

# LC-MS 단백질 분석을 위한 SDS-PAGE staining protocol 및 주의할 점

**Proteomics Core Facility**

**2017.12.28**

# Contents

- LC-MS 분석 의뢰용 protein SDS-PAGE staining 시 주의할 점
- Coomassie Blue R-250을 이용한 gel staining (general protocol)
- Coomassie Blue G-250을 이용한 gel staining (general protocol)
- Silver staining protocol for in gel digestion (general protocol)
- 분석 의뢰 전 gel band excision protocol 및 주의할 점

# LC-MS 분석 의뢰용 protein SDS-PAGE staining 시 주의할 점

1. 실험 시 반드시 lab coat 및 Nitrile glove (powder free)를 입고 착용한다. (라텍스 장갑은 권장하지 않습니다.)
2. PAGE gel실험에 사용하는 피펫, 팁 통, scalpels blade, 각종 glassware, 실험대, plastic tray 등을 닦아준다. LC-MS 분석의뢰용은 가급적 전용 실험기구들을 사용하는 것이 좋습니다. 특히 Western blot용 실험기구와 혼용할 경우 carryover 우려가 있습니다.
3. Silver staining 시 glutaraldehyde 혹은 formaldehyde 이 들어있지 않은 fixing solution을 사용해 주세요. 이 두 물질이 있으면 MS 분석이 되지 않습니다.
4. I.P sample의 경우 elution buffer 구성에 대해 사전 논의를 권장합니다.

\* 좋은 분석결과를 얻기 위해서는 human hair, skin, oral 등 유래의 keratin 단백질 오염을 최소화해야 합니다.

\* Keratin이 gel 표면에 묻을 경우 gel 안에 묶여있는 단백질보다 쉽게 trypsin으로 digestion 되어 전체 샘플 안에서 상대적 양이 많아지게 되며 keratin peptide는 다른 peptide 보다 쉽게 이온화 되는 경향이 있어 관심대상의 peptide의 MS signal을 masking할 수 있기 때문에 전처리 시 오염을 최소화해야 합니다.

# Coomassie Blue R-250을 이용한 gel staining (general protocol)

\* Sigma, Invitrogen, Biorad 등 다른 vendor의 staining kit을 사용할 경우 해당 protocol을 사용하시면 됩니다.

## \* 준비 시약

Fixing solution : 50% methanol and 10% glacial acetic acid

Staining solution : 0.1% Coomassie Brilliant Blue R-250, 50% methanol and 10% glacial acetic acid

Destaining solution : 40% methanol and 10% glacial acetic acid

Storage solution : 1% glacial acetic acid

1. Gel을 fixing solution에 넣고 2시간 정도부터 overnight 으로 약하게 agitation하여 fixing한다. Fixing 후 한 시간이 지난 시점에서 fixing solution을 한번 갈아준다.

2. Staining solution 으로 교체한 뒤 20분 동안 약하게 agitation 한다.

3. Destaining solution으로 교체한 뒤 destaining 한다. Gel의 background가 완전히 빠질 때 까지 destaining solution을 수 회 교체해 준다.

4. Storage solution에서 gel을 냉장 보관한다.

# Coomassie Blue G-250을 이용한 gel staining (general protocol)

\* Sigma, Invitrogen, Biorad 등 다른 vendor의 staining kit을 사용할 경우 해당 protocol을 사용하시면 됩니다.

1. SDS-PAGE gel 실험 후 전기영동 챔버 에서 gel을 제거한 후 0.5% Coomassie Blue G-250 (in 50% methanol/ 10% acetic acid) solution을 젤이 잠길 정도로 넣는다. 5 분 정도 약하게 agitation하며 staining 한다.

