

OFFGEL fractionation

2015. 8.

경희대학교 김광표

■ Sample and stock solution preparation notes

1. 항상 깨끗하게 유지하고 케라틴 조심하기
2. 12 well gel 에 로딩 가능한 total peptide 양: 50 μg – 5 mg
3. Salt 가 있으면 좋지 않다. (10 μM 이하가 되게 한다): desalting or buffer change (Tris-HCl pH 7.6)
 - 양이 많은 경우 SEP-PAK 사용, 30 μg 이하의 경우 spin column을 사용하여 desalting 한다.
 - FASP 샘플의 경우 Tryptic digestion 전 단계에서, 30k membrane filter위에 존재하는 UREA Buffer를 Tris-HCl buffer로 원심분리를 통해 여러 번 change 한다.
4. 12strip/12 well frame OFFGEL kit 를 사용하는 경우
 - Dried sample 인 경우 바로 OFFGEL solution 에 녹여야 한다.
(1.44 ml 1.25X OFFGEL Stock solution + 0.36 ml H_2O)
 - 위와 같이 Dried sample이 아닌 360ul 이하의 액상 샘플(버퍼에 녹아진 펩타이드)인 경우에는 물을 첨가 후 360 μl sample (최종적으로 360 ul의 양이 되도록 맞추어 줌) + 1.44 ml 1.25 X OFFGEL stock solution

■ Protocol

1. Rehydration buffer 만들기: 560 μ l (1.25X stock solution) + 140 μ l (H_2O)
2. Sample 녹이기: sample(고상) 2 개에 각각 720 μ l (1.25X stock solution) + 180 μ l (water)넣고 녹이기. (Sample buffer 는 1.44 ml 1.25X OFFGEL Stock solution + 0.36 ml H_2O)
3. Strip 커버 떼고 트레이 끝에 밀착시킨다(+가 왼쪽으로 붙게 한다. 숫자가 거꾸로 보이게. 끈적한 쪽이 윗면)
4. Frame 이 왼쪽을 아래로 하고 오른쪽은 약간 위로 뜨게 한 다음에 오른쪽일 밀착시켜서 딸깍소리가 나게 끼운다.(strip 안밀리게 조심하기. 딸깍소리 안나면 의심해보자. Tray 한 개가 약간 이상함)
5. 각 well 에 40 μ l rehydration buffer 를 분주한다. (젤에 닿지 않게 하고 전체를 다 덮을 필요는 없다)
6. Electrode pad 4 개를 꺼내고, 먼저 2 개의 pad 를 rehydration buffer 에 적셔서 프레임 양쪽 끝에 올려놓는다. 공간이 생기지 않게 한다.
7. 그 위에 마른 pad 를 각각 한 개씩 올려놓는다.
8. 15 분을 재서 젤이 부풀 때까지 기다린다.
9. 15 분 후에 준비된 샘플을 150 μ l 씩 12 개에 분주한다(140 μ l 씩 넣고 남은 것을 나누는게 나음)
10. Cover seal 을 조심히 끼운다. (완전히 덮혀 있는지 확인하기)
11. 양쪽 electrode pad 에 10 μ l 의 물을 분주한다. (PAD 가 움직이지 않는지 정확히 확인하기)
12. Tray 를 기계 위에 올려놓는다.
13. +쪽에 200 μ l, - 쪽에 1 ml 의 mineral oil 을 분주한다.
14. 1 분 후에 양쪽에 200 μ l 의 mineral oil 을 더 분주한다.
15. 끼우기