

AGRO-BIO

EnzyBeads™ Chymotrypsine

Version 2007/01

FR

Réactif / Reagent EnzyBeads™ Chymotrypsine 20

Composition :

- 2 fl., EnzyBeads™ Chymotrypsine 10 digestions, prêts à l'emploi

Réf. MT03205

1- DESCRIPTION DU PRODUIT

Le kit de digestion **EnzyBeads™ Chymotrypsine** est utilisé pour la digestion des protéines, en vue de l'identification des protéines et des études de séquençage (**Enzymes de digestion complémentaires - MSG-Trypsine™** (Agro-Bio réf 786-245 et 786-245B), **MSG-Lysine-C™** (Agro-Bio réf 786-14), etc...). La Chymotrypsine est une endoprotéase qui hydrolyse les liaisons peptidiques dans lesquelles un acide aminé aromatique (tyrosine, tryptophane, et phénylalanine) engage sa fonction acide. Les peptides générés sont détectables en spectrométrie de masse. L'activité enzymatique de la chymotrypsine est optimale dans un tampon à pH 7,8.

Les **EnzyBeads™ Chymotrypsine** sont capables de digérer aussi bien de faibles quantités (de l'ordre de quelques nanogrammes) que d'importantes quantités de protéines. La limite basse de digestion par les **EnzyBeads™ Chymotrypsine** est imposée par la limite de détection des peptides dans une application donnée.

2- COMPOSITION

- **EnzyBeads™ Chymotrypsine** : 2 flacons contenant une suspension de billes paramagnétiques avec Chymotrypsine immobilisée (Chymotrypsine bovine traitée TLCK 1-chloro-3-tosylamido-7-amino-2-heptanone, inhibant toute activité trypsique).

3- PRECAUTIONS

- Conservés à 2-8°C sous leur état d'origine, les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur le kit ou le réactif.
- L'élimination des déchets sera effectuée conformément à la réglementation locale en vigueur.

4- PREPARATION ET STABILITE DES REACTIFS

Tous les réactifs doivent être maintenus pendant 30 minutes à température ambiante (18-25°C) avant leur utilisation.

Utiliser de l'eau dé-ionisée (Eau milliQ purifiée, conductivité 18,2 mΩ.cm⁻¹ à TA, filtrée 0,2µm)

- **EnzyBeads™ Chymotrypsine** : Réactif prêt à l'emploi, à conditionner en Tampon de Digestion juste avant digestion (cf paragraphe 6.2).
Ce réactif est stable 1 mois à 2-8°C après ouverture, en dehors de toute contamination.

5- REACTIFS ET MATERIELS SUPPLEMENTAIRES NECESSAIRES ET NON FOURNIS

Réf.	Réactifs et matériels non fournis pour certains kits	Réactifs et matériels non fournis
MT03205	<ul style="list-style-type: none"> • Aimant EnzyBeads™ Magnet (Agro-Bio réf MT00110) 	<ul style="list-style-type: none"> • Tampon de digestion conseillé : carbonate d'ammonium 25 mM pH ≈ 8 (pH non modifié). Préparer 15 mL de carbonate d'ammonium pour 1 flacon d'EnzyBeads™ Chymotrypsine 10 digestions. • Microtubes à centrifuger ou tous microtubes compatibles avec l'aimant. • Pipettes ajustables pour volume de 5 µL à 200 µL. • Cônes jetables. • Eau dé-ionisée (Eau milliQ purifiée, conductivité 18,2 mΩ.cm⁻¹ à TA, filtrée 0,2µm). (Proteomic Grade Water - Agro-Bio ref 786-229).

6- PROTOCOLE**6.1 Préparation de l'échantillon**

Pour obtenir l'identification des protéines, trois paramètres sont à prendre en considération :

- **Nature de la solution protéique à digérer**

La digestion enzymatique de la plupart des protéines est facilitée par la dénaturation et la réduction des ponts disulfures. La réduction/alkylation (**FOCUS™ Protein Reduction-Alkylation**, Agro-Bio réf 786-231) des protéines permet leur dénaturation, la réduction des ponts disulfures et l'alkylation des groupements –SH libres.

