

Lösungen und Chemikalien für *in-Gel/in-Lösung* Spaltungen mit Trypsin

Chemikalien

- 1) Ammoniumbicarbonat (BIC; NH_4HCO_3 ; MW 79.06 g/mol)
- 2) Dithiothreitol (DTT; MW 154.25 g/mol)
- 3) Iodoacetamid (IAA; MW 185 g/mol)
- 4) Trypsin (Sequencing grade, modified; Promega Corp, 5 x 20 μg , Ctlg V5111)
- 5) Wasser (HPLC grade or MilliQ, Millipore, 18 M Ω)
- 6) Acetonitril (HPLC grade)
- 7) Trifluoroessigsäure (TFA; HPLC grade) [Alternative: Ameisensäure (LC/MS grade)]
- 8) Salzsäure (HCl, für Molekularbiologie)
- 9) Harnstoff (für Molekularbiologie, 60,1 g/mol)

Laborausstattung

Laminar Flow Hood

Zentrifuge für Labortisch

Schüttler, beheizbar (37°C und 56°C)

0.5 mL Polypropylengefäße (1,5 mL Gefäße können auch genutzt werden)

Vakuumzentrifuge (Speedvac)

0.45m Filtereinheiten (ULTRAFREE-MC, Durapore-PVDF 0.45 μm , Millipore)

Vorbereitung der Chemikalien

Die Lösungen immer kurz vor Benutzung herstellen (falls nicht anders angegeben):

1. **200 mM Ammoniumbicarbonat (BIC) in Wasser (iG/iS):**
Löse 1.582 g BIC in 100 mL MilliQ Wasser. Puffer täglichen in größeren Mengen (50-100 mL) herstellen und nach Verwendung entsorgen.
2. **25 mM BIC (iG/iS):**
2,5 mL der 200 mM BIC mit 17,5 mL MilliQ Wasser verdünnen. Ergibt 20 mL.
3. **25 mM BIC/50% (vol/vol) Acetonitril (iG):**
2,5 mL 200 mM BIC + 7,5 mL MilliQ Wasser + 10 mL Acetonitril. Ergibt 20mL.
4. **25 mM DTT in 25 mM BIC (iG/iS):**
Löse 19,3 mg DTT in 5 mL 25 mM BIC. Diese Menge reicht für ~85 Gelbanden, 50 μL /Bande. Kurz vor Gebrauch herstellen. Für weniger Gelbanden weniger Lösung herstellen.
5. **55 mM Iodoacetamide in 25 mM BIC (iG/iS):**
Löse 50,9 mg IAA in 5 mL 25 mM BIC. Diese Menge reicht für ~85 Gelbanden, 50 μL /Bande. Kurz vor Gebrauch herstellen. Für weniger Gelbanden weniger Lösung herstellen.
6. **25 mM BIC/3% Acetonitril (vol/vol) (iG/iS):**
Mische 1,25 mL 200 mM BIC mit 0,3 mL Acetonitril und 8,45 mL MilliQ Wasser. Ergibt 10 mL.
7. **10% TFA (vol/vol) (iG/iS):**
Mische 1 mL TFA mit 9 mL MilliQ Wasser. Kann im Kühlschrank gelagert werden.
Unbedingt Glaspipette für die TFA benutzen!
8. **50%Acetonitril/3% TFA (vol/vol) (iG):**
Mische 10 mL Acetonitril mit 6 mL 10% TFA und 4 mL MilliQ Wasser. Ergibt 20 mL. Diese Menge reicht für ~100 Gelbanden, 150 μL /Bande. Für weniger Gelbanden weniger Lösung herstellen.

9. **3% Acetonitril/0,1% TFA (vol/vol) (iG/iS):**
Zu 9,6 mL MilliQ Wasser 0,3 mL Acetonitril und 0,1 mL 10% TFA hinzugeben.
Ergibt 20 mL.
10. **Trypsin, Stammlösung (1 µg/2 µL) (iG/iS):**
Den Inhalt eines 20 µg Gefäßes Trypsin (Sequencing grade, modified; Promega Corp) in 40 µL 1 mM HCl lösen. Aliquote mit einem Volumen von 2 µL herstellen und in flüssigem Stickstoff schockfrieren. Bei -20°C im Gefrierschrank lagern.
11. **Trypsin, 50 ng/µL (iG/iS):**
Der Inhalt eines 2 µL Trypsinaliquots wird in 18 µL 25 mM BIC/3% (vol/vol) Acetonitril gelöst. Ein Aliquot reicht für 4 Gelbanden. Nicht genutztes Enzym entsorgen.
12. **8 M Harnstoff (iS):**
Löse 4,8 g Harnstoff in 10 mL MilliQ Wasser. Kann für einige Wochen im Kühlschrank gelagert werden.

(iG): benötigt für *in-Gel* Spaltung

(iS): benötigt für *in-Lösung* Spaltung