

1. Preparation of secretome

Sample type: Cell sample

Method: lysis method

2015. 8.

KIST 이철주

1. Grow cells (in 150 mm x 5 plates) up to ~60-70% confluence in media containing supplements at 37 °C (under humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂ v/v).
 - 150mm plate: NUNC Cat #. 168381
2. Wash each plate with 5 ml of Serum Free Medium (SFM) at least 3 times. Carefully aspirate the medium completely to minimize chances of passing on serum residues in conditioned media (CM).
 - ◆ 주의사항: Cell이 떨어지거나 터지지 않게 pipette-aid로 천천히 따라 올린다.
3. Add fresh 10 ml of SFM and incubate for 12 hr.
4. Collect CM containing secreted proteins in a 50 ml FD tube.
 - ◆ 주의사항: CM 모을 때, 조심스럽게 (가능한 압력에 영향 받아 cell이 건드리거나 터지지 않게) pipette-aid로 천천히 따라 올린다.
 - 50 ml FD tube: FALCON Cat #. 352070
5. Add 2 mM PMSF and 1 mM EDTA as protease inhibitor in CM.
 - ◆ 주의사항
 - PMSF from 0.1 M stock in methanol to final concentration 2 mM: 1 ml 0.1 M PMSF/ 50 ml CM (PMSF stock)은 가능한 사용직전에 만들어준다.
 - EDTA from 0.5 M stock in DW (pH 8.0) to 1 mM: 0.1 ml 0.5 M EDTA/ 50 ml CM
 - PMSF and EDTA 첨가 후 가볍게 inverting시켜준다.
 - Protease inhibitor cocktail (tablet) 사용시, 농축과정에서 문제가 생길 수 있으니 주의한다.
 - PMSF: SIGMA Cat #. P7626, EDTA: Usb Cat #. 15701
6. Centrifuge CM to remove floating cells and cellular debris. Collect supernatant carefully.
 - ◆ 주의사항
 - Centrifugation : 400 x g, 10 min, 4 °C
 - Supernatant 모을 때, pipette으로 표면에서 1 ml 따서 버린 후, 최대한 천천히 pipette-aid로 표면 바로 아래에서 수집한다. pellet 건드리거나 다시 떠오르지 않게, 50 ml 기준으로 약 2-3 ml 을 남기고 수집한다.
 - 수집한 supernatant는 syringe tube로 바로 따라낸다. Needle을 사용하지 말 것.

7. Filter CM using sterile filter (pore size: 0.22 μm) with the help of a syringe.
 - Sterile filter : ADVENTEC Cat #. 13CP020AS
8. Concentrate CM down to 250 μl using Amicon Ultra-15 centrifugal filter device (cutoff: 10K) as per manufacturer's instructions. (at 4000 x g, 4 $^{\circ}\text{C}$)
 - Amicon Ultra: Millipore Cat#.UFC901024
9. Add 2 ml solution containing 75 mM NaCl and 50 mM Tris (pH 8.2) and concentrate to 250 μl . (repeat 3 times)
10. Add 2 ml solution containing 8 M urea, 75 mM NaCl and 50 mM Tris (pH 8.2) and concentrate to 250 μl . (repeat 3 times)

[확인 방법]

- ✓ Secretome이 cell이 터지지 않고 잘 얻어졌나 확인하기 위해서, western blot 으로 tubulin과 actin과 같은 cytoskeleton을 확인한다 (secretome 약 5~10 μg 을 loading).
- ✓ Western blot에서 tubulin과 actin이 검출될 경우, quality가 좋지 않아 secretome 분석 시 intracellular protein이 많이 검출된다.

