

Trawienie mieszaniny białek w roztworze.

Maksymalna aktywność trypsyny jest obserwowana w warunkach pH 7-9.

Enzym ten jest odporny na łagodne środowisko denaturujące: 0.1% SDS, 1M mocznik, 10%ACN. Standardowo wykonujemy trawienie w roztworze w 100mM NH_4HCO_3 .

Redukcja i alkilacja:

Dodać odpowiednią objętość 100mM DTT/100mM NH_4HCO_3 , tak aby stężenie końcowe wynosiło 10mM. Inkubować w 57°C przez 30 min.

Alkilację przeprowadzić poprzez dodanie roztworu 0.5M IAA, takiej objętości aby uzyskać stężenie równe 50mM. Inkubować przez 45min w temperaturze pokojowej bez dostępu światła.

W celu usunięcia nadmiaru IAA dodać 1M DTT/100mM NH_4HCO_3 aby stężenie końcowe wynosiło 50mM. Inkubować przez 45min w temperaturze pokojowej bez dostępu światła.

Trawienie.

Dodać do mieszaniny białek roztwór trypsyny (100ng/ μl) w stosunku 10:1.

Inkubacja całą noc w 37°C.

Po zakończeniu reakcji próbkę zakwasić roztworem 5%TFA do pH około 4.

Próbkę przechowywać w temp. 4°C.

Materiały:

A. 100mM NH_4HCO_3 :

NH_4HCO_3 790mg
MQ 100ml
przechowywać w temperaturze pokojowej

B. 1M DTT:

DTT 154mg
MQ 1ml
przechowywać w -20°C

C. 0.5M IAA:

jodacetamid 925mg
MQ 10ml
przechowywać w 4°C bez dostępu światła

D. Trypsyna:

Zliofilizowany enzym rozpuścić w 200 μl buforu do rozpuszczania wg instrukcji producenta (Sequencing Grade Modified Trypsin Promega nr kat V5111).
przechowywać w -20°C

E. 5% TFA:

TFA 5ml
MQ dopełnić do 100ml
przechowywać w temperaturze pokojowej