

BIOKÉMIA LABORATÓRIUMBAN HASZNÁLT OLDATOK

0,2 M Foszfát-puffer (a továbbiakban a hígítása használandó)

160 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	28,48 g
40 mM NaH_2PO_4	4,8 g

1000 ml deszt. vízzel kiegészíteni, pH:7,4

A pH-t mindig ellenőrizni kell és a megfelelő komponenssel beállítani!

0,02 M PBS puffer

0,2 M Foszfát-puffer	100 ml
0,15 M NaCl	8,766 g

1000 ml deszt. vízzel kiegészíteni, pH:7,4

A pH-t mindig ellenőrizni kell! Ha a pH nem jó, akkor feltételezhető, hogy a 0,2M-os Foszfát-puffer nem jó.

0,02 M PBS-T

0,2 M Foszfát-puffer	100 ml
0,15 M NaCl	8,766 g
10 % TWEEN 20	10 ml

1000 ml deszt. vízzel kiegészíteni, pH:7,4

A pH-t mindig ellenőrizni kell! Ha a pH nem jó, akkor feltételezhető, hogy a 0,2M-os Foszfát-puffer nem jó.

5% tej-PBS oldat: (Blokkláshoz.)

1,25g sovány tejpor
25ml 0,02M PBS

VWF:Ag & VWF:CB- hez használt oldatok:

ELISA mintahígító oldat: 200 ml 0.02 M PBS-T-hez adunk 100 μl Brómfenolkék vízben telített oldatát.

Human placentából III-as típusú kollagén (P2 jelölésű) A liofilizált kollagénből 2 mg/ml-es törzsoldatot készít, 0,05 M ecetsavban a laboratórium vezetője.

0,1 M Citromsav: 2,1 g Ciromsav $\times \text{H}_2\text{O}$ 100 ml desztillált vízben oldva.

0,2 M Dinátrium-hidrogén-foszfát: 7,2 g ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$) 100 ml desztillált vízben oldva.

TMB (Tetramethylbenzidine-dihydrochloride, Sigma-Aldrich, 861510) vagy OPD (o-phenylenediamine-dihydrochloride, Sigma, P-1526) szubsztrát oldat: A szubsztrátot fénytől védve kell feloldani! Elkészítés a gyártó leírása szerint.¹

0.05 M foszfát-citrát puffer, pH: 5,0

25,7 ml 0,2 M Na_2HPO_4

24,3 ml 0,1 M Citromsav

pH:5.0-re a megfelelő komponenssel beállítani, 100ml-re deszt. vízzel (Millipore) kiegészíteni.

¹ <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/861510?lang=hu®ion=HU>
https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/1/p1526pis.pdf

TMB (0,2mg/ml) szubsztrát oldat: 20 ml pufferhez 4 mg TMB-t és 4 µl 30% H₂O₂
OPD (0,4mg/ml) szubsztrát oldat: 20ml pufferhez 8 mg OPD és 8ul 30% H₂O₂

(Felhasználás előtt nem több mint 2 órával elkészíteni. A 30% H₂O₂-ot közvetlenül használat előtt adjuk a szubsztrát oldathoz!)

2M H₂SO₄ (ELISA stop oldat)

182 ml Desztillált víz

18 ml cc. H₂SO₄

VWF multimerek elválasztására alkalmas SDS-agaróz elektroforézishez

szükséges oldatok:

A gél készítéséhez és futtatáshoz szükséges:

SDS-agaróz szeparáló gél puffer:

0,5 M TRIS bázis	6,06 g
0,16 M Bórsav	0,99 g
1,0 M Urea	6,06 g

100 ml-ig deszt. vízzel (Millipore) feltölteni, szobahőmérsékleten a pH ~ 9,0 (nem kell pH-zni csak ellenőrizni)

SDS-agaróz tömörítő gél puffer:

0,125 M TRIS-HCl	
TRIS bázis	1,514 g

100 ml-ig deszt. vízzel (Millipore) feltölteni, szobahőmérsékleten a pH: 7,74 (6N HCl-al kell pH-zni), 16 °C-os gélben a pH ~ 8,0

SDS- agaróz elektroforézis tank puffer:

0,09 M TRIS-bázis	10,9 g
0,09 M Bórsav	5,57 g
0,1 % SDS	1,0 g

1000 ml-ig deszt. vízzel (Millipore) feltölteni, szobahőmérsékleten a pH~ 8,35 (csak ellenőrizni kell)

A minták előkészítéséhez szükséges oldat:

Mintadenaturáló puffer:

0,01 M TRIS	12,1 mg
8,0 M Urea	4,8 g
0,001 M EDTA	3,7 mg
2,0 % SDS	200,0 mg
0,6 % Brómfenolkék	600 µl (sötét ibolyaszínű legyen a puffer)

10 ml-ig deszt. vízzel (Millipore) feltölteni, pH: 8,0 (A pH-t 6 N-os HCl-val állítjuk be!)

Immunblotthoz szükséges oldat²: (Millipore leírás szerint) Mi a semi-dry blotthoz is ezt a transzfer puffert használjuk.

Transzfer puffer: (Ha pontosan van összeállítva a puffer, akkor a pH-nak megfelelőnek kell lennie, ezért pH-ni nem kell.)

² A kapilláris boltolás 0,02M PBS-sel, a cill leírása szerint végezve is működött. (Raines,1990)

0,025 M TRIS	3,03 g
0,192 M Glicin	14,41 g
10 % Metanol	100,0 ml

1000 ml-ig deszt. vízzel (Millipore) feltölteni, pH~ 8,3 (nem kell pH-zni csak ellenőrizni)

Direkt gélfestéshez:

Fixáló oldat:

40% etanol	40ml
10% ecetsav	10ml

100ml-ig deszt. vízzel (Millipore) feltöltve

Immunfestés DAB szubsztrát használatával:

HRP szubsztrát oldat:

50 ml PBS (PBS-T-vel is működik, használtuk úgy korábban)
5 mg DAB
(500 µl 2 % Nikkel-ammónium-szulfát – opcionális a használata)
10 µl 30%-os H₂O₂

ECL reagens: