

Proteolytischer Abbau im Gel

SDS-Page

- SDS-PAGE der Proteinlösung
- Coomassie-Färbung: ohne Fixieren mit Coomassie Blue G250 färben.
- Bei einer Silberfärbung sollten keine Cross-Linking-Reagenzien wie Glutaraldehyd verwendet werden. Eine geeignete Silberfärbungsmethode ist hier beschrieben: A. Shevchenko, M. Wilm, O. Vorm and M. Mann, Anal. Biochem., 69, 850-858 (1996)
- In letzter Zeit wurde auch die Färbung mit Fluoreszenzfarbstoffen wie z.B. **Sypro Ruby** etabliert, die ähnlich empfindlich wie die Silberfärbung sind, jedoch einen weitaus höheren dynamischen Bereich erreichen.
- Alle Färbe/Entfärbeschritte (Coomassie, Sypro Ruby oder Silber) sollten nur so lange durchgeführt werden, bis die einzelnen Banden gerade eben zu sehen sind.
- Beim Anfassen des Gels sollten immer puderfreie Handschuhe getragen werden. Beim Ausschneiden sollten saubere Schneidewerkzeuge wie z.B. ein Skalpell verwendet werden.
- Die Gelstücke werden mit einem Skalpell ausgeschnitten.
- Für alle Schritte der Probenpräparation sollten reinste Lösungsmittel verwendet werden.
- Gelstücke werden in 500 µl Acetonitril / Wasser 3/2 „geschrumpft“ (10 min).
- Der Überstand wird abpipettiert.
- Die Gelstücke werden 15 min in der Lyophilie getrocknet.

Reduktion von Disulfid-Brücken

- Die Gelstücke werden mit 10 mM (1.5 µg/µl) Dithiotreitol (DTT) in 50 mM NH_4HCO_3 benetzt und 1 h bei 56°C inkubiert.

Alkylierung der freien Cystein-Thiolgruppen

- Nach abkühlen auf Raumtemperatur wird die DTT-Lösung abpipettiert und mit dem gleichen Volumen 50 mM (9.5 µg/µl) Iodacetamid (IAA) in 50 mM NH_4HCO_3 ersetzt.
- Es sollte nur Iod-freies Iodacetamid verwendet werden (weiße Farbe, nicht gelblich) um eine Iodierung von Tyrosin-Resten zu vermeiden. Um Iod aus IAA zu entfernen, löst man IAA im Scheidetrichter in Wasser. Man gibt die gleiche Menge Toluol zu und schüttelt. Dabei färbt sich die untere - organische - Phase violett. Die organische Phase wird abgetrennt und verworfen, die wässrige Phase lyophilisiert.
- Bei Raumtemperatur wird 45 min unter Lichtausschluß inkubiert (IAA ist lichtempfindlich!).
- Der Überstand wird abpipettiert.

Waschen

- Die „Reinigung“ der Gelstücke von DTT und IAA ist Voraussetzung für einen vernünftigen enzymatischen Verdau.
- Die Gelstücke werden mit 50 mM NH_4HCO_3 gewaschen (10 min).
- Die Gelstücke werden in 500 μl Acetonitril / Wasser 3/2 „geschrumpft“ (10 min).
- Der Überstand wird abpipettiert.
- Die Gelstücke werden 15 min in der Lyophilie getrocknet.
- Die Rehydratisierung erfolgt mit 50 mM NH_4HCO_3 .
- Schrumpfen/Lyophilisieren/Rehydratisieren wird noch zweimal wiederholt.
- Nach dem Lyophilisieren der Gelstücke können diese bis zu einem enzymatischen Verdau zunächst bei -20°C gelagert werden.

Enzymatischer Verdau

- Für den Im-Gel-Verdau der Proteine ist die Verwendung von modifizierten Proteasen in hochreiner Form (modified sequencing grade) erforderlich.
- Nach dem dritten Waschzyklus wird zum getrockneten Gelstück ca. 50 μl kaltes Trypsin (12.5 ng/ μl) in 1 mM HCl zugegeben
- Der Überstand wird abpipettiert.
- Die Gelstücke werden mit ca. 50 μl 50 mM NH_4HCO_3 benetzt und 12 h bei 37°C abgebaut

Elution

- Die Reaktionslösung wird abpipettiert und aufbewahrt. Kleinere Peptide können bereits während des Trypsin-Verdau in die NH_4HCO_3 -Lösung diffundieren.
- Die Peptide werden aus den Gelstücken mit ca. 100 μl Acetonitril/Wasser 3/2 2-3 h unter Schütteln eluiert.
- Die Extrakte werden kombiniert und lyophilisiert; es sollten in der Regel 500 μl -Eppendorf-Cups verwendet werden, da sie eine Wiederaufnahme der Extrakte in kleinen Volumina (1-3 μl) für die Massenspektrometrie erleichtern.
- Die lyophilisierten Proben werden in Acetonitril / 0.1% TFA aufgenommen und direkt zur MALDI-MS verwendet

WWW-Links zu alternativen Protokollen und massenspektrometrischen Methoden

<http://www.mol.biol.ethz.ch/glockshuber/massspec.html>

(ETH Zürich)

<http://info.med.yale.edu/wmkeck/geldig3.htm>

(Keck Foundation Biotechnology Resource Laboratory, Yale University)

<http://depts.washington.edu/~ruedilab/aegersold.html>

(Aegersold Protein Laboratory, University of Washington)

<http://www.garvan.unsw.edu.au/public/corthals/HTML-protocols/trypsin.html>

(Biological Mass Spectrometry Laboratory, University of New South Wales)

http://www.cco.caltech.edu/~ppmal/sample_prep/digest.html

(Protein Micro Analytical Laboratory, Caltech)

<http://donatello.ucsf.edu/ingel.html>

(UCSF Mass Spectrometry Facility)