

Ekstrakcja peptydów z trawionych trypsyną białek z kawałków żelu SDS-PAGE



Pracujemy w odzieży ochronnej, rękawiczkach winylowych i okularach ochronnych!

1. Kawałki żelu SDS-PAGE, zawierające trawione trypsyną białka, inkubować przez 15 min w temperaturze pokojowej z 20 μ l 50 mM roztworu NH_4HCO_3 .
2. Uzyskany roztwór zebrać do nowej probówki Low Protein Binding Tube (tej samej co w pkt. 16 protokołu „Trawienie trypsyną białek rozdzielonych na żelu SDS-PAGE”).
3. Do kawałków żelu dodać 30 μ l 5% FA/50% ACN.
4. Całość inkubować przez 20 min i następnie poddać sonikacji przez 5 min.
5. Zebrać roztwór znad żelu (do tej samej probówki, co wcześniej).
6. Powtórzyć procedurę z pkt. 3-5.
7. Następnie inkubować kawałki żelu przez 5 min z 20 μ l ACN.
8. Zebrać roztwór znad kawałków żelu (do tej samej probówki, co wcześniej).
9. Ekstrakt zawierający peptydy trawionych białek odparowano do sucha, wykorzystując wirówkę pod próżnią (tzw. *SpeedVac*), w 30°C przez 20 min i potem w 60° przez około 1 godzinę.

Przed dalszą analizą MS próbki należy odsolić wykorzystując np. komercyjnie dostępne ZipTips.

Odczynniki potrzebne do przeprowadzenia procedury ekstrakcji peptydów z trawionych trypsyną białek z kawałków żelu SDS-PAGE (klasa czystości: MS-grade!):

| Roztwory | Opis |
|---------------------------------|--|
| 50 mM NH_4HCO_3 | 50 mM roztwór wodorowęglanu amonu |
| 5% FA/50% ACN | 5% roztwór kwasu mrówkowego w 50% roztworze acetonitrylu |
| ACN | Acetonitryl |