

Preparación de geles de SDS-PAGE.

1. La electroforesis se realiza en geles de 7 x 10 cm con un espesor de 0.75 mm.
2. El **gel separador** se prepara a una concentración de acrilamida del 7.5% y el **gel concentrador** del 4%.
3. La polimerización se lleva a cabo a temperatura ambiente y los geles se dejan reposar un mínimo de 8 h antes de su utilización.
4. Las muestras se desnaturalizan diluyéndolas 1:1 (v:v) con **buffer sample reductor**: **Tris 120 mM pH 6.3, glicerol 10%, SDS 6%, β-mercaptoetanol puro, azul de bromofenol 0.05 %** (como marcador del frente de migración). El **buffer sample no reductor**: Tris 120 mM pH 6.3, glicerol 20%, SDS 4%, azul de bromofenol 0.1 %.
5. La mezcla así preparada se deja a temperatura ambiente durante 15 minutos y a continuación se aplica una alícuota de 30 µl (30 µg) en cada pocillo del gel. En cada gel se colocan patrones proteicos de 40-200 KDa.
6. El **buffer de electroforesis** es **Tris 25 mM, pH 8.3, glicina 190 mM y SDS 0.1%**. La electroforesis se comienza a 80 V hasta que la muestra penetra en el gel separador, entonces se eleva el voltaje a 180 V.
7. Los geles se tiñen durante 1 hora con una solución que contiene **0.25 g del colorante Coomassie Brilliant Blue (R-250), disueltos en 125 ml de isopropanol, 50 ml de ácido acético glacial y 325 ml de H₂O**. Para desteñir el gel, se lava varias veces con ácido acético al 7.5 %.

PROTOCOLO

1. Limpiar los cristales con jabón y enjuagarlos con abundante agua destilada. Después limpiarlos con metanol para deslipidizarlos.
2. Colocar entre ambos cristales el separador del grosor indicado. Fijar los cristales procurando que queden a la misma altura con el fin de que el gel no se salga. Para ello se utiliza el soporte de las placas donde posteriormente se polimerizará el gel.
3. En el soporte para las placas se colocan las gomas inferiores. Se prepara el gel separador. Sin perder tiempo se añade dicho gel entre las placas hasta una altura aproximada de 1 cm del final del cristal pequeño. Después de añadir el gel se pone agua destilada sobre la superficie.
4. Conservar una pipeta Pasteur llena de gel para saber cuando polimeriza, debe tardar unos 20 min.
5. Completa la polimerización del gel separador se elimina el agua con ayuda de papel secante. Se adiciona el gel concentrador, preparado momentos antes, hasta llenar totalmente el espacio entre los dos cristales. Rápidamente se incluye el peine con cuidado de que no se formen burbujas. Se polimeriza en unos 10 min.
6. Sacar el peine con cuidado de no romper el gel. Añadir el tampón de electroforesis en las calles del gel concentrador.
7. Montar el gel en la cámara de electroforesis: Acoplar el gel al electrodo y cargar la muestra con ayuda de un jeringa Hamilton: 30 o más µg en 20 µl por cada calle. Pinchar patrón. Poner el tampón de electroforesis en la cámara interna del electrodo hasta cubrir el gel por completo y el resto depositarlo en la cubeta de electroforesis. Conectar los electrodos rojo y negro con su propio color a la fuente de alimentación. El voltaje para el gel concentrador está entre 80 V y para el gel separador entre 180 V, hasta que el frente de azul de bromofenol llega al final del gel.
8. Se desmonta el gel y se separa de las placas ayudándose de agua destilada.
9. Teñir y desteñir el gel.

REACTIVOS NECESARIOS PARA UNA ELECTROFORESIS SDS-PAGE. MINI-PROTEAN II.

	GEL SEPARADOR (desnaturalizante)						
para 10 ml	5%	7,50%	9%	10%	12%	13%	15 %
H ₂ O destilada	5.45ml	4.7ml	4.3ml	4ml	3.25ml	2.9ml	2.3 ml
TRIS 1.5 M	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5ml	2.5ml	2.5 ml
SDS 10 %	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Acril:bis (30% : 0.8%)	1.70 ml	2.5 ml	3 ml	3.3 ml	4.08ml	4.5ml	5 ml

PSA	70 µl	70 µl	70 µl	70 µl	70 µl	70 µl	70 µl
TEMED	7 µl	7 µl	7 µl	7 µl	7 µl	7 µl	7 µl
GEL STACKING (4% 5ml)							
	H ₂ O destilada		3.05 ml				
	TRIS 0.5M		1.25 ml				
	SDS 10%		50 µl				
	Acril:bis (30% : 0.8%)		0.65 ml				
	PerSulfAmo		60 µl				
	TEMED		7 µl				
PREPARACIÓN DE REACTIVOS PARA MINIPROTEAN							
SAMPLE BUFFER (desnaturalizante)							
	H ₂ O		3.8 ml				
	TRIS 0.5M pH 6.8		1 ml				
	Glicerol 100%		0.80 ml				
	SDS 10 %		1.60 ml				
	2-Mercapt puro		0.40 ml				
	Azul de bro. 1%		0.40 ml				
RUNNING BUFFER 5X (desnaturalizante) Para 1 l							
	TRIS pH 8.3		15 g				
	Glicina		72 g				
	SDS		5 g				

Acrylamide (m.w. 71.08) : bisacrylamide (m.w. 154.2) (30% : 0.8%) = 60 g acrylamide + 8 g bisacrylamide + c.s.p. 600 ml H₂O MQ y añadir 2-3 g de carbón activo, ajustando, finalmente, a 1000 ml de H₂O MQ.

Mantener en agitación al menos 1 h. Hacer un primer filtrado grosero, con papel de filtro y 2 mas con filtro Millipore 1,2 µ. Almacenar 3 meses, 4 °C, oscuridad.