

# Bedienungsanleitung Instruction Manual

## **Endoproteinase Glu-C**

Endoproteinase for proteomics



# **GEBRAUCHSANLEITUNG**

## **INSTRUCTION MANUAL**

---

### **Endoproteinase Glu-C**

**Endoproteinase für Proteomics**  
**Endoproteinase for proteomics**  
**(Kat.-Nr./Cat. No. 20984.01)**



**Carl-Benz-Str. 7, D-69115 Heidelberg**  
Phone +49-6221-138400, fax +49-6221-1384010



## **Inhalt**

<b>1. Allgemeine Informationen</b>	<b>5</b>
1.2. Rekonstitution des Enzyms	5
1.3. Lagerung	5
<b>2. Protokolle</b>	<b>5</b>
2.1. Optionale Reduktion und Alkylierung der Proteinprobe	5
2.2. Proteinverdau in Lösung	5
2.3. Proteinverdau im Gel	6
2.4. In-gel Probenextraktion	7

## Contents

<b>1. General information</b>	<b>12</b>
1.1. Reconstitution of the enzyme	12
1.2. Storage	12
<b>2. Protocols</b>	<b>12</b>
2.1. Optional	12
2.2. In-solution digest	12
2.3. In-gel digest	13
2.4. In-gel sample extraction	14

# 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. H<sub>2</sub>O 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.



# GEBRAUCHSANLEITUNG

# INSTRUCTION MANUAL

---

## Endoproteinase Glu-C

Endoproteinase für Proteomics  
Endoproteinase for proteomics  
(Kat.-Nr./Cat. No. 20984.01)



**Carl-Benz-Str. 7, D-69115 Heidelberg**  
phone +49-6221-138400, fax +49-6221-1384010



## **Contents**

<b>1. General information</b>	<b>12</b>
1.1. Reconstitution of the enzyme	12
1.2. Storage	12
<b>2. Protocols</b>	<b>12</b>
2.1. Optional	12
2.2. In-solution digest	12
2.3. In-gel digest	13
2.4. In-gel sample extraction	14

## 1. General information

Endoproteinase Glu-C (V8) from *Staphylococcus aureus* V8 and recombinantly produced in *E. coli* is a serine endoproteinase. Glu-C is suitable for proteomics applications.

The specificity of Glu-C is primarily determined by the buffer pH and composition. Using phosphate buffers (pH 7.8), Glu-C will cleave at both glutamyl and aspartyl bonds. Ammonium bicarbonate buffer (pH 7.8) will lead to a preferential cleavage of glutamyl bonds.

The presence of proline residues on the carboxy side of the peptide bond inhibits the cleavage.

Due to its highly specific cleavage of peptides Glu-C is used in proteomics for peptide mapping and protein sequence work.

### 1.1. Reconstitution of the enzyme

Dissolve the enzyme according to the protocols below.

### 1.2. Storage

Lyophilized enzyme can be stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  or  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Reconstituted enzyme can be stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 4 weeks.

## 2. Protocols

### 2.1. Optional

- Reduce the disulfide bonds of a protein sample by incubating the protein sample in a solution of 50 mM dithiothreitol (DTT) in 50 mM ammonium bicarbonate for 60 min at  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- Alkylate the disulfide bonds of a protein sample by incubating the protein sample in a solution of 250 mM iodoacetamide / 50 mM ammonium bicarbonate for 60 min at room temperature in the dark.

### 2.2. In-solution digest

1. Reconstitute 1 vial of lyophilized enzyme in 500  $\mu\text{L}$  of deionized water to make a 100 ng/ $\mu\text{L}$  solution.
2. Prepare a 5 ng/ $\mu\text{L}$  enzyme in Digestion Buffer solution by combining 5  $\mu\text{L}$  of the 100 ng/ $\mu\text{L}$  enzyme solution (from Step 1.) with 95  $\mu\text{L}$  1x Digestion Buffer. The specific volumes and concentration can be adjusted for sample numbers and/or quantity of protein in the sample. A final enzyme to protein ratio of 1:20 to 1:100 is recommended.