- **Technique de détection des peptides**

La détection des peptides issus de la digestion dépend de l'appareil d'analyse utilisé. Pour une bonne détection des peptides, le paramétrage de l'appareil de mesure doit être optimisé.

- **Concentration de la solution protéique**

La concentration de la solution protéique est importante puisqu'elle conditionne également la détection des peptides obtenus (cf paragraphe 7, tableau 1 : résultats de digestion par les **EnzyBeads™ Chymotrypsine**). Une solution protéique trop faiblement concentrée donnera peu de peptides de digestion qui seront difficilement détectables. La solution protéique ou des peptides issus de la digestion peuvent être concentrés. (**Tube-O-dialyzer™** et **UPPA-PROTEIN-Concentrate™**, Agro-Bio réf 786-142 et réf 786-120).

6.2 Protocole de digestion

1. Conditionnement du réactif EnzyBeads™ Chymotrypsine

- Bien homogénéiser le réactif **EnzyBeads™ Chymotrypsine** par aspiration et refoulement.
 - Prélever 25 µL de la suspension dans un microtube de 0,5 mL en évitant les parois du tube.
 - Appliquer la paroi du tube pendant environ 20 secondes contre l'aimant **EnzyBeads™ Magnet**.
 - Maintenir le tube sur l'aimant **EnzyBeads™ Magnet** et retirer le surnageant.
 - Hors champ magnétique, resuspendre par aspiration et refoulement les billes dans 100 µL de tampon de digestion préalablement préparé. Appliquer la paroi du tube pendant environ 20 secondes contre l'aimant **EnzyBeads™ Magnet**.
 - Maintenir le tube sur l'aimant **EnzyBeads™ Magnet** et retirer le surnageant.
- Répéter ce lavage deux fois et éliminer le surnageant.

2. Digestion

- Pipeter de 5 µL à 100 µL de la solution protéique, de préférence préparée en tampon de digestion. Le volume optimal préconisé est de 50 µL.
- Hors du champ magnétique, déposer directement la solution protéique à digérer dans le microtube contenant le culot de billes. Homogénéiser le mélange de la solution protéique et des billes par aspiration et refoulement.
- Laisser digérer **au minimum** 15 minutes à température ambiante (18-25°C), hors champ magnétique. Certaines protéines difficiles à digérer peuvent nécessiter un temps de digestion plus long. Il est nécessaire dans ce cas d'effectuer des essais préliminaires pour déterminer le temps optimal de digestion.

3. Arrêt de la digestion

- Stopper la réaction de digestion en insérant le tube dans un logement de l'aimant **EnzyBeads™ Magnet**.
- Maintenir le tube sur l'aimant **EnzyBeads™ Magnet** et pipeter la solution de digestion contenant les peptides de digestion dans un tube propre, en évitant de prélever des billes. Si des billes ont été prélevées accidentellement, refouler la totalité de la solution prélevée et renouveler l'étape 3.

Les produits de digestion peuvent alors être directement analysés en spectrométrie de masse.

Le protocole de digestion est également compatible avec toute autre méthode utilisée en préparation d'échantillons.

7- RESULTATS

• Exemples de digestions de protéines pures :

Digestions réalisées selon le protocole **EnzyBeads™ Chymotrypsine**, 15 minutes à 18-25°C. Détection avec un spectromètre de masse Autoflex II TOF/TOF (Bruker-Daltonics GmbH, Bremen, All.).

