First-dimension isoelectric focusing (IEF)

＊Chemical

1. 1% Bromophenol blue stock solution：
   1% Bromophenol blue in 50 mM Tris-base buffer.
2. Urea rehydration stock solution：
   8M Urea，2 % CHAPS, 0.002% Bromophenol blue, 0.5% IPG buffer, 使用前加 0.028% DTT.
3. Mineral oil

＊Procedure

1.加 0.07 mg DTT 於 250 ul Rehydration buffer，振盪溶解。

2.製備 250 ul 的樣品：

Tissue : 100 ug for silver stain

Serum : 150 ug for silver stainn

x ul protein sample + 0.5 % IPG buffer (1.25 ul) + y ul rehydration buffer = 250 ul

3.將 250 ul 樣品平均加入 13 cm 的 holder 中，要超過 holder 兩邊的電極。

4.取出 dry strip，從 strip 的正極端小心撕去塑膠膜，勿碰到膠面。

5.dry strip 加入 holder 中，勿產生氣泡。

6.再加入 250 ul 的 mineral oil 於 holder 中，蓋上蓋子，進行 IEF，holder 電極需確定放置於機器的正負電極上。

7.IEF 條件：

Tissue: rehydration 50 uA，20 ℃，overnight；500V, 1 hr；1000V, 1 hr；
8000V, 3.5 hr；8000V; 24000 Vhr

Serum: rehydration 50 uA，20 ℃，overnight；500V, 1 hr；1000V, 1 hr；
8000V, 3 hr；8000V; 24000 Vhr

Equilibration

＊Chemical

1. SDS equilibration solution：
   6M Urea, 75 mM pH8.8Tris-HCl, 29.3% Glycerol, 2% SDS, 0.002% Bromophenol blue.
2. DL-dithiothreital (DTT)
3. Iodoacetamide (IAA)

＊Procedure

1.跑完 IEF 的 strip 加入 1% DTT (100 mg in 10 ml equilibration buffer)的 buffer 中，作用 15 分鐘。

2.再將 strip 加入 2.5% IAA (250 mg in 10 ml equilibration buffer)的 buffer 中，作用 15 分鐘。

Second-dimension SDS-PAGE

＊Chemical

1. 1 X SDS running buffer :
   25 mM Tris-base, 192 mM Glycine, 0.1% SDS
2. Agarose sealing solution :
   0.5 % agarose, 0.002% Bromophenol blue in 1X SDS running buffer.
3. Protein maker
4. SDS-PAGE

＊Procedure

1. 配製 10 % SDS-PAGE running gel，在 gel 上方保留約 1 cm 的空間。
2. 於 gel 上方加入 running buffer，將平衡過後的 strip 斜放於 gel 上方並確認 strip 和 gel 中是沒有氣泡的。
3. 將 running buffer 倒出，於 strip 的酸性端加入 comb，加入 0.5%的 Agarose sealing solution 固定 strip。
4. 待 Agarose 凝固後，取出 comb 並加入 marker。
5. 進行電泳至 dye 跑完，電泳條件：35 uA / gel。