3. Freeze any unused volume of reconstituted enzyme at -20 °C to -80 °C.
4. Combine the 5 ng/μL enzyme in Digestion Buffer solution (prepared in Step 2 above) with the protein sample (in 1x Digestion Buffer) at a 1:20 to 1:100 (w/w) enzyme to protein ratio. Mix gently.
5. Incubate at 37 °C for a duration between 2 h and overnight for digestion.

### **2.3. In-gel digest**

1. Using a razor blade or hobby knife, cut the protein band of interest out of the gel and then dice the band into 1 mm x 1 mm pieces.
2. Rinse gel pieces with 50 μL of 1x Digestion Buffer.
3. Replace the Digestion Buffer with 50 μL acetonitrile and incubate at room temperature for 5 min to dehydrate the gel pieces.
4. Dry down gel pieces in SpeedVac (or lyophilizer).
5. Add 50 μL of 10 mM DTT in 1x Digestion Buffer and incubate samples for 1 h at 56 °C.
6. Cool to room temperature and using a micropipettor, replace DTT solution with 50 μL 250 mM iodoacetamide in 1x Digestion Buffer. Incubate samples at RT for 1 h.
7. Remove iodoacetamide solution with micropipettor.
8. Add 50 μL acetonitrile to gel pieces and incubate at room temperature for 5 min to dehydrate the gel pieces.
9. Remove acetonitrile with micropipettor and dry gel pieces in SpeedVac or lyophilizer.
10. Reconstitute the lyophilized enzyme in 250 μL of deionized water or 10 mM acetic acid to achieve a final concentration of 100 ng/μL. If only a small amount of enzyme is required for the experiment, aliquot the reconstituted enzyme into smaller volumes and immediately freeze and store at -20 to -80 °C.
11. Combine 10 μL of the 100 ng/μL reconstituted enzyme (prepared above, Step 10) with 90 μL of 1x Digestion Buffer to achieve a final concentration of 10.0 ng/μL. Place on ice until ready to use.
12. Add 50 μL of the 10 ng/μL enzyme solution (prepared above, Step 11) to the dried gel pieces and incubate on ice for 45 min.
13. Remove the 10 ng/μL enzyme solution from the gel pieces with a micropipettor

and replace with 50  $\mu$ L of 1x Digestion Buffer. Incubate overnight at 37 °C.

## **2.4. In-gel sample extraction**

1. After performing in-gel digestion, remove the 1x Digestion Buffer from the gel pieces and collect in a clean vial (collection vial).
2. Add 50  $\mu$ L of 1x Digestion Buffer to rinse the gel pieces. Remove the Digestion Buffer from the gel pieces and add it to the collection vial.
3. Add 50  $\mu$ L of 50% acetonitrile / 5% formic acid solution to the gel pieces and incubate for 5 minutes at room temperature to dehydrate the gel pieces. Then, remove this solution from the gel pieces and add it to the collection vial.
4. Rehydrate the gel pieces by adding 50  $\mu$ L of Digestion Buffer to the gel pieces and let incubate for 5 min. Then, remove the Digestion Buffer from the gel pieces and add it to the collection vial.
5. Repeat step 3.
6. Repeat step 4.
7. Repeat step 3.
8. Repeat step 4.
9. Repeat step 3.
10. Using a SpeedVac or lyophilizer, dry the collection vial and store at -20 to -80 °C for subsequent analysis.







# SERVA

Electrophoresis

Headquarters  
SERVA Electrophoresis  
GmbH  
Carl-Benz-Str. 7  
D-69115 Heidelberg  
Germany

E-Mail: [info@serva.de](mailto:info@serva.de)  
Internet: [www.serva.de](http://www.serva.de)

## German Customers

To place orders  
Phone: 06221-13840-0  
Fax: 06221-13840-10

Customer Care  
Phone: 06221-13840-46  
Fax: 06221-13840-10

Technical Service  
Phone: 06221-13840-44  
Fax: 06221-13840-54  
E-Mail: [tech.service@serva.de](mailto:tech.service@serva.de)

## International Customers

To place orders  
Please contact your local  
Distributor  
(please visit [www.serva.de](http://www.serva.de))

Customer Care  
Phone: +49 6221-13840-47  
Fax: +49 6221-13840-10

Technical Service  
Phone: +49 6221-13840-44  
Fax: +49 6221-13840-54  
E-Mail: [tech.service@serva.de](mailto:tech.service@serva.de)