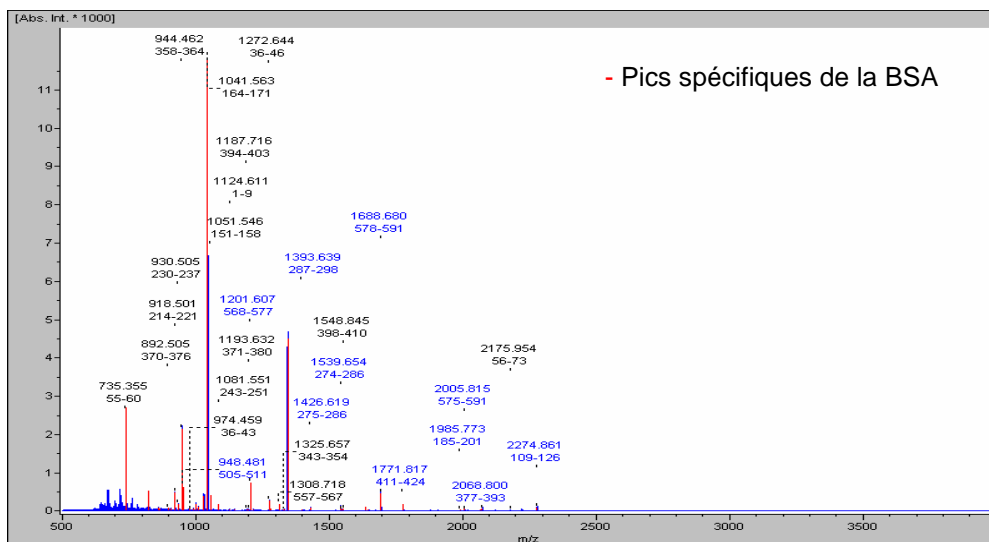
Protéines digérées	Concentration (en mg/mL)	Quantité détectée (en pmol)	Volume digéré (en µL)	Nbre de peptides	Score	Pourcentage de recouvrement
Transferrine 77 kDa	0,5	2,3	5	21	68	27 %
Ovalbumine 42,8 kDa	0,5	4,2		16	97	40 %
Sérum Albumine Bovine (BSA) 66 kDa	0,03	0,15		36	108	46 %
Anhydrase carbonique II 29 kDa	0,5	6,15		10	80	33%

Tableau 1 : Résultats de digestion par les EnzyBeads™ Chymotrypsine

- Spectre de digestion de Sérums Albumine Bovine (BSA) :**

Digestion réalisée selon le protocole **EnzyBeads™ Chymotrypsine**, 15 minutes à 18-25°C. Détection avec un spectromètre de masse Autoflex II TOF/TOF (Bruker-Daltonics GmbH, Bremen, All.).

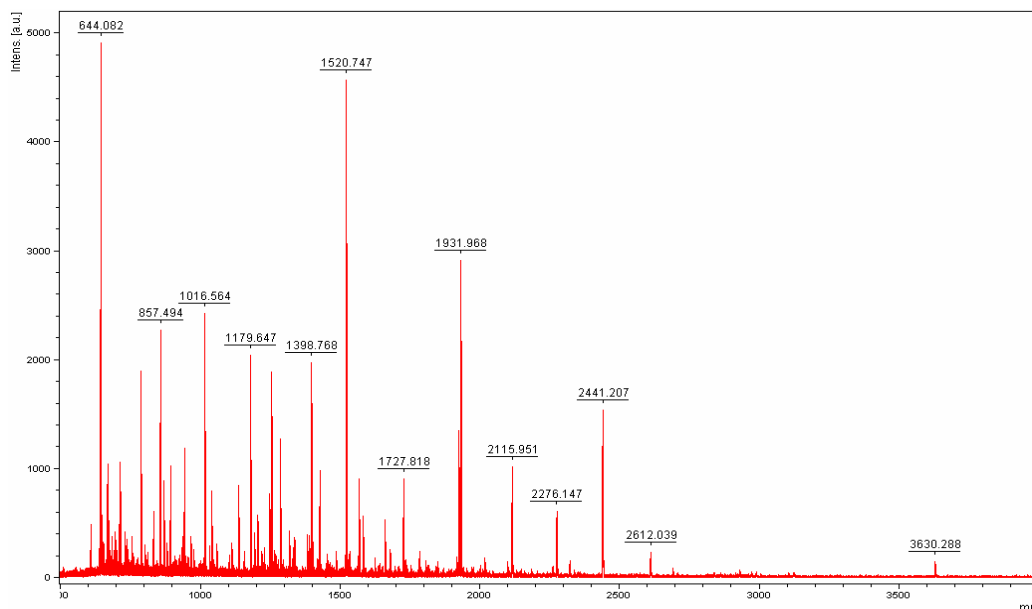
La séquence de la BSA est recouverte à 46% avec 36 peptides détectés (cf spectre1 : spectre de masse MALDI d'un digest de BSA).



