



Gelextraktion aus SDS-Gele (KE7084 - 1, 2, 3, 4)

Bänder 1, 2, 3 und 4 ausgeschnitten und nach Proteoll aufgearbeitet

Präparation der benötigten Lösungen

1	Ammoniumhydrogen-carbonate	100 mM, pH 8,5	Löse 790,6 mg NH_4HCO_3 in 90 ml Wasser, bei pH-Wert von 8,5 mit 2M NH_4OH einstellen und mit Wasser bis 100 ml auffüllen
2	Destaining Lösung	30% Acetonitrile in 100 mM NH_4HCO_3	30 ml Acetonitrile bis 100 ml auffüllen mit 100mM NH_4HCO_3 (Lösung 1)
3	Reducing Lösung (frisch ansetzen)	10 mM DTT in 100mM NH_4HCO_3	Präparieren Sie 100mM DTT Lösung bei auflösen von 15,4 mg DTT/ml in 100mM NH_4HCO_3 (Lösung 1), dann 1:10 verdünnen mit 100mM NH_4HCO_3 (Lösung 1)
4	Alkylating Lösung (frisch ansetzen)	54 mM Iodoacetamide in 100 mM NH_4HCO_3	Lösen Sie 10mg/ml Iodoacetamide in 100 mM NH_4HCO_3 (Lösung 1)
5	Extraction Lösung		350µl Acetonitrile mit 650µl Wasser und 4µl TFA mischen
6	Reconstitution Lösung	10 mM HCL	100µl 1M HCL zu 9,90 ml Wasser geben, dann mixen
7	Digestion Buffer	50 mM NH_4HCO_3 pH 8,5/5% Acetonitrile	Geben Sie 500µl Acetonitrile zu 5 ml 100 mM NH_4HCO_3 (Lösung 1), geben sie ultrareines Wasser bis zu einem Endvolumen von 10 ml dazu

25.4.10

Prozedur von Gel Prozess:

- Schritt 01: Coomassie-Proteinband aus Gel herausschneiden
 (Schritt 02: Gel in kleinere Gelstücke von 1mm² teilen)
 Schritt 03: Gelstücke in einen Eppendorf Tube von 1,5 ml einsetzen
 Schritt 04: Nun **100µl ultrareines Wasser** in den Tube mit einer Pipette hinzufügen, schütteln und dann **10 min bei 15-25 °C** in den Thermomixer geben
 Schritt 05: ultrareines Wasser mit der Pipette abnehmen und Überstand verwerfen
 Schritt 06: Reinigungsvorgänge (Schritt 4 und 5) einmal wiederholen
 Schritt 07: **100µl Destaining- Lösung** in Tube zugeben und daraufhin **15 min bei 15-25°C** in den Thermomixer
 Schritt 08: Überstand mit einer Pipette entnehmen und verwerfen
 Schritt 09: Wiederholen Sie diese Destainingschritte bis das Gelstück farblos ist (ca. 4 Wiederholungen)
 Schritt 10: **100µl ultrareines Wasser** in den Tube geben, dann schütteln und für **15 min bei 15-25°C** in den Thermomixer geben
 Schritt 11: Überstand mit einer Pipette entnehmen und verwerfen
 Schritt 12: Wiederholen Sie die Reinigungsschritte (10 und 11) einmal
 Schritt 13: **100 µl Acetonitrile** in den Tube geben, dann **15 min bei 15-25°C** in dem Thermomixer schütteln
 Schritt 14: Überstand an Acetonitrile entnehmen und verwerfen
 Schritt 15: Die farblosen Gelstücke **15 min bei 10 mbar und 37 °C im Vakuum-Konzentrator** trocknen

Prozedur von Reduktion und Carboxymethylation

- Schritt 01: **20µl Reduktionslösung** in Tube geben und **bei 15-25°C für 5 min** schütteln
 Schritt 02: Erneut **30min** incubieren bei **50°C**
 Schritt 03: Überstand entnehmen und verwerfen
 Schritt 04: Zugabe von **100 µl Acetonitrile**, dann **15 min bei 15-25°C** incubieren
 Schritt 05: Überstand entnehmen und verwerfen
 Schritt 06: **20µl Alkylating Lösung** (Lösung 4) dazugeben und **15 min bei RT** im Dunkeln incubieren
 Schritt 07: Überstand entnehmen und verwerfen
 Schritt 08: **100µl Destaining Lösung** (Lösung 2) dazugeben, dann schütteln und incubieren für **10 min bei 15- 25°C**
 Schritt 09: Überstand entnehmen und verwerfen
 Schritt 10: **50µl Destaining Lösung** (Lösung 2), dann incubieren und schütteln für **15 min bei 15-25°C** → Gelstücke zerklüften
 Schritt 11: Überstand entnehmen und verwerfen
 Schritt 12: Für **15 min bei 10 mbar und 37°C** im Vakuumkonzentrator trocknen

29.04.10

Trypsin-Verdau (in-gel-digest)**Lagerung**C=200ng/ μ l25 μ g + 125 μ l 10mM HCL (Roche bzw. Serva)20 μ g + 100 μ l 10mM HCL oder 100 μ l Resuspensionspuffer, 50mM HAc (Promega)
(50mM HAc: 30°C für 15min für eine maximale Aktivität, Promega)
Lagerung bei -80°C

Serva: Trypsin NB Premium Grade, MS approved

Roche: Trypsin, recombinat, proteomics grade

Promega.: Sequencing Grade Modified Trypsin (V5111)

DigestionC=3ng/ μ lbei bep. Vol 500 μ l \rightarrow 3ng \cdot 500 = 1500 ng1500 / 200 = 7.5 μ lVol.: 200 μ l500 - 7.5 μ l492.5 μ l rest**Standard-Prozedur**3 μ l Trypsin-Stammlösung + 197 μ l Digestion-Puffer (10mM NH_4HCO_3 /5%ACN),
 \uparrow

bei RT über Nacht

10 μ l Trypsin- Lösung zu den Gelstückchen geben (ggf. mehr Lsg. verwenden, Gelstücke sollten komplett bedeckt sein)**Extraktion**10 μ l bzw. das Volumen was man an Trypsin eingesetzt hat Extraction Lsg dazu geben, inkubieren bei RT unter leichtem schütteln für 40min

Überstand abnehmen und in ein 1,5ml Eppli überführen

2.Extraktion mit 10 μ l bzw. mehr Extraktions-Puffer durchführen, 15min RT schütteln bzw. Vortex

Überstand abnehmen und Extrakt 1 und 2 vereinigen

Lösungsmittel in SpeedVac entfernen (Probe muss richtig trocken sein)

Rückstand in 10 μ l 0.1% TFA aufnehmen \Rightarrow Auswertung sh. S 91Durchgeführt von/
Performed byDatum/
DateBestätigt durch/
Approved byDatum/
DateFortsetzung auf Seite Nr./
Continued on page number

a.k. J.

30.4.10

J. am

30.4.10

91