištěného rámečku
- umístěte gel na desku do prostoru předtištěného rámečku
- Ujistěte se, že pod gelem nezůstaly žádné vzduchové bubliny!
- vybalte houbičky nasycené puftrem z balení a umístěte je plastickými konci na kovové trny do aplikačního rámečku
- sklopte aplikační rámeček do dolní pozice
- vyjměte aplikátor z vlhké komůrky a odstraňte z něj ochranný rámeček ze strany zubů
- **umístěte aplikátory do pozice 3 a 9 v aplikačním rámečku.**
- (čísla vytištěná, vyražená na aplikátoru vzorků musí vždy směřovat k obsluze)
- uzavřete kryt migrační komory HYDRASYSU
- zavřete víko migračního modulu a zapněte START

#### 2. Barvení: jestliže je gel připraven pro barvení, vyjměte jej z migrační komory a vložte jej do nosiče gelu dle následujících pokynů

- otevřete nosič gelu
- položte jej na desku stolu
- umístěte gel do drážek vyfrézovaných v nosiči gelů, tak aby citlivá strana gelu směřovala k vám
- uzavřete nosič gelu a ujistěte se, že gel je správně uchycen
- vložte nosič gelu s gelem do barvicí komory
- vyberte barvicí program (staining program) - Prot/B1-B2/Hb
- po ukončení barvicí procedury vyjměte usušený gel z barvicí komory

#### 3. Vyhodnocení elektroforeogramu

- elektroforeogram naskenujte
- proveďte vyhodnocení jednotlivých frakcí pomocí programu PHORESIS

|                      | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|----------------------|---|---|---|---|---|
| albumin              |   |   |   |   |   |
| $\alpha$ 1 globuliny |   |   |   |   |   |
| $\alpha$ 2 globuliny |   |   |   |   |   |
| $\beta$ 1 globuliny  |   |   |   |   |   |
| $\beta$ 2 globuliny  |   |   |   |   |   |
| $\gamma$ globuliny   |   |   |   |   |   |

