

2X Nanášecí pufr pro Western blot (Laemmliho pufr)

Složení:

- 20% glycerol
- 10% beta-merkaptóetanol (C₂H₆OS, syn. 2-merkaptóetanol, 2-hydroxymetylmerkaptan)
- 4% SDS
- 0,02% bromfenolová modř
- 120 mM Tris-HCl, pH 6,8
- dH₂O

Hazard

beta-merkaptóetanol:

Zdraví škodlivý při vdechování a

při požití. Toxický při styku s kůží. Způsobuje poleptání. Dráždivost a žíravost.

SDS: hořlavý, zdraví škodlivý, dráždivý



Skladování: při -20°C

Postup při přípravě:

Smíchejte:

- 1,8 ml dH₂O
- 4 ml 10% SDS
- 1,2 ml 1M Tris-HCl, pH 6,8
- 2 ml glycerolu
- 0,002 g bromfenolové modře
- v digestoři přidejte 1 ml beta-merkaptóetanolu

Důkladně promíchejte a alikvotujte. Skladujte při -20°C, alternativně pokud přidáte beta-merkaptóetanol až před použitím, můžete skladovat při pokojové teplotě.

- Laemmliho pufr je využíván k elektroforetické separaci proteinů.
- Glycerol vede k „zatěžkání“ vzorku a jeho snadnějšímu klesnutí na dno jamky. Beta-merkaptóetanol slouží k rozrušení intramolekulárních a intermolekulárních disulfidických můstků v molekule proteinu, SDS vede k denaturaci proteinu a poskytnutí negativního náboje proteinu. Bromfenolovou modří je vzorek obarven a může být snadno nanesen do jamek. Tris-HCl dodá potřebné pH. pH 6,8 je pro funkčnost roztoku zcela zásadní.

- 2X Lemmliho pufr je se vzorkem proteinů smíchán v poměru 1:1.

S SDS pracujte opatrně, použijte ústenku. Inhalace SDS může vést k vážnému poškození dýchacích cest. S merkaptóetanolem pracujte v digestoři.