

Trawienie trypsyną białek rozdzielonych w żelu SDS-PAGE.

Wyciąć wybrany prążek z żelu przy pomocy skalpela, umytego wcześniej metanolem.

A. Rozdrabnianie żelu.

Fragment żelu poliakrylamidowego znajdujący się w eppendorfie rozdrobnić końcówką pipety na fragmenty o rozmiarach nie większych niż 2 mm x 2 mm.

B. Odbarwianie żelu. (Żeli barwionych srebrem nie odbarwia się)

W przypadku barwienia Coomassie należy żel odbarwić roztworem 50% acetonitrylu 50mM NH_4HCO_3 . Zalać żel 100 μl r-u i wytrząsać do odbarwienia. czynność w miarę potrzeby powtórzyć kilkakrotnie. Po odbarwieniu usunąć r-r znad żelu.

C. Suszenie żelu.

Suszenie żeli roztworem 100% acetonitrylu (ACN). Dodać 100 μl ACN i wytrząsać ok. 10 minut, czynność w miarę potrzeby powtórzyć kilkakrotnie. Odrzucić roztwór ACN znad żelu.

D. Redukcja cystein.

Dodać ok. 50 μl 10mM DTT rozcieńczony w 100mM NH_4HCO_3 (fragmenty żelu muszą być przykryte). Inkubacja 30' w 57°C. Po zakończeniu, odwirować i usunąć r-r znad żelu.

E. Suszenie żelu.

Suszenie żeli roztworem 100% acetonitrylu (ACN). Dodać 100 μl ACN i wytrząsać ok. 10 minut, czynność w miarę potrzeby powtórzyć kilkakrotnie. Odrzucić roztwór ACN znad żelu.

F. Alkilacja cystein.

Dodać ok. 50 μl roztworu 50mM jod acetamidu rozcieńczony w 100mM NH_4HCO_3 , inkubować 45 minut w ciemności. Odrzucić nadmiar roztworu znad żelu.

G. Płukanie żeli.

Dodać 100 μl roztworu 100mM NH_4HCO_3 , wytrząsać 10'. Następnie odrzucić r-r znad żelu i suszyć żel dodając 100 μl 100%ACN (10'). Czynności te powtórzyć dwukrotnie.

H. Suszenie żeli.

Żele wysuszyć roztworem 100%ACN (2x100 μl , wytrząsać po 15'). Odpipetować ACN. Żele można uznać za wysuszone i gotowe do trawienia trypsyną, gdy ich fragmenty są białe, twarde, nie są posklejane i nie przywierają do ścianek eppendorfa.

I. Trawienie trypsyną.

Bezpośrednio przed użyciem przygotować roztwór trypsyny (10ng/ μl w 25mM NH_4HCO_3). Dodać około 20 μl na jedną próbkę, w razie potrzeby ilość dodanego roztworu trypsyny dostosować do ilości żelu tak, aby wszystkie fragmenty były przykryte. Inkubacja przez całą noc w 37°C.

J. Ekstrakcja peptydów z żelu roztworem do ekstrakcji 0,1%TFA
2%acetonitryl.

Odwirować próbki. Dodać 30µl roztworu i 3-krotnie płukać po 20 minut.

W przypadku żeli 2D barwionych srebrem, pomijamy odbarwienie, redukcję i alkilację. Przed wysuszeniem należy żela przepłukać jak w punkcie F.

Materiały:

A. 100mM NH₄HCO₃:
NH₄HCO₃ 790mg
MQ 100ml
Trwałość 1 rok, przechowywać w temperaturze pokojowej.

B. 1M DTT (ditiotreitol):
DTT 154mg
MQ 1ml
Trwałość 1 rok, przechowywać w -20°C.

C. 0.5M jodacetamid:
jodacetamid 925mg
MQ 10ml
Trwałość 1 rok, przechowywać w 4°C bez dostępu światła.

D. Wyjściowy roztwór trypsyny:
Zliofilizowany enzym rozpuścić w 200µl buforu do rozpuszczania wg instrukcji producenta.
Trwałość 1 miesiąc, przechowywać w -20°C.

E. 1% TFA:
TFA 1ml
MQ dopełnić do 100ml
Trwałość 1 rok, przechowywać w temperaturze pokojowej.

Poniższe roztwory przygotowywać raz na 2 tygodnie i przed użyciem przefiltrować przez sterylny filtr 0.22µm firmy Roth:

a. 50% acetonitryl 50mM NH₄HCO₃:
acetonitryl 10ml
100mM NH₄HCO₃ 10ml

b. 25mM NH₄HCO₃:
100mM NH₄HCO₃ 5ml
MQ 15ml

c. 10mM DTT:
1M DTT 10µl
100mM NH₄HCO₃ 990µl
Sporządzić bezpośrednio przed użyciem.

d. 50mM jodacetamid:
0.5M jodacetamid 100µl
100mM NH₄HCO₃ 900µl
Sporządzić bezpośrednio przed użyciem.

e. Roztwór trypsyny w 25mM NH₄HCO₃ 10ng/µl (pH 8.5):
Trypsyna (roztwór wyjściowy) 20µl
25mM NH₄HCO₃ 180µl
Ilość enzymu na 10 próbek. Sporządzić bezpośrednio przed użyciem.

f. Roztwór do ekstrakcji 0,1% TFA 2% acetonitryl:
1%TFA 2ml
acetonitryl 0.4ml
MQ 17.6ml

