

# Štěpení proteinů v gelu (SDS-PAGE nebo 2D-PAGE) trypsinem po obarvení Coomassie Blue

(podle: A. Shevchenko et al.: In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. (2006) Nature Protocols, 1/6, 2856-2860.)

## Postup:

**1) PŘÍPRAVA ROZTOKŮ:** Denně čerstvý roztok: 100 mM hydrogenuhličitan amonný. Čerstvý roztok, možno uchovávat do zásoby zamražený: 10 mM DTT ve 100 mM hydrogenuhličitanu amonném; 55 mM iodoacetamid ve 100 mM hydrogenuhličitanu amonném; roztok trypsinu (0,013 mg/ml ve 10 mM hydrogenuhličitanu amonném). Roztok, který vydrží déle v lednici: 0,1 % kys. mravenčí; extrakční pufr - 5% kys. mravenčí/acetonitril (1:2, v/v). Vždy a všude používáme superčistou vodu (i na proplachování vzorků a nádobí), kterou uchováваме v lednici a denně ji doplňujeme čerstvou. Též acetonitril používáme HPLC-MS grade či grad grade.

**2) VYŘÍZNUTÍ PROTEINŮ:** Na čistě omytou skleněnou desku položíme gel a obarvené proteiny vyřízneme ve formě proužků nebo spotů čistým skalpelem nebo špičkou pipety. Vyříznuté spoty vložíme do malých eppendorfek o objemu cca 0,5 ml. Větší kusy gelu rozřežeme na menší kousky. Případnou nadbytečnou vodu odsajeme a odstraníme. Neměla by uplynout doba delší než 1 týden od doby obarvení gelu (možná degradace proteinů – nicméně jsme detekovali proteiny z gelu, který byl starý 1 rok (uskladněný v lednici v 1% octové kyselině)), úplně nejlepší je proteiny vyřezávat z čerstvého gelu. Snažíme se pracovat rychle, aby na gel nenapadal prach.

(Další postup je optimalizován pro zpracování spotů o velikosti do 2 mm v průměru. Při zpracování větších proužků a čtverečků gelu je třeba volit úměrně větší objem roztoků tak, aby v nich byly nabobtnalé kousky gelu vždy ponořeny. V tomto případě je možno použít i větší eppendorfky o objemu cca 1,5 ml)

**3) ODBARVENÍ:** Ke spotům přidáme 100  $\mu$ l roztoku 100 mM hydrogenuhličitanu amonného/acetonitrilu (1:1, v/v). a za mírného třepání necháme odbarvit po dobu cca 20 min v třepačce dle původní intenzity zbarvení. (odbarvení nemusí být úplně dokonalé, menší

zbytky barviva CBB nevadí, raději neodbarvovat přes noc – ztráty proteinů!). Poté vylijeme odbarvovací roztok a ke každému spotu přidáme 500 µl čistého acetonitrilu (nejlepší kvality, pro HPLC) a necháme působit. Po cca 10-20 minutách se spoty scvrknou, zbělají, pak acetonitril vylijeme a spoty dosušíme ve SpeedVacu, stačí cca 15-30 min.. V tomto okamžiku je možno odbarvené a vysušené spoty uchovávat zamražené v mrazáku po dobu několika týdnů do dalšího zpracování.

**4) REDUKCE:** Ke spotům přidáme 30-50 µl roztoku DTT (10 mM DTT ve 100 mM hydrogenuhličitanu amonném) a inkubujeme 30 min. při 56 °C ve vyhříváném bloku. Poté spoty ochladíme na pokojovou teplotu, přidáme 500 µl čistého acetonitrilu a necháme působit 10 min. Pak odstraníme všechnen roztok a vzorky podrobíme alkylaci.

**5) ALKYLACE:** Ke spotům přidáme 30-50 µl roztoku iodoacetamidu (55 mM iodoacetamid ve 100 mM hydrogenuhličitanu amonného) a inkubujeme 30 min. ve tmě při laboratorní teplotě ve tmě. Poté přidáme 500 µl acetonitrilu, ponecháme působit 10 min., poté odstraníme všechnen roztok a spoty dosušíme ve SpeedVacu. Takto vysušené spoty je možno uchovávat v zamraženém stavu.

Kroky 4) a 5) je možno s výhodou vynechat, pokud máme vzorek, který byl již v průběhu předchozího zpracování alkylován a redukován (např. 2D-PAGE-ekvilibrace stripů, atd) – nicméně doporučujeme tyto kroky pro lepší výsledky udělat.

**6) TRYPSINIZACE:** K vysušeným spotům přidáme 50 µl roztoku trypsinu a necháme jím gel nabobtnat po dobu 30 min. v lednici. Po této době spoty zkontrolujeme a v případě potřeby roztok trypsinu doplníme ještě jednou tak, aby byl spot kompletně ponořen do roztoku trypsinu a necháme trypsin difundovat do gelu po dalších 60 min v lednici. Poté umístíme spoty v dobře uzavřených eppendorfkách do vyhříváného bloku nebo lázně a ponecháme při 37-38 °C přes noc. V nouzi je možno dobu inkubace zkrátit na dobu 3 hod., ale štěpení pak nebude maximální.

**7) EXTRAKCE PEPTIDŮ:** Druhý den ráno si připravíme další sadu popsaných eppendorfek, do kterých přepipetujeme roztok trypsinu (pokud přebývá nad spoty). Ke spotům přidáme 100 µl extrakčního pufru (5 % kys. mravenčí/acetonitril, 1:2) a sonikujeme nejméně po dobu 15 min. v ultrazvuku. Poté extrakční pufr přendáme k původnímu roztoku trypsinu a extrakci ještě jednou zopakujeme. Opakovanou extrakcí se zvyšuje výtěžek

peptidů, proto stojí za to ji dělat i když je časově náročná. Aby se zabránilo křížové kontaminaci vzorků, při přepipetování jednotlivých vzorků používáme buď na každý vzorek novou špičku pipety (drahé-velká spotřeba špiček), nebo špičku oplachujeme mezi vzorky v čistém extrakčním pufu či ve vodě. Sebrané extrakty vysušíme buď v lyofilizátoru nebo ve SpeedVacu. V případě sušení ve SpeedVacu je lepší použít maximální vakuum (V-HV) a teplotu 30 °C, jinak sušení trvá neúměrně dlouho. Vysušené extrakty je možno uchovávat v mrazáku po dobu několika týdnů.

**8) ANALÝZA:** Extrakty znovu rozpustíme ve 25  $\mu$ l 1% kyseliny mravenčí, pomůžeme si při tom sonikací (cca 5-10 min) a eppendorfky zcentrifugujeme. Poté vzorky pozorně přenášíme Hamiltonkou do předem připravených vialek s novými inzerty. Přenášíme objem cca 20  $\mu$ l a snažíme se při tom nenasát zespoda případné nečistoty či kousky gelu, které mohou zůstat dole u dna eppendorfky. Hamiltonku mezi vzorky pečlivě čistíme v 0.1 % kys. mravenčí. Vialky se vzorkem nyní můžeme uchovávat zamražené (při -20°C nebo ještě lépe -80°C) po dobu několika týdnů do doby změření. Těsně před měřením necháme vialky rozmrazit, ještě jednou je pro jistotu zatočíme v centrifuze, aby se případné zbytky nečistoty ve vzorku usadily, vložíme je do autosampleru a těšíme se na výsledky.