

Příprava separovacího a “stacking” gelu pro Western blot

1. Zvolte požadovanou koncentraci gelu, a to dle velikosti separovaných molekul (viz. tabulka).

Koncentrace gelu (%)	6	8	10	12	15
Rozsah velikostí (kD)	50-200	30-95	20-80	12-60	10-43

2. připravte separovací a stacking gel smícháním patřičného množství komponent uvedených v tabulkách. Komponenty přidávejte v uvedeném pořadí. Před přidáním TEMEDU roztok důkladně promíchejte. Po přidání TEMEDu začíná roztok polymerovat, a proto jej urychleně aplikujte mezi skla.

Separovací gel (20 ml):

	Koncentrace gelu	6 %	8 %	10 %	12 %	15 %
30 % směs akrylamidu	H ₂ O	10.6 ml	9.3 ml	7.9 ml	6.6 ml	4.6 ml
	30 % směs akrylamidu	4 ml	5.3 ml	6.7 ml	8 ml	10 ml
	Tris (1.5 M, pH 8.8)	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml
	10 % SDS* <i>pouze pro SDS-PAGE !</i>	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
	10 % APS*	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
	TEMED**	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
	40 % směs akrylamidu	Koncentrace gelu	6 %	8 %	10 %	12 %
40 % směs akrylamidu	H ₂ O	11.6 ml	10.6 ml	9.6 ml	8.6 ml	7.1 ml
	40 % směs akrylamidu	3 ml	4 ml	5 ml	6 ml	7.5 ml
	Tris (1.5 M, pH 8.8)	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml
	10 % SDS* <i>pouze pro SDS-PAGE !</i>	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
	10 % APS*	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
	TEMED**	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl

* před přidáním komponenty roztok řádně promíchejte.

** řádně promíchejte a ihned vlijte mezi připravená skla a převrstvěte izopropanolem

„Stacking“ gel (typicky 5%).

	Objem gelu	1 ml	3 ml	5 ml	8 ml	10 ml
30 % směs akrylamidu	H ₂ O (ml)	0.68 ml	2.1 ml	3.4 ml	5.5 ml	6.8 ml
	30 % směs akrylamidu	0.17 ml	0.5 ml	0.83 ml	1.3 ml	1.7 ml
	Tris (1.0 M, pH 6.8)	0.13 ml	0.38 ml	0.63 ml	1 ml	1.25 ml
	SDS (10 % roztok) * <i>pouze pro SDS-PAGE !</i>	10 µl	30 µl	50 µl	80 µl	100 µl
	APS (10 %) *	10 µl	30 µl	50 µl	80 µl	100 µl
	TEMED**	1 µl	3 µl	5 µl	8 µl	10 µl
	40 % směs akrylamidu	Objem gelu	1 ml	3 ml	5 ml	8 ml
40 % směs akrylamidu	H ₂ O	0.725 ml	2.185 ml	3.645 ml	5.84 ml	6.3 ml
	40 % směs akrylamidu	0.125 ml	0.375 ml	0.625 ml	1 ml	1.25 ml
	Tris (1.0 M, pH 6.8)	0.13 ml	0.38 ml	0.63 ml	1 ml	1.25 ml
	SDS (10 %) * <i>pouze pro SDS-PAGE !</i>	10 µl	30 µl	50 µl	80 µl	100 µl
	APS (10 %) *	10 µl	30 µl	50 µl	80 µl	100 µl
	TEMED**	1 µl	3 µl	5 µl	8 µl	10 µl

* * před přidáním komponenty roztok řádně promíchejte.

** řádně promíchejte a ihned vlijte mezi připravená skla a vložte hřebec.