

PRODUKT INFORMATION

Lysyl Endopeptidase® MS geprüft

Art.-Nr. 20987

Produktbeschreibung:

Allgemeines Lysyl Endopeptidase® (LysC) spaltet spezifisch die Peptidbindung an der C-terminalen Seite von Lysin (Lys)-Resten.

Anwendung LysC MS ist für den Verdau von Proteinen vor der Massenspektrometrie-Analyse geprüft.

Eigenschaften

- Äußeres Erscheinungsbild: Lyophilisat mit 2 mM Tris/HCl, pH 8,0
- Molekulargewicht: 27.000 (Gelfiltration), 30.000 (SDS PAGE)
- Löslichkeit: Löslich in Wasser oder Pufferlösungen
- Optimaler pH-Wert: 9,0 - 9,5 (Amidase-Aktivität)
- Isoelektrischer Punkt: 6,9 - 7,0
- Inhibitoren: Diisopropylfluorophosphat (DFP), Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), N α -Tosyl-L-Lysinchloromethylketonhydrochlorid (TLCK)

Lagerungsbedingungen LysC MS sollte trocken und bei -15 °C bis -25 °C (lichtgeschützt) gelagert werden.

Anleitung:

Verdauung von Proteinen in Lösung Rekonstitution von LysC:
Lyophilisiertes, MS geprüftes LysC wird in 50 mM Tris/HCl pH 8,5 rekonstituiert (Endkonzentration von 1,0 μ g/ml).
Für den Verdau des Zielproteins LysC in einem Endverhältnis von 1:100 bis 1:20 (w/w) Protease:Protein zugeben

In-Gel Protein- Verdau

Rekonstitution von LysC

Lyophilisiertes, MS geprüftes LysC wird in 50 mM Tris/HCl, pH 8,5 bis zu einer Endkonzentration von 10 µg/ml rekonstituiert.

Probenvorbereitung:

- Schneiden Sie nach der Elektrophorese die Proteinbande aus dem Gel aus und entfärben Sie die Gelstücke.
- Geben Sie 300 µl Acetonitril (ACN) in ein Reaktionsgefäß und inkubieren Sie die Gelstücke 30 Minuten lang unter Schütteln auf einem Mixer zur Dehydratisierung.
- Nehmen Sie das überschüssige ACN ab und trocknen Sie die Probe 15 Minuten lang im Vakuum.
- Proteinreduktion:
100 µl 10 mM DTT in 100 mM NH₄HCO₃ zugeben und 1 h bei 56 °C inkubieren.
- Lassen Sie die Probe auf Raumtemperatur abkühlen und entfernen Sie die DTT-Lösung.
- 100 µl 50 mM Iodoacteamid in 100 mM NH₄HCO₃ zugeben und 45 min im Dunkeln unter gelegentlichem Vortexen inkubieren.
- Waschen Sie die Gelstücke 10 min mit 100 µl 100 mM NH₄HCO₃.
- 300 µl ACN zugeben und 15 min inkubieren.
- ACN entfernen, 100 µl 100 mM NH₄HCO₃ zugeben und inkubieren 15 min.
- Lösung entfernen, 300 µl ACN zugeben und 15 min inkubieren.
- ACN entfernen und das Gelstück 15 Minuten lang vakuumtrocknen.
- 100 µl LysC-Lösung (10 µg/ml) zugeben und 45 min auf Eis inkubieren.
- LysC-Lösung entfernen, 10 µl 50 mM Tris/HCl, pH 8,5, hinzufügen und die Gelstücke über Nacht bei 37 °C inkubieren.
- Extrahieren Sie die Peptide, indem Sie die Gelstücke 20 min mit 50 µl 20 mM NH₄HCO₃ schütteln.
- Extrahieren Sie die Peptide durch 3x 20-minütiges Schütteln der Gelstücke mit 5 % (v/v) Ameisensäure in 50 % (v/v) ACN.
- Falls erforderlich, konzentrieren Sie die Peptide durch Vakuumtrocknung, z. B. mit SpeedVac.
- Entsalzen und reinigen Sie die Peptide mit ZipTip® auf.
- Falls erforderlich, konzentrieren Sie die Peptide mit schwachem Vakuum auf 2 µl.
- Fügen Sie die Matrix hinzu und analysieren Sie sie mittels Massenspektrometrie.