2. Staining solution을 버리고 Milli-Q water 로 교체한 뒤 가볍게 agitation하며 씻어낸다.

3. 40% HPLC grade methanol/ 10% acetic acid solution으로 교체해 준다. 약하게 밴드가 보일 때까지 10-20 분 마다 교체해준다. (destaining과정)

4. Gel bands가 확실히 보일 때까지 MilliQ water로 destaining을 계속한다. (Overnight 권장)

5. Storage solution (1% glacial acetic acid)에서 gel을 냉장 보관한다.

# Silver staining gel protocol for in gel digestion (general protocol)

- \* Sigma, Invitrogen 등 다른 vendor의 silver staining kit을 사용할 경우 해당 protocol을 사용하시면 됩니다.
- \* Fixing 단계에서 formaldehyde 혹은 glutaraldehyde 가 들어있으면 MS 분석이 안됩니다.

## 1. Fixation

- 1) 150 ml (50% methanol (HPLC grade) + 5% acetic acid ) solution을 넣고 20분간 약하게 agitation하며 gel을 fixing 한다.
- 2) 150 ml 50% methanol 로 교체하여 10분간 washing.
- 3) MilliQ water 로 교체하여 10 분간 washing.

## 2. Sensitizing

- 1) 0.02 % thiosulfate solution 150 ml을 넣고 1분간 incubation  
MilliQ water 로 2회 1 분간 washing.
- \* 0.02 % Sodium Thiosulfate: 30mg sodium thiosulfate-5 넣고 MilliQ water를 넣어 150 ml 로 맞춤.

# Silver staining gel protocol for in gel digestion (general protocol)

## 3. Silver reaction

1) 0.1% silver nitrate with 0.08% formalin (37%) solution을 150ml 넣고 20분간 agitation.

2) MilliQ water 로 2회 1 분간 washing.

\* 0.1% Silver Nitrate and 0.08% Formalin (37%): 150 mg silver nitrate 와 120 ul의 37% formalin을 넣고 MilliQ water 를 넣어 150ml로 맞춤.

## 4. Developing

1) 150 ml 의 developing solution을 넣고 원하는 수준의 staining 이 될 때까지 incubation한다. Solution이 노란색으로 변할 경우 (보통 30초 이내) 새 solution으로 한번 교체해 준다. Developing이 너무 많이 될 경우 gel background가 많이 올라올 수 있으니 주의한다.

\* Developing solution: 2% sodium carbonate + 0.04% Formalin : 6g sodium carbonate 를 넣고 300ml의 MilliQ water를 넣는다. 사용 직전에 37% formaldehyde 120ul를 넣는다.

# Silver staining gel protocol for in gel digestion (general protocol)

## 5. Stopping

1) 5% acetic acid 150ml 넣고 10분간 washing.

## 6. Washing

1) MilliQ water 로 교체 후 5분간 washing.

## 7. Permanent Storage

1) 150 ml 의 preserving solution을 넣고 20분간 incubation 후 냉장보관

\* Preserving solution: 13.2ml glycerol (100% w/w) 을 넣고 MilliQ water 를 넣어 150 ml로 맞춘다.



# 분석 의뢰 전 Gel band excision protocol

1. Destaining 이 끝난 gel을 촬영 혹은 스캔 하여 이미지를 저장한다.
2. 수술용 cutter (**scalpels blade**)를 이용하여 (1mm x 1mm) 크기로 gel band를 잘라낸 후 샘플 tube (1.5 ml)에 담고 gel 조각이 충분히 잠길 정도로 MilliQ water를 넣은 뒤 분석 의뢰한다.

## Gel band excision 시 주의사항

1. 이 단계에서 human 유래 keratin이 gel 표면에 묻어 오염되는 경우를 최소화하기 위해서 실험 시 lab coat 및 nitrile glove (powder free)를 착용합니다. (라텍스 장갑은 권장하지 않습니다.)
2. Cutting시 사용하는 실험기구는 모두 세척 후 사용해야 하며 LC-MS 분석 의뢰용 샘플의 경우 전용 실험기구들을 사용하는 것이 좋습니다.