

In-Gel-Spaltung von Proteinen mit Trypsin (über Nacht)

Vorbereitung der Gelstücke

- Mit einem sauberen Skalpell die Gelbände ausschneiden und in Probengefäß (z.B. LoBind Gefäße von Eppendorf, für gering konzentrierte Proteinproben) geben. Vorsichtig die Gelbände in kleine Würfel mit ca. 1 mm Größe zerteilen. Falls eine Negativkontrolle benötigt wird, aus einem Protein-freien Bereich des Gels ein Stück ausschneiden und wie oben beschrieben behandeln.
- Um noch eventuell verbliebene Chemikalien der Gelfärbung (z. B. zu entfernen, die Gelstücke mit ca. 200 µL MilliQ-Wasser für 30 Sekunden unter Schütteln waschen.

Entfärben

- ***Coomassie Blue oder Coomassie Blue Silber Färbung:***

Mindestens zweimal für 5 Minuten unter schütteln mit 200 µL 25 mM NH₄HCO₃ (Ammoniumbicarbonat, BIC)/50% Acetonitril entfärben. Falls notwendig, wiederholen. Überstände nach jedem Schritt verwerfen.

Gelstücke mit 100 µL 100% Acetonitril versetzen und für 30 Sekunden schütteln. In diesem Schritt müssen die Gelstücke **schrumpfen** und **weiß** werden. Überstand verwerfen und Gelstücke in der SpeedVac trocknen.

Reduktion und Alkylierung (wichtig bei der Analyse Cystein-haltiger Proteine!)

- Gelstücke in 50 µL frisch hergestelltem 25 mM Dithiothreitol (DTT; in 25 mM BIC rehydrieren. Proteine für 20 Minuten bei 56°C unter Schütteln reduzieren.
- Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur, Überstand abnehmen und verwerfen. 50 µl frisch hergestellte 55 mM Iodoacetamid (IAA; in 25 mM BIC) hinzugeben. Proteine für 45 Minuten **im Dunkeln** bei Raumtemperatur alkylieren.
- Überstände verwerfen und Gelstücke mit ca. 400 µL MilliQ-Wasser für 30 Sekunden waschen, um restliches DTT und IAA zu entfernen.
- Gelstücke für 5 Minuten mit 200 µL 25 mM BIC/50% Acetonitril und anschließend für 30 Sekunden mit 100 µL 100% Acetonitril versetzen und für 30 Sekunden schütteln. In diesem Schritt müssen die Gelstücke **schrumpfen** und **weiß** werden. Überstände nach jedem Schritt verwerfen und Gelstücke in der SpeedVac trocknen.

Trypsin Spaltung

- Gelstücke für 5 Minuten in 5 µL Trypsin-Lösung (50 ng/µL; 25 mM BIC/3% Acetonitrile) [Promega Sequence Grade, Modified] quellen lassen. Der pH-Wert sollte ca. 8 betragen.
- Um ein Austrocknen zu verhindern, die gequollenen Gelstücke mit ca. 0-20 µL 25 mM BIC überschichten. Über Nacht (oder für 16-24 Stunden) bei 37°C inkubieren lassen.

Peptid Extraktion

- Spaltpeptide mit 50 µL MilliQ Wasser/50% Acetonitril/3% TFA durch Schütteln für 10 Minuten bei Raumtemperatur (oder 37°C, falls notwendig) aus den Gelstücken extrahieren. Den Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß (z.B. LoBind Gefäße von Eppendorf, für gering konzentrierte Proteinproben) überführen. Den Vorgang zweimal wiederholen, die Extraktionslösungen jeweils im gleichen Gefäß vereinigen.
- Die Peptidlösung in einer SpeedVac bis zur Trockene einengen (ca. 1-2 Stunden). *Falls notwendig, können die lyophilisierten Peptide in diesem Zustand bei -20°C für mehrere Monate gelagert werden.*
- Die lyophilisierten Peptide in 20 µL MilliQ Wasser/3% Acetonitril/0.1% TFA aufnehmen. Dazu für 5 Minuten bei Raumtemperatur immer wieder vortexen.
- *Zur Sicherheit:* Die Gelstücke können im Kühlschrank bis zum Abschluß der MS-Analyse aufbewahrt werden. Sollte die enzymatische Spaltung nicht erfolgreich verlaufen sein, kann sie dadurch mit diesen Gelstücken wiederholt werden. Allerdings wird man in der erneuten MS-Analyse mit großer Wahrscheinlichkeit Spaltpeptide von Trypsin identifizieren, da nun mehr Trypsin vorhanden ist.

Vorbereitungen für die MS-Analyse

- Optionaler Schritt vor der LC-unterstützten Analyse: Um Gelpartikel und ähnliche Bestandteile, die zum Verstopfen der LC-Säule führen können, zu entfernen, zentrifugiert man die Peptidmischung nach dem Aufnehmen durch Millipore Ultrafree-MC Filtereinheiten (0.45µm). Dies dauert bei 10,000 g ca. 5 Minuten.
- Für LC-unterstützte Analyse überführt man die Peptidmischung mit einer **Gelloader Pipettenspitze** in ein Glasprobengefäß (entweder “Center Drain” oder mit einem *Einsatz für kleine Probenvolumina*).
- Für MALDI-Analysen wird eine Entsalzung mit ZipTip-C18 Minisäulen (Millipore) vor der Probenpräparation empfohlen.

References

- Jimenez, C.R. *Current Protocols in Protein Science*. 1998; 16.4.1-16.4.5
- Gharahdaghi, F. et al. *Electrophoresis*. 1999; **20**: 601-605.
- Hirouki, K. et al. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2001; **15**; 1416-1421.
- Shevchenko, A. et al. *Nature Protocols*. 2007; **1**, 2856-2860.