

SILAC (Stable Isotopic Labeling by Amino Acid in Cell Culture)準備 與細胞培養方法

材料：

SILAC™ Protein Identification (ID) and Quantitation Kits (Invitrogen, Cat. MS10030)

內容物：

兩瓶 1L，SILAC™ D-MEM-Flex Media

兩瓶 100ml，Dialyzed FBS

1 瓶 20ml，200mM L-Glutamine (100X)

1 瓶 5ml，10g/L Phenol Red solution

1 瓶 50ml，200g/L Glucose solution

1 組 4 小瓶裝的胺基酸標定組合

1 小瓶 100mg，SILAC™ L-Lysine HCL

1 小瓶 100mg，SILAC™ [U-¹³C₆]-L-Lysine HCL (*Lys)

2 小瓶 100mg，SILAC™ L-Arginine

10000Units/ml Penicillin, 10000µg/ml Streptomycin (PS，Invitrogen，Cat.15140)

100× MEM Non-Essential Amino Acid (MEM NEAA，Invitrogen，Cat.11140)

100× GlutaMax™-1 (200mM L-alanyl-L-Glutamine，Invitrogen，Cat.35050.)

55mM β-Mecaptoethanol (Invitrogen，Cat.21985-023)

細胞株：Mouse Embryonic stem cell (mESC)，D3

培養液製備：

1. 從兩瓶的 SILAC™ D-MEM-Flex Media 中，各取出 12ml 的 medium 放至 15ml 離心管中備用，並在瓶身標示好 SILAC Heavy Medium 與 SILAC Light Medium。
2. 在每瓶中加入相對應量的 10ml L-Glutamine 與 1.5ml Phenol red solution (見附錄一)。
3. 從 12ml 的 SILAC™ D-MEM-Flex Media 中，取 1ml 回溶 SILAC™ L-Lysine HCL，加入到 SILAC Light Medium；重複數次之後，再取 1ml 回溶 1 瓶 SILAC™ L-Arginine，加入到 SILAC Light Medium；同樣重複數次，在最後剩餘的 medium 加回 SILAC Light Medium。
4. 從另一支 12ml 的 SILAC™ D-MEM-Flex Media 中，取 1ml 回溶 SILAC™ [U-¹³C₆]-L-Lysine HCL，加入到 SILAC Heavy Medium；重複數次之後，再取 1ml 回溶 1 瓶 SILAC™ L-Arginine，加入到 SILAC Heavy Medium；同樣重複數次，在最後剩餘的 medium 加回 SILAC Heavy Medium。
5. 之後分別將 SILAC Heavy Medium 與 SILAC Light Medium，以 0.22µm filter 過濾後，分裝備用。此時的 SILAC medium 中，並未含有 Dialyzed FBS、Glucose、MEM NEAA、PS 等等。(見附錄一)

註：

1. Glucose conc.: High Glucose DMEM 4.5g/L; Low Glucose DMEM 1g/L。
2. 因為此方法是利用**胺基酸**上的分子量差異，來加以區別兩組實驗間的差別；所以如有需要在實驗中加入 Medium supplement，應要避免含有 L-Lysine 與 L-Arginine 成份。
3. MEM NEAA 的成份見附錄二。
4. Dialyzed FBS 在使用時，以 56°C 做 Heat inactivation 之後，必需要以 0.22µm filter 過濾完成，方可使用！

配備完整的 mESC (D3) medium 與細胞培養:

1. 培養 mESC 的 DMEM 成份為: 4.5g/L Glucose (High Glucose DMEM)、15% FBS、0.5% PS、1% GlutaMax-1、1% MEM NEAA、0.1mM β -Mecaptoethanol (2-ME)。
2. 所以在 41ml 的 SILAC Heavy medium 與 SILAC Light medium 中，分別加入 1.125ml 200g/L Glucose、7.5ml Dialyzed FBS、0.25ml PS、0.5ml GlutaMax-1、0.5ml MEM NEAA、91µl 2-ME 等，
3. 在前幾天必需準備數盤 MEF，並用 Mitomycin C 處理。
4. 將 mESC 解凍，並培養於 MEF 之上，分別以 SILAC Heavy medium 與 SILAC Light medium 培養，直至 6 doublings，方可用來於實驗。

附錄一 SILAC List for medium components

Reagent	D-MEM-Flex	RPMI-Flex	IMDM-Flex	Advanced D-MEM/F12-Flex
Glucose Solution (200 g/L)	High Glucose 22.5 ml Low Glucose 5 ml	10 ml	22.5 ml	15.8 ml
L-Glutamine 200 mM (100X)	20 ml	10 ml	20 ml	20 ml
Phenol Red Solution (10 g/L)	1.5 ml	0.5 ml	1.5 ml	0.8 ml
FBS, Dialyzed (ml/L)	100 ml	100 ml	100 ml	5-20 ml
Penicillin-Streptomycin (100X)	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
Light (normal) Amino Acids	Resuspend 1 x 100 mg L-Lysine HCl and 2 x 100 mg L-Arginine each in 1 ml basal, unsupplemented medium. Mix well. To one 1 L bottle of medium, add L-Lysine HCl (100 mg/ml) and L-Arginine (100 mg/ml) to prepare light media.			
Heavy (isotopic) Amino Acids	Resuspend 100 mg isotopic-L-Lysine (*Lys) in 1 ml basal, unsupplemented medium. Mix well. To prepare single labeling medium supplemented with light arginine and heavy (isotope labeled) lysine, add *Lys (100 mg/ml) and L-Arginine (100 mg/ml) to the second 1 L bottle of medium. To prepare double labeling medium supplemented with heavy (isotope labeled) lysine and heavy arginine, add *Lys (100 mg/ml) and *Arg (100 mg/ml) to the second 1 L bottle of medium.			
pH Range	7.0-7.4	7.0-7.4	6.9-7.3	7.0-7.4
Osmolality (mOsm/kg)	320-350	265-300	270-310	290-330
Filter and Store	Filter sterilize each medium using 0.22 µm filtration device. Store the medium at 2 to 8°C until use.			

附錄二

MEM Non-Essential Amino Acids Solution 10 mM (100X) , Invitrogen , Cat.11140

Components	Molecular Weight	Concentration (mg/L)	mM
Glycine	75	750	10
L-Alanine		890	∞
L-Asparagine		1320	∞
L-Aspartic acid		1330	∞
L-Glutamic Acid		1470	∞
L-Proline		1150	∞
L-Serine		1050	∞

MEM NEAA 之中，不含有 L-Lysine 與 L-Arginine，所以加入 SILAC 之中培養細胞，並不影響細胞對[U-¹³C₆]-L-Lysine HCl 的攝取。