

## In-gel digestion

2015. 8.

KIST 이철주

모든 solution은 HPLC Ultra grade를 사용한다.

Latex gloves 사용시 polymer 오염이 일어나므로, nitrile gloves를 사용한다.

Keratin 오염이 쉽게 일어나므로, 후드 안에서 실험하는 것을 추천한다.

2-DE의 경우, strip의 equilibration step에서 reduction과 alkylation했으므로 생략한다.

### ■ Spot cutting

- 해당 protein의 core부분만 정확하게 cutting하는 것이 무엇보다 중요.
- gel 조각이 잠기게 DW에 넣어 -20 °C에서 보관(6개월~몇 년도 보관가능)

### ■ Spot de-stainig

- 확실하게 de-staining시킴을 잊지 말자!

### Coomassie-staining band

1. Add 25 mM ammonium bicarbonate (ABC) + 50% acetonitrile (ACN) : blue → transparent
2. Discard the supernatant
3. Repeat 1,2 steps 2~3 times
4. Add ~120 µl DW
5. Discard the supernatant
6. Repeat 4,5 steps 2~3 times

### Silver-staining band

1. Add ~120 µl 100 mM sodium thiosulfate +30 mM potassium ferricyanide(dark) : silver → yellow
2. Discard the supernatant
3. Repeat 1,2 steps 2~3 times
  - gel piece양에 따라 다르지만, gel이 잠기고도 충분한 양
  - 2~3차례 destaining : 완전히 de-staining 되었다고 생각할 때, 한 번 더!

4. Add ~120  $\mu$ l DW : yellow  $\rightarrow$  transparent
5. Discard the supernatant
6. Repeat 4,5 steps 2~3 times

CBB	Silver
25 mM ABC 40 $\mu$ l	100 mM Sodium thiosulfate
50% ACN 40 $\mu$ l	30 mM potassium ferricyanide (in the dark)
700 rpm or vortexing at 25 $^{\circ}$ C	700 rpm or vortexing at 25 $^{\circ}$ C

### ■ Washing & Gel dry

1. Add 120  $\mu$ l 50 mM ABC (gel piece 충분히 잠기는 양) for 10 min
2. Add 120  $\mu$ l 25 mM ABC in 50% ACN for 5 min : gel 살짝 불투명해짐.
3. Add 100% ACN : 뭉쳐있는 gel piece 각각 따로따로 떨어질 때 까지 2~3회 시행
4. ACN 완전히 따낸 다음에 dry : RT, 20 min, 먼지 들어가지 않게 호일로 덮어둔다.

### ■ Reduction & Alkylation

- 2-DE의 경우, strip의 equilibration step에서 reduction과 alkylation했으므로 생략한다.

1. Add 30  $\mu$ l 10 mM DTT in 25 mM ABC : 600 rpm for 1 hr at 56  $^{\circ}$ C
2. Discard the supernatant
3. Add 30  $\mu$ l 55 mM IAA in 25 mM ABC : 600 rpm for 1 hr at 25  $^{\circ}$ C in the dark
4. Discard the supernatant
5. Add 100  $\mu$ l 25 mM ABC : 600 rpm for 10 min at 56  $^{\circ}$ C
6. Discard the supernatant
7. Add 25 mM ABC + 50% ACN 100  $\mu$ l : tapping and discard the supernatant
8. 100% ACN 100  $\mu$ l : tapping and discard the supernatant
9. Dry

### ■ Trypsin 처리

1. Add 20~30  $\mu$ l 12.5 ng/ $\mu$ l trypsin in 25 mM ABC : 4  $^{\circ}$ C, 40 min
2. Discard the supernatant
3. Washing the gel pieces in 25 mM AB : 3 times (pipetting)
4. Add 20~30  $\mu$ l 50 mM AB : 37  $^{\circ}$ C, 16h

### ■ Extraction

1. 항온기에서 꺼내 충분한 spin down 후 new tube에 solution 다 따내고
2. Add 20~30  $\mu$ l 25 mM ABC in 50% ACN : 37  $^{\circ}$ C, 15 min, 600 rpm
3. Sonication : 37  $^{\circ}$ C, 5 min 후, spin down - step 1의 new tube에 solution 다 따내고

4. Add 20~30  $\mu$ l 0.5% TFA in 50% ACN : 37 °C, 15 min, 600 rpm
5. Sonication : 37 °C, 5 min 후, spin down- step 1의 new tube에 solution 다 따내고
6. Add 20~30  $\mu$ l 0.5% TFA in 70% ACN : 37 °C, 15 min, 600 rpm
7. Sonication : 37 °C, 5 min 후, spin down- step 1의 new tube에 solution 다 따내고
8. Extract solution 다 모은 tube 충분한 spin down
9. Dry *in vacuo* using Speed Vac
10. -20 °C storage

■ **C18 clean-up**

1. spin column or zip-tip