

Desalting-C18 column *capacity: 30 μ g 이하 / 200 μ l까지 가능

2015. 8.

경희대학교 김광표

1. 원리

Resin 의 C18 과 sample 의 hydrophobic interaction 을 이용한 것이다. ACN 과 water 의 hydrophobicity 차이를 이용하여 salt, 다른 substance 들을 protein 으로부터 분리한다.

2. Protocol

Activation → Equilibrium → Sample binding → Washing → Elution

■ Material & Reagent

Pierce C18 Spin Columns, 25 spin columns each containing 8 mg of C18 resin (Cat. 89870)

Activation Buffer	50% ACN, 0.1% Formic acid in water	resin 을 적셔서 activation 시키는 역할을 한다.
Equilibrium Buffer (=Washing Buffer)	5% ACN, 0.5% Formic acid in water	Equilibrium : peptide 가 resin 에 잘 붙을 수 있는 환경을 만드는 역할을 한다. Washing: salt 를 제거하는 역할을 한다.
Elution Buffer	70% ACN, 0.1% Formic acid in water	resin 과 peptide 를 떨어뜨려 elution 시키는 역할을 한다.

c.f) sample 개수에 따라 필요한 buffer 조성 용액의 양 (α =sample 의 수)

	ACN	Water	Formic acid
Activation Buffer	$180 \times 2 \times 0.5 \times \alpha$	$180 \times 2 \times 0.499 \times \alpha$	$180 \times 2 \times 0.001 \times \alpha$
Equilibrium Buffer (=Washing Buffer)	$180 \times 6 \times 0.05 \times \alpha$	$180 \times 6 \times 0.945 \times \alpha$	$180 \times 6 \times 0.005 \times \alpha$
Elution Buffer	$30 \times 3 \times 0.7 \times \alpha$	$30 \times 3 \times 0.299 \times \alpha$	$30 \times 3 \times 0.001 \times \alpha$

* Buffer에 formic acid를 넣어 낮은 pH를 유지하는 이유: resin의 상태를 유지하기 위해 (aggregation 등을 방지)

■ Procedure

Sample preparation

- ① Equilibrium buffer 180 μ l에 sample을 녹인다.
- ② vortexing : 강하게, 벽면으로
- ③ sonication : 2분
- ④ vortexing : 강하게, 벽면으로

Resin Activation

1. column 을 테이블에 툭툭 쳐서 벽면에 붙은 resin 이 내려가게 한다.
2. cap 을 위의 것부터 연다. (아래의 cap 을 먼저 열면 위의 cap 을 열 때 resin 이 튀어 오른다.)
3. 2 ml tube 의 뚜껑을 제거한 후, DR-88 을 이용해 먼지를 제거하고 column 을 끼운다.
4. column 에 Activation Buffer 를 180 μ l 씩 넣는다.
 - * 벽면에 붙은 resin 이 쓸려 내려가기 위해 buffer 는 벽면을 따라 흘러준다.
5. Centrifugation : 700 X g, 30 초, 16 °C (X2 회)
6. waste 를 버리기 전에 다음 step 으로 넘어가 buffer 부터 채운다.
 - * resin 이 마르지 않기 위함 : resin 이 마르면 sample 이 binding 되는 정도가 달라진다.

Equilibrium

- * equilibrium 이 안되어 있으면 peptide 가 붙지 않는다.
1. Equilibrium Buffer 180 μ l 을 column 에 넣어 resin 의 ACN 농도를 맞춘다.
 2. waste 를 버린다. (tube 의 max.는 400 μ l 으로 간주한다.)
 3. Centrifugation : 700 x g, 30 초, 16°C (X3 회)
 - * Centrifugation 1 회가 끝난 후에는 sample 준비를 하고, 2 회를 돌린다.
 - * 실험 도중 sample 을 준비할 때는 resin 이 마르지 않게 적셔 놓아야 한다.

Sample Binding

1. Sample 을 column 에 pipetting 한다.
 - * tip 을 최대한 resin 에 가까이 두면서 pipetting 한다.
2. waste 를 버린다.
3. Centrifugation : 500 x g, 30 초, 16 °C
 - * 다른 step 과 달리 500 x g 인 이유 : buffer 는 다 내려가되 peptide 는 잘 붙을 수 있도록.
4. Re-binding 위해 flow-through 를 따서 column 에 pipetting 한다.
5. Centrifugation : 500 x g, 30 초, 16 °C

Washing

1. Washing buffer 를 180 μ l 를 넣는다.
2. waste 를 버린다.
3. Centrifugation : 700 x g, 30 초, 16 °C (X2 회)

Elution

1. Elution 받을 eppendorf tube 를 미리 준비한다.
2. waste 를 버린다.
3. C18 spin column 을 eppendorf tube 에 꽂는다.
4. Elution buffer 30 μ l 를 column 에 넣는다.
 - * tip 을 최대한 resin 에 가까이 두면서 pipetting 한다.
 - * elution buffer 양을 20~30 μ l 로 조절하여 2~3 회 나눠서 elution 한다.
5. Centrifugation : 700 x g, 30 초, 16 °C (X3 회)
6. column 을 tube 에서 빼낼 때에는 column 을 살짝 털면서 빼낸다.