

Příprava vzorku na MS analýzu

Štěpení trypsinem	1
Odsolení vzorků	2
Nanesení na destičku	2
Chemikálie a roztoky	3
Poznámky	4

Pracovat pouze v nitrilových rukavicích. Nikdy nepoužívat latexové nebo pudrované.

Před prací očistit desku pracovního stolu lihometanolem.

Používat pouze zkumavky Eppendorf nebo Axygen.

Pracovat raději ve skle než v plastech.

Kádinky a zkumavky před prací opláchnout. Omezí se případné znečištění vzorku prachem, detergenty, apod.

Štěpení trypsinem

- 1) Vyříznout band z gelu (pouze obarvenou část) a vložit do 0.5 ml mikrozkušavky.
- 2) Gel rozdělit na části (cca 1 mm³).
- 3) Přidat 100 µl 50mM hydrogenuhličitanu amonného s 40% ACN, nechat míchat v termomixéru 15-30 min při 30 °C, poté roztok odstranit (v případě stříbření přidat 100 µl 30mM K₃[Fe(CN)₆] + 100mM Na₂S₂O₃ v poměru 1:1).
- 4) Opakovat předchozí krok do úplného odbarvení.
- 5) Přidat 100 µl acetonitrilu, 2-5 min vortexovat, poté roztok odstranit.
- 6) Redukovat cysteiny přidáním 100 µl 10mM DTT v 50mM hydrogenuhličitanu amonném, míchat v termomixéru 45 min při 57 °C, poté roztok odstranit.
- 7) Blokovat cysteiny přidáním 100 µl 55mM jodacetamidu v 50mM hydrogenuhličitanu amonném, míchat v termomixéru 25 min při 25 °C ve tmě, poté roztok odstranit.
- 8) Přidat 100 µl 50mM hydrogenuhličitanu amonného, nechat míchat v termomixéru 15 min při laboratorní teplotě, poté roztok odstranit. Opakovat 3×.
- 9) Přidat 100 µl acetonitrilu, 2-5 min vortexovat, poté roztok odstranit.
- 10) Vysušit zbytky acetonitrilu ve vakuové centrifuze (není nutné).
- 11) Přidat 10 µl štěpícího enzymu.

- 12) Pro jeden vzorek na ledě smíchat 1.0 µl trypsinu (koncentrace 0.2 µg/µl v dodaném pufru) s 9.0 µl vychlazené ultračisté vody. Připravit pro všechny vzorky najednou a pak jen odebírat 10 µl pro jeden vzorek. Gel do sebe tekutinu vsákne. Nasáklý gel převrstvit dle potřeby 50mM hydrogenuhličitanem amonným (snažíme se o co nejmenší objem => 20-30 µl), aby byl gel během štěpení pořád v roztoku.
- 13) Nechat štěpit přes noc při 37 °C za občasného míchání v termomixéru.
- 14) Druhý den obsah mikrozkušavky krátce centrifugovat (stáhnout kapky z kondenzované na víčku).
- 15) Extrahovat na tři výtřepky. Nejdříve 40% ACN s 1% TFA, druhý 60% ACN s 1% TFA a třetí 80% ACN s 1% TFA. (15 minut při laboratorní teplotě).
- 16) Spojené výtřepky odpařit do sucha.

Odsolení vzorků

- 1) Odsolení vzorků na kolonkách Empore™ C18-SD SPE Cartridges.
- 2) Kolonku promýt methanolem (500 µl). Až přestane odkapávat, promýt pufrům A.
- 3) Promýt 500 µl pufru A (5% ACN + 0.1% TFA). Až přestane odkapávat, nanést vzorek.
- 4) Odparek rozpustit v 500 µl pufru A a nanést na kolonku. Kolonku doplnit pufrům A až po okraj, aby byla jistota, že nic ze vzorku nezůstane na stěně kolonky. Od této chvíle matrice kolonky NESMÍ oschnout!!! Po prokapání, kolonku ještě jednou doplnit pufrům A až po okraj pro lepší odsolení.
- 5) Odsolený vzorek eluovat 300 µl pufru B (80% ACN + 0.1% TFA). Eluát sbírat do nové čisté zkumavky.
- 6) Odpařit eluát do sucha.

Nanesení na destičku

- 1) Odparek rozpustit v 25 µl pufru A.
- 2) 2.5 µl vzorku smíchat v poměru 1:1 s matricí (α-kyano-hydroxyskořičová kyselina => 5 mg/ml v 50% ACN + 0.1% TFA).
- 3) Tuto směs nanášet po 0.8 µl na destičku.

Chemikálie a roztoky

50mM hydrogenuhličitan amonný

39.53 mg hydrogenuhličitanu amonného rozpustit v 10 ml ultračisté vody.

10mM dithiotreitol (DTT) (připravovat v čas potřeby)

0.154 mg DTT rozpustit ve 100 µl ultračisté vody. Celkový objem dle počtu vzorků.

55mM jodoacetamid (připravovat v čas potřeby)

1.017 mg jodoacetamidu rozpustit ve 100 µl ultračisté vody. Celkový objem dle počtu vzorků.

Pufr A – 5% ACN + 0.1% TFA

5 ml acetonitril (ACN)

0.1 ml trifluoroctová kyselina (TFA)

94.9 ml ultračistá voda

Pufr B – 80% ACN + 0.1% TFA

8 ml acetonitril (ACN)

0.01 ml trifluoroctová kyselina (TFA)

1.99 ml ultračistá voda

Poznámky



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Publikace je spolufinancovaná Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky. Registrační číslo projektu: CZ.1.07/2.3.00/20.0235, název projektu: TEAB.