

Digestion trypsique en solution

Ce protocole a fait l'objet d'optimisations et est actuellement utilisé en routine au sein de la plateforme de spectrométrie de masse et protéomique de l'IBPS, UPMC.

Matériel

- Tampon bicarbonate d'ammonium NH_4HCO_3 (MM= 79 g/mol), 50mM, pH 8. Stock de **tampon de bicarbonate d'ammonium NH_4HCO_3** conservé à -20°C , aliquots de 1mL à 100mM.
-
- DTT (Dithiothreitol, agent réducteur), ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{S}_2\text{O}_2$, MM = 154.25 g/mol), solution 45 mM dans du tampon NH_4HCO_3 50mM, pH 8. Stock de **DTT** en solution dans H_2O , conservés à -20°C , aliquots de 5 μL à 1M.
-
- IAA (Iodoacétamide, agent alkylant), ($\text{C}_2\text{H}_4\text{INO}$, MM = 184.96 g/mol), solution 100 mM dans du tampon NH_4HCO_3 50mM, pH 8. Stock **d'iodoacétamide (IAA)** dans des tubes opaques, protégés de la lumière, aliquots en poudre en quantité variable, conservés à -20°C .
-
- Trypsine 3%, masse/masse. Stock de **trypsine Gold mass spectrometry grade PROMEGA ou trypsine SIGMA**, en solution dans une solution de HCl à 0.01M (pour éviter l'autolyse éventuelle de la trypsine), aliquots de 10 μL à 0.1 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, ou 10 μL 1 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, conservés à -20°C .

Protocole

1. 60-80 μg de protéine (poudre)
2. Ajouter 20 μL de tampon NH_4HCO_3 , 50mM, pH 8.
3. Ajouter 5 μL de DTT 45 mM.
4. Incuber 15 min/ 50°C
5. Remettre l'échantillon à température ambiante avant d'ajouter 5 μL d'IAA, 100 mM.
6. Incuber 15min/température ambiante/dans le noir.
7. Ajouter la trypsine 3% masse/masse (soit 3 μg de trypsine pour 100 μg de protéine)
8. Incuber 24h/ 37°C .