

## Barwienie żeli SDS PAGE

Próbki mogą być barwione zarówno Coomasie co srebrem. Barwienie Coomasie nie wymaga żadnych zmian w standardowej metodzie. Procedura barwienia srebrem powinna być jednak dostosowana do wymagań spektrometrii mas. Zamieszczony protokół został przetestowany i wiadomo, że daje dobre wyniki. Protokół barwienia srebrem \*

1. Utwalanie: 45-60min. w 5% kw.octowym/50% metanolu
2. Etapy płukania: 15min. w 50% metanolu, następnie 15min. w wodzie destylowanej (MiliQ)
3. Zwiększenie czułości: 3min. w 0.02% tiosiarczanie sodu (może być przygotowany jako roztwór wyjściowy do 100krotnego rozcieńczenia 0.127M tiosiarczaniu sodu pięciokrotnie uwodnionego, 6.32 g/200ml).
4. Etapy płukania: 1x2min a następnie 1x1min w wodzie destylowanej (MiliQ). Uwaga! Płukać zgodnie z czasem wymienionym w przepisie.
5. Barwienie srebrem: 30-45min w 0.15% azotanie srebra (może być przygotowany jako 20% roztwór wyjściowy w wodzie. Przechowywać w ciemnej butelce w temperaturze pokojowej do 3 miesięcy)
6. Etapy płukania: 1x2min a następnie 1x1min. w wodzie destylowanej (MiliQ). Uwaga! Płukać zgodnie z czasem wymienionym w przepisie.
7. Wywoływanie: jedno szybkie płukanie w roztworze wywoływacza (0.04% formaliny albo 37% formaldehydzie) w 2% węglanie sodu) aż ciecz stanie się żółta. Następnie barwienie do momentu osiągnięcia odpowiedniej intensywności (zwykle nie więcej niż 2min). Wywoływacz powinien być sporządzony tuż przed użyciem. W tym celu rozpuścić 60g węglanu sodu w 3l wody i dodać 1.2ml formaliny.
8. Koniec wywoływania: Zamienić wywoływacz na 5% roztwór kwasu octowego.
9. Przechowywanie: Żele można przechowywać w 1% kw. octowym/10% metanolu.

\* Przepis zmodyfikowany z pracy Shevchenko et al (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. Electrophoresis 68, 850-858.