

## *In-Lösungs-Spaltung*

Eine Proteinlösung (Konzentration am besten 10  $\mu\text{M}$ ) wird mit 0,2 M Ammoniumbicarbonatlösung (BIC) und 8 M Harnstofflösung versetzt. Ziel ist eine BIC-Konzentration von 0,1 M und eine Harnstoffkonzentration von 2 M (z.B. 10  $\mu\text{L}$  einer 10  $\mu\text{M}$  Proteinlg. + 20  $\mu\text{L}$  200 mM BIC + 5  $\mu\text{L}$  8 M Harnstoff + 5  $\mu\text{L}$  MilliQ Wasser).

Zur Reduktion der Disulfidbrücken werden 5  $\mu\text{L}$  einer 25 mM DTT-Lösung (in 25 mM BIC) zugegeben und bei 60°C für 15 min inkubiert (Schütteln). Die Mischung auf Raumtemperatur abkühlen lassen. Die Alkylierung des Proteins erfolgt im Dunkeln für 15 min bei Raumtemperatur unter Zugabe von 5  $\mu\text{L}$  einer 55 mM Iodoacetamid-Lösung (in 25 mM BIC; Schütteln).

Ein Trypsin-Aliquot (Stammlösung: 1  $\mu\text{g}$  Trypsin (Sequencing Grade, Promega) in 2  $\mu\text{L}$  1 mM HCl) wird mit 18  $\mu\text{L}$  25 mM BIC/3% Acetonitril aufgefüllt. Das Trypsin wird im Verhältnis 1:60 Enzym:Substrat (w/w) zugegeben (z.B. für 10  $\mu\text{L}$  einer 10  $\mu\text{M}$  Cytochrom *c* Lösung werden 21 ng Trypsin = 0,42  $\mu\text{L}$  der Trypsinlösung benötigt).

Die Proteolyse erfolgte über Nacht bei 37°C und wird durch Zugabe von 10  $\mu\text{L}$  10% TFA (**der pH-Wert muss sauer sein!**) gestoppt. Die Peptidgemische werden im Vakuumkonzentrator zur Trockene eingengt und für die LC-MS Analyse mit 20  $\mu\text{L}$  MilliQ Wasser/3% Acetonitril/0,1% TFA wieder in Lösung gebracht. Vortexen unterstützt den Vorgang.

Die zur Trockene (oder auf ein Restvolumen von 20  $\mu\text{L}$  eingengten) Proben können in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C im Gefrierschrank aufbewahrt werden.

Alternativ zu Trypsin können auch die Enzyme AspN (1:40, w/w), GluC (1:60, w/w) und/oder Chymotrypsin (1:60, w/w) verwendet werden. Dies muss bei der anschließenden Auswertung der MS-Daten berücksichtigt werden!

## *In solution Digestion*

Add to a protein solution (ideal concentration 10  $\mu\text{M}$ ) 0.2 M ammonium bicarbonate (BIC) and 8 M urea. The final concentration of BIC has to be 0.1 M and of urea 2 M (e.g. 10  $\mu\text{L}$  protein solution + 20  $\mu\text{L}$  200 mM BIC + 5  $\mu\text{L}$  8 M urea + 5  $\mu\text{L}$  MilliQ water).

Disulfide bridges are reduced by addition of 5  $\mu\text{L}$  of 25 mM DTT (in 25 mM BIC), the mixture is incubated at 60°C for 15 minutes (shaking). Let the mixture cool down to room temperature. Then 5  $\mu\text{L}$  of 55 mM iodoacetamide (in 25 mM BIC) is added and the protein is alkylated for 15 minutes in the dark (shaking).

A trypsin aliquot (stock solution: 1  $\mu\text{g}$  trypsin (Sequencing Grade, Promega) in 2  $\mu\text{L}$  1 mM HCl) is mixed with 18  $\mu\text{L}$  25 mM BIC/3% acetonitrile. Trypsin is added to the protein solution in a 1:60 (w/w) enzyme-to-substrate ratio (e.g. for 10  $\mu\text{L}$  of 10  $\mu\text{M}$  cytochrome *c* 21 ng of trypsin = 0.42  $\mu\text{L}$  trypsin solution are needed).

The mixture is incubated at 37°C over night. To stop the digestion, 10  $\mu\text{L}$  of 10% TFA is added (**pH has to be acidic!**). The solvent is removed in a SpeedVac. For LC-MS analysis the dried peptides are re-solubilized by adding 20  $\mu\text{L}$  of MilliQ water/3% acetonitrile/0,1% TFA. Vortexing assists this process.

The dried (or to a volume of 20  $\mu\text{L}$  reduced) sample can be frozen with liquid nitrogen and stored in the freezer at -20°C.

Instead of trypsin, the enzymes AspN (1:40, w/w), GluC (1:60, w/w) and/or chymotrypsin (1:60, w/w) can be used. This has to be considered during the data analysis of the MS experiments!