

GEBRAUCHSANLEITUNG

Endoproteinase Glu-C

Endoproteinase für Proteomics

Art.-Nr. 20984



SERVA Electrophoresis GmbH • Carl-Benz-Str. 7 • D-69115 Heidelberg
Telefon: +49-6221-138400 • E-Mail: info@serva.de • Internet: www.serva.de

Inhalt

1. Allgemeine Informationen	1
1.2. Rekonstitution des Enzyms	1
1.3. Lagerung	1
2. Protokolle	1
2.1. Optionale Reduktion und Alkylierung der Proteinprobe	1
2.2. Proteinverdau in Lösung	1
2.3. Proteinverdau im Gel	2
2.4. In-gel Probenextraktion	3

1. Allgemeine Informationen

Endoproteinase Glu-C (V8) aus *Staphylococcus aureus* V8 und rekombinant in *E. coli* hergestellt, ist eine Serinendoproteinase. Glu-C ist für Anwendungen im Bereich Proteomics geeignet.

Die Enzymspezifität ist hauptsächlich vom pH und der Zusammensetzung des Reaktionspuffers abhängig. In Gegenwart von Phosphat-Puffern (pH 7,8), spaltet Glu-C sowohl Glutamyl- als auch Asparagyl-Bindungen. Ammoniumbicarbonat-Puffer (pH 7,8) führt zur bevorzugten Spaltung von Glutamyl-Bindungen.

Befinden sich auf der Carboxyseite der Peptidbindung Prolinreste, kommt es zur Inhibition der Spaltungsreaktion.

Die hohe Spezifität mit der Glu-C Peptidbindungen spaltet wird z.B. bei Peptide Mapping und Proteinsequenzierung genutzt.

1.2. Rekonstitution des Enzyms

Das Lösen des Enzyms erfolgt gemäß den unten aufgeführten Protokollen.

1.3. Lagerung

Die Lagerung des lyophilisierten Glu-C erfolgt bei -20 °C oder -80 °C. Das gelöste Enzym kann bei -20 °C 4 Wochen gelagert werden.

2. Protokolle

2.1. Optionale Reduktion und Alkylierung der Proteinprobe

- Reduktion der Disulfidbindungen durch Zugabe von 50 mM Dithiothreitol (DTT) in 50 mM Ammoniumbicarbonat und 1 h Inkubation bei 55 °C.
- Alkylierung der Disulfidbindungen erfolgt durch Zugabe von 250 mM Jodacetamid/ 50 mM Ammoniumbicarbonat und 1 h Inkubation bei RT im Dunkeln.

2.2. Proteinverdau in Lösung

1. Rekonstitution von 1 Vial Enzym in 500 µL bidest. Wasser (Endkonzentration: 100 ng/µL).
2. 5 µL rekonstituiertes Enzym (100 ng/µL; siehe 1.) werden mit 95 µL 1x Digest-Puffer versetzt (Endkonzentration: 5 ng/µL).

Das spezifische Volumen bzw. Enzymkonzentration kann entsprechend der Probenzahl und der Proteinkonzentration angepasst werden.
Das Verhältnis von Enzym zu Protein sollte zwischen 1:20 und 1:100 liegen.

3. Das rekonstituierte Enzym kann in Aliquots bei -20 °C bis -80 °C gelagert werden.
4. Zugabe des 1:20 verdünnten Enzyms (siehe 2.) zur Proteinprobe (Enzym zu Protein-Verhältnis 1:20 bis 1:100). Anschließend vorsichtig mischen.
5. Inkubation der Lösung bei 37 °C zwischen 2 und 14 h (über Nacht).

2.3. Proteinverdau im Gel

1. Mit Hilfe einer Rasierklinge oder eines Skalpells wird die entsprechende Proteinbande aus dem Gel geschnitten und in 1 mm x 1 mm große Stücke zerkleinert.
2. Die Gelstücke werden mit 50 µL 1x Digest-Puffer gewaschen.
3. Der Digest-Puffer wird durch 50 µL Acetonitril ersetzt und anschließend 5 min bei RT zur Dehydrierung der Gelstücke inkubiert.
4. Trocknen der Gelstücke mit einer SpeedVac (oder Gefriertrockner).
5. Zugabe von 50 µL 10 mM DTT in 1x Digest-Puffer und Inkubation der Probe 1 h bei 56 °C.
6. Nach dem Abkühlen der Probe auf RT wird die DTT-Lösung durch 50 µL 250 mM Jodacetamidlösung in 1x Digest-Puffer ersetzt. Anschließend wird die Probe 1 h bei RT inkubiert.
7. Entfernen der Jodacetamidlösung.
8. Zugabe von 50 µL Acetonitril und 5 min Inkubation bei RT.
9. Entfernen des Acetonitrils und trocknen der Gelstücke mit einer SpeedVac (oder Gefriertrockner).
10. Rekonstituieren des Enzyms durch Zugabe von 250 µL dest. H₂O oder 10 mM Essigsäure (Endkonzentration Glu-C: 100 ng/µL). Nicht benötigtes rekonstituiertes Enzym sollte schnellstmöglich in Aliquots bei -20 °C bis -80 °C tiefgefroren werden.
11. 10 µL des rekonst. Enzyms (siehe 10.) werden mit 90 µL 1x Digest-Puffer versetzt (Endkonzentration Glu-C: 10,0 ng/µL). Bis zum Gebrauch auf Eis lagern.
12. Zugabe von 50 µL der Enzymlösung (siehe 11.) zu den getrockneten Gelstücken und anschließend 45 min Inkubation auf Eis.

13. Entfernen der Enzymlösung von den Gelstücken und Zugabe von 50 µL 1x Digest-Puffer. Inkubation bei 37 °C über Nacht.

2.4. In-gel Probenextraktion

1. Nach dem Proteinverdau im Gel, wird der 1x Digest-Puffer von den Gelstücken entfernt und in ein anderes Reaktionsgefäß überführt.
2. Waschen der Gelstücke durch Zugabe von 50 µL 1x Digest-Puffer und Überführen der Waschlösung in das Reaktionsgefäß (siehe 1.).
3. Zugabe von 50 µL 50 % (v/v) Acetonitril / 5 % (v/v) Ameisensäure zu den Gelstücken und 5 min Inkubation bei RT zum Dehydrieren der Gelstücke. Die Lösung wird dann entfernt und ebenfalls in das Reaktionsgefäß (siehe 1.) gegeben.
4. Rehydratisieren der Gelstücke durch Zugabe von 50 µL 1x Digest-Puffer und anschließende 5 minütige Inkubation. Dann wird der Digest-Puffer entfernt und ebenfalls in das Reaktionsgefäß (siehe 1.) überführt.
5. Wiederholung von Punkt 3.
6. Wiederholung von Punkt 4.
7. Wiederholung von Punkt 3.
8. Wiederholung von Punkt 4.
9. Zugabe von 50 µL 100 % (v/v) Acetonitril zu den Gelstücken und 5 min Inkubation bei RT zum Dehydrieren der Gelstücke. Die Lösung wird dann entfernt und ebenfalls in das Reaktionsgefäß (siehe 1.) gegeben.
10. Unter Verwendung einer SpeedVac oder eines Gefriertrockners wird der Inhalt des Reaktionsgefäßes getrocknet und kann für weitere Analysen bei -20 °C bis -80 °C gelagert werden.