

SDS PAGE

Gel al 15%

- Montare l'apparecchio
- Preparare un gel al 15%

Running gel mix (4ml):

H ₂ O	880 µl
30% acrilammide mix	2 ml
1.5 M Tris pH 8.8	1 ml
10% SDS	40 µl
10% APS	40 µl
TEMED	10µl

Con una pipetta colare la mix nello spazio tra i due vetri fino ad arrivare a circa 2 cm dal bordo superiore e coprire con propanolo. Aspettare che il gel polimerizzi. Togliere il propanolo e asciugare con un po' di carta.

Stacking gel mix (2ml):

H ₂ O	1.36 ml
30% acrilammide mix	340 µl
1.0 M Tris pH 6.8	260 µl
10% SDS	20 µl
10% APS	20 µl
TEMED	6 µl

Con una pipetta colare la mix fino al bordo superiore ed inserire il pettinino. Aspettare che polimerizzi.

- Preparare i campioni da caricare su gel

→ Centrifugare le cellule indotte e non indotte a 7000rpm per 5 minuti.

→ Aggiungere ai due pellet ottenuti 100 µl di H₂O e agitare con il vortex per risospendere il lisato cellulare. Prelevare 40 µL di campione, trasferirli in una nuova eppendorf ed aggiungere 10 µl di sample buffer denaturante (4X). Far bollire i campioni per 5 minuti e centrifugarli 2 minuti a 12000 rpm prima di caricarli.

N.B. Conservare i 60 µL di campioni residui (indotto e non indotto), serviranno per il successivo Western Blot

→ Preparare l'apparecchio per la corsa del gel e 1000 ml (4 gel) di buffer di corsa (partendo dal buffer SDS concentrato 10X).

→ Caricare i campioni con un puntale (20 μ L per pozzetto, 10 μ L per il marker) in questo ordine:

- 1) non indotto
- 2) indotto
- 3) Marker

→ Inserire il gel nella vaschetta di corsa, aggiungere il buffer di corsa 1X.

→ Impostare l'alimentatore a 180 V e lasciare correre il gel per un'ora.