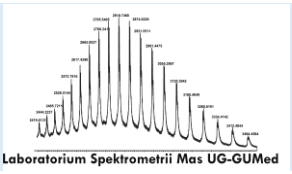
Trawienie trypsyną białek w roztworze



Próbka: Ekstrakt z komórek ludzkiej linii komórkowej K562
(MS compatible human protein extract intact, PROMEGA)
stężenie próbki: **10 µg/µl**
objętość próbki: **5 µl**

Pracujemy w odzieży ochronnej, rękawiczkach winylowych i okularach ochronnych!

1. Rozcieńczyć próbkę do 10 µl dodając 5 µl 50 mM roztworu NH_4HCO_3.
2. Redukcja mostków disiarczkowych: dodać 1 µl roztworu 50 mM DTT/50 mM NH_4HCO_3 i wymieszać (*vortex*).
3. Inkubować próbkę w temperaturze 37°C przez 30 min, przy ciągłym mieszaniu (*thermoshaker*).
4. Schłodzić próbkę do temperatury pokojowej.
5. Alkilacja reszt sulfhydrylowych cysteiny: dodać 1 µl świeżo przygotowanego roztworu 150 mM IAA/50 mM NH_4HCO_3 i wymieszać (*vortex*).
6. Próbkę natychmiast umieścić w ciemności i inkubować w temperaturze pokojowej przez 30 min.
7. Dodać 20 µl 50 mM NH_4HCO_3.
8. Dodać 2 µl 0,1 µg/µl roztworu trypsyny (E:S 1:50 w/w) i wymieszać (*vortex*).
9. Inkubować przez w temperaturze 37°C przez noc, przy ciągłym mieszaniu (*thermoshaker*).
10. Zatrzymać trawienie dodając 3 µl 10% FA.
11. Odwirować próbkę (16 000 x g, 10min) i pobrać roztwór znad osadu.
12. Odsolić próbkę za pomocą ZipTip C18 i ewentualnie potem zatężyć (*speedvac*).
13. Umieścić odsoloną próbkę w vialu i analizować z wykorzystaniem LC-MS/MS (nastrzyk 5 µl).

Odczynniki potrzebne do przeprprowadzenia procedury trwaienia trypsyną białek w roztworze (klasa czystości: MS-grade!):

Roztwory	Opis
50 mM NH_4HCO_3	50 mM roztwór wodorowęglanu amonu
50 mM DTT/50 mM NH_4HCO_3	50 mM roztwór ditiotreitolu w 50 mM wodorowęglanie amonu
150 mM IAA/50 mM NH_4HCO_3	150 mM roztwór jodoacetamidu w 50 mM wodorowęglanie amonu
0,1 µg/µl trypsyna	0.1% roztwór trypsyny Sequencing Grade Modified Trypsin (PROMEGA)
10% FA	10% roztwór kwasu mrówkowego

GDAŃSK 16.06.2016