

Stand 20.8.2009

Tryptischer In-Gel-Verdau

Ansprechperson Gerald N. Rechberger
Institut für Molekulare Biowissenschaften
Humboldtstraße 50/II
8010 Graz
Tel.: +43 (0)316 / 380-1933
Email: gerald.rechberger@uni-graz.at

Abkürzungen

ACN	Acetonitril
DTT	Dithiothreitol
FA	Ameisensäure (formic acid)
IAA	Iodacetamid
RT	Raumtemperatur

Verwendete Chemikalien

H ₂ O dd	Fresenius Kabi, Art. 11500063
NH ₄ HCO ₃	Sigma A-6141
Acetonitril	Merck UN 1648
Dithiothreitol	Serva 20710
Iodacetamid	Sigma I-1149
Ameisensäure p.a.	Merck UN 1779
CaCl ₂	Merck 102382
Trypsin (sequencing grade)	Promega V-5111
HCl	Merck UN 1789

Verwendete Lösungen

Puffer:	NH ₄ HCO ₃ 100 mM in H ₂ O (320 mg in 40 ml H ₂ O = 8 mg/ml)
ACN 50%	H ₂ Odd/ACN 1/1 (v/v)
Reduzierungspuffer	Dithiothreitol 10 mM in Puffer (1,5mg/ml)
Alkylierungspuffer	Iodacetamid 55 mM in Puffer (10 mg/ml) lichtempfindlich!!!
HCl 1 mM	in H ₂ Odd (zur Herstellung der Trypsin-Stammlsg.)
CaCl ₂ -Stammlösung	120 mM in H ₂ Odd: (17,64 mg CaCl ₂ *2 H ₂ O/ml H ₂ O)
Trypsin-Stammlösung	20 µg Trypsin in 200 µl 1 mM HCl Zugabe von 67 µl CaCl ₂ -Stammlsg; mischen; in 20µl-Aliquots bei -20°C lagern
Verdaupuffer	H ₂ Odd /Puffer/ Trypsin-Stammlösung 50/50/15 (v/v/v) frisch bereiten und gekühlt halten (0°C und + 4°C)
Inkubationspuffer	H ₂ Odd /Puffer/ CaCl ₂ -Stammlösung 65/50/5 (v/v/v)
Extraktionspuffer	NH ₄ HCO ₃ 25mM (Puffer/H ₂ O 1/3 v/v)
Ameisensäure 5%	HCOOH /H ₂ O 1/18 (v/v)

Durchführung

Allgemeine Hinweise

Alle im Protokoll angegebenen Prozeduren sind das Produkt von eigener Erfahrung, Beobachtung und Literaturangaben^{1,2}. Es ist leicht möglich, dass sich einzelne Werte des Protokolls, besonders Mengen- oder Zeitangaben von anderen Protokollen unterscheiden.

Auch stellen viele Angaben bezüglich Zeit, Volumina oder Anzahl von Vorgängen nur einen Richtwert dar. Wenn nicht ausdrücklich die exakte Einhaltung eines Wertes verlangt wird, sind Änderungen innerhalb gewisser Grenzen kein Problem.

Arbeitsweise:

Immer mit puderfreien Handschuhen arbeiten, um Keratinverunreinigungen zu vermeiden. Auf Sauberkeit und Staubfreiheit der Umgebung achten!

Sämtliche Eppendorf-Gefäße, die mit Gelen oder Extrakten in Berührung kommen, werden unmittelbar vor Verwendung mit 50%igem ACN gewaschen und im Trockenschrank bei 75°C getrocknet.

Probenvorbereitung

Gelbände möglichst exakt ausschneiden – Hintergrund so gut wie möglich entfernen. Bei 1D-Gelen: Ausgeschnittene Gelbände in Stückchen von etwa 1x1 mm schneiden. Gelstücke in saubere Eppendorf-Gefäße überführen.

Waschen der Gelstücke

Zu Gelstücken:

150 µl H₂O → 5 min schütteln → kurz zentrifugieren → Lösung abheben/verwerfen

150 µl Puffer → 5 min schütteln → kurz zentrifugieren → Lösung abheben/verwerfen

150 µl 50% ACN → 5 min schütteln → kurz zentrifugieren → Lösung abheben/verwerfen

Falls Coomassie-gefärbte Gelstücke nicht vollständig entfärbt sind, dann nochmals

150 µl 50% ACN → 5 min schütteln → kurz zentrifugieren → Lösung abheben/verwerfen

Die (entfärbten) Gelstücke werden folgendermaßen geschrumpft und getrocknet:

150 µl ACN → 5 min schütteln → kurz zentrifugieren → Lösung abheben/verwerfen → Gelstücke auf Speed-Vac trocknen

¹ Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M., Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.*, 1986, 68: 850–858

² Wilm, M., Shevchenko, A., Houthaeve, T., Breit, S., Schweigerer, L., Fotsis, T., Mann, M., Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry, *Nature*, 1996, 379: 466-469

Reduktion und Alkylierung

Zu Gelstücken

60 µl Reduzierungspuffer. → 30 min bei 56°C schütteln → kurz zentrifugieren → Lösung abheben/verwerfen

150 µl ACN → maximal 5 min bei RT schütteln (nicht länger, damit sich die Schwefelbrücken nicht zurückbilden!) → kurz zentrifugieren → Lösung abheben/verwerfen

60 µl IAA-Lsg. → 20 min bei RT schütteln (**dunkel!**) → kurz zentrifugieren → Lösung abheben/verwerfen

150 µl Puffer → 5 min bei RT schütteln → kurz zentrifugieren → Lösung abheben/verwerfen

150 µl ACN → 15 min bei RT schütteln → kurz zentrifugieren → Lösung abheben/verwerfen

Gelstücke in Speed-Vac. trocknen, dann auf Eis stellen bzw. zur Lagerung tieffrieren

Verdau

Alle Komponenten auf Eis stellen (Proben, Trypsin-Stammlsg., Wasser, Puffer) und den Verdaupuffer mit kalten (!) Lösungen erst knapp vor der Zugabe frisch bereiten.

Immer gekühlt arbeiten!

Verdaupuffer in kleinen Schritten den getrockneten Gelen zusetzen (zuerst 4µl dann 2µl und dann in 1µl Schritten) und die Gelstückchen solange quellen lassen, bis sie vollständig aufgequollen sind. Möglichst keinen Überschuss an Verdaupuffer zusetzen, da sich sonst das Trypsin selbst verdaut und die Probe mit Trypsinpeptiden verunreinigt.

Nach Beendigung der Zugabe von Verdaupuffer (und nach der Aufquellung) wird soviel Inkubationspuffer (ebenfalls frisch bereitet) zugegeben, bis die Gelstücke gerade bedeckt sind.

Die Gelstücke über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubieren.

Extraktion

Proben kurz zentrifugieren.

Zu Gelstücken:

20 µl Extraktionspuffer → 15 min bei 37°C schütteln → kurz zentrifugieren

dazu 160 µl ACN → 15 min bei 37°C schütteln → kurz zentrifugieren →

Überstand in neuem Eppi sammeln!

Zu Gelstücken:

35 µl 5% Ameisensäure → 15 min bei 37°C schütteln → kurz zentrifugieren

dazu 160 µl ACN → 15 min bei 37°C schütteln → kurz zentrifugieren →

Überstand mit erstem vereinigen und auf der Speed-Vac. vollständig trocknen.