

## **PŘÍLOHOVÁ ČÁST**

### **Příloha 1 – složení jednotlivých roztoků / pufrů:**

#### **Složení Krebsova-Henseleitova pufru:**

1. 118 mM NaCl (dodáno společností PENTA)
2. 4,7 mM KCl (dodáno společností PENTA)
3. 1,2 mM MgSO<sub>4</sub> (dodáno společností PENTA)
4. 1,25 mM CaCl<sub>2</sub> (dodáno společností PENTA)
5. 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (dodáno společností PENTA)
6. 25 mM NaHCO<sub>3</sub> (dodáno společností PENTA)
7. 11 mM glukóza (dodáno společností SIGMA)

Zásobní roztok byl předpřipraven bez glukózy, která byla přidána vždy čerstvě do roztoku. Roztok se dále sytil pomocí kyslíku (95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub>) do doby než se pH dostalo na hodnotu 7,4.

#### **Složení Laemmliho pufru:**

1. 2 ml SDS ( $c_m = 0,1\text{g/ml}$ , SDS dodané společností SIGMA)
2. 1 ml glycerolu (dodáno společností SIGMA)
3. 0,6 ml Bis-Tris roztoku (viz. dále)
4. 1,4 ml mQH<sub>2</sub>O
5. Bromfenolová modř (Bromphenol Blue ACS reagent, dodané společností SIGMA)

#### **Složení homogenizačního média 1:**

1. 16,04 mg TRIS ( $c = 12,5\text{mM}$ ; TRIZMA® base; dodané společností SIGMA)
2. 9,52 mg EGTA ( $c = 2,5\text{mM}$ ; ethylenediaminetetraacetic acid, dodané společností SIGMA)

3. 2,92 mg EDTA ( $c = 1\text{mM}$ ; ethylene glykol-bis( $\beta$ -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid, dodané společností SIGMA)
4. 0,86 g sacharóza ( $c = 250\text{mM}$ ; dodáno společností PENTA)

Takto zvážené množství se rozpustilo v 20 ml mQH<sub>2</sub>O a pH na 7,4. Posléze bylo přidáno 7,71 mg DTT (DL-dithiothreitol; SIGMA). Následně byly přidány inhibitory proteáz (Complete, Roche Diagnostics) a inhibitory fosfatáz (PhosSTOP, Roche Diagnostics).

### **Složení homogenizačního média 2:**

1. Močovina 3,0 g
2. Thiomočovina 1,55 g
3. Tetrasodium pyrofosfát dekahydrát 45 mg
4. 2-merkaptóetanol 13  $\mu\text{l}$

Naměřené množství chemikálií vložíme do kádinky a doplníme objem na výsledných 10 ml pomocí mQH<sub>2</sub>O.

### **12%-ní dělicí gel (množství potřebné na dva gely):**

1. 3,4 ml mQH<sub>2</sub>O
2. 4,0 ml 30% akrylamidového roztoku (dodané společností SIGMA)
3. 2,5 ml pufru TRIS ( $\text{pH} = 8,8$ ) (viz dále)
4. 100  $\mu\text{l}$  SDS ( $c_m = 0,1\text{g} / \text{ml}$ ; SDS dodané společností SIGMA)
5. 50  $\mu\text{l}$  APS ( $c_m = 0,1\text{g} / \text{ml}$ ; APS dodané společností )
6. 10  $\mu\text{l}$  TEMED (dodané společností SERVA)

### **5%-ní zaostřovací gel (množství potřebné na dva gely):**

1. 2,85 ml mQH<sub>2</sub>O
2. 0,85 ml 30% akrylamidového roztoku (dodané společností SIGMA)
3. 1,25 ml pufru BIS-TRIS ( $\text{pH} = 6,8$ ) (viz dále)
4. 50  $\mu\text{l}$  SDS ( $c_m = 0,1\text{g} / \text{ml}$ ; SDS dodané společností SIGMA)
5. 25  $\mu\text{l}$  APS ( $c_m = 0,1\text{g} / \text{ml}$ ; APS dodané společností )
6. 5  $\mu\text{l}$  TEMED (dodané společností SERVA)

**Složení pufru TRIS (pH = 8,8):**

9,1 g TRIS (TRIZMA® base; dodané společností SIGMA) rozpuštěno ve 100 ml mQH<sub>2</sub>O a pH upraveno pomocí HCl na hodnotu 8,8.

**Složení pufru BIS-TRIS (pH=6,8):**

10,462 g BIS-TRIS (dodané společností SIGMA) rozpuštěno ve 100 ml mQH<sub>2</sub>O a pH upraveno pomocí HCl na hodnotu 6,8.

**Složení elektrodového pufru koncentrovaného:**

1. 30,3 g TRIS (TRIZMA® base; dodané společností SIGMA)
2. 144 g Glycin (dodané společností SIGMA)
3. 10 g SDS (dodané společností SIGMA)

Navážené množství bylo v kádince rozmícháno ve finálním objemu 1 litr. Takto koncentrovaný elektrodový pufr byl ředěn v poměru 1 : 9 (PUFR: mQH<sub>2</sub>O).

Vnitřní elektrodový pufr (v přímém kontaktu s gely) byl po každé elektroforéze vylit do odpadu. Vnější elektrodový pufr (vyplňující prostor aparatury) maximálně 5x recyklován.

**Složení Ponceau roztoku:**

0,1% Ponceau (dodané společností SIGMA) v 5% kyselině octové (dodané společností PENTA)

**Složení přenosového pufru:**

1. 40 ml methanolu (dodané společností Lach:Ner s.r.o.)
2. 140 ml mQH<sub>2</sub>O
3. 20 ml 10x koncentrovaný Tris/Glycin pufr (dodané společností Bio-Rad)

Naměřené objemy byly smíchány v kádince a membrány byly v pufru inkubovány několik minut před použitím.

**Coomassie Brilliant Blue G250 (CBB) a Bismark Brown R (BBR) (na 0,5 l roztoku):**

1. 1g CBB
2. 250 mg BBR
3. 200 ml methanolu (dodané společností Lach:Ner s.r.o.)
4. 35 ml 99% kyseliny octové (dodané společností PENTA)
5. 256 ml mQH<sub>2</sub>O

Připravený roztok byl uchováván při pokojové teplotě.

**Odbarvovací roztok (na 0,5 l roztoku):**

1. 200 ml methanolu (dodané společností Lach:Ner s.r.o.)
2. 35 ml 99% kyseliny octové (dodané společností PENTA)
3. 256 ml mQH<sub>2</sub>O

Připravený roztok byl uchováván při pokojové teplotě a recyklován filtrací za použití práškového aktivního uhlí.

**Složení TBS:**

1. 12,1 g TRIS (TRIZMA® base; dodané společností SIGMA)
2. 146,2 g NaCl (dodáno společností PENTA)

Navážené množství bylo rozpuštěno ve 4 litrech mQH<sub>2</sub>O. Pomocí HCl bylo upraveno pH na hodnotu 7,5 a objem byl doplněn na celkový objem 5 litrů.

**Složení TTBS:**

Do 1 litru TBS bylo přidáno 0,5 ml Tween 20 (dodáno společností SIGMA)