Spectre 1 : Spectre de masse MALDI d'un digest de BSA

- Spectre de digestion d'échantillons complexes :**

Un sérum humain (20 µL) est décomplexifié par chromatographie hydrophobe sur des billes C8. Puis 5µL de l'éluat sont digérés selon le protocole **EnzyBeads™ Chymotrypsine**, 15 minutes à 18-25°C. Détection avec un spectromètre de masse Autoflex II TOF/TOF (Bruker-Daltonics GmbH, Bremen, All.).



Spectre 2 : Spectre de masse MALDI d'un digest de sérum

8- SUPPORT TECHNIQUE

Problèmes	Causes possibles	Suggestions
Absence ou faible détection des peptides digérés	Trop faible quantité de protéine	Concentrer l'échantillon à digérer (Tube-O-dialyzer™ Agro-Bio réf 786-142, UPPA-Protein™ Concentrate , Agro-Bio réf 786-120)
		Augmenter le volume de la prise d'essai d' EnzyBeads™ Chymotrypsine et/ou le temps de digestion.
		Incuber l'échantillon à digérer et le réactif EnzyBeads™ Chymotrypsine à 37°C.
	Concentrer le surnageant de digestion (Billes C18, ZipTip ...).	
	Présence d'inhibiteurs de la Chymotrypsine	Changer le tampon contenant la solution protéique par dialyse (Tube-O-dialyzer™ , Agro-Bio réf 786-142), par tamisage moléculaire, par diafiltration...
	Présence de billes dans les produits de digestion, perturbant la cristallisation du dépôt sur cible	Utiliser l' EnzyBeads™ Magnet (Agro-Bio réf MT00110) dont le design est optimisé pour éviter le prélèvement de billes lors de la récupération du surnageant de digestion.
Mauvaise cristallisation de la matrice	Présence de sels	Utiliser de préférence le tampon de digestion fourni dans le kit. Adapter le volume d'eau/acide ajouté à l'échantillon digéré afin de diminuer la concentration en sel.
	Présence de billes dans les produits de digestion	Utiliser l' EnzyBeads™ Magnet (Agro-Bio réf MT00110) dont le design est optimisé pour éviter le prélèvement de billes lors de la récupération du surnageant de digestion.
Pics de contamination	Contamination par des kératines ou autres protéines	Utiliser uniquement des produits à usage protéomique.
		Eviter l'utilisation des tubes siliconés ou autres types de plastiques pouvant relarguer des polymères.

- Température : le réactif **EnzyBeads™ Chymotrypsine** peut être utilisé à 37°C pour augmenter ses performances sur certaines protéines difficiles à digérer. Utiliser le même protocole qu'à température ambiante.
- Temps de digestion: le temps de 15 minutes est le temps minimum à utiliser. Pour certaines protéines difficiles, il est nécessaire de réaliser des essais préliminaires pour adapter le temps de digestion.
- Aucune agitation n'est nécessaire pour des temps de digestion inférieurs à 30 minutes.
- Aucun produit d'autodigestion de la Trypsine ne vient contaminer l'analyse des échantillons avec les **EnzyBeads™ Chymotrypsine**. Afin de calibrer votre spectre de masse MALDI, utiliser une calibration statistique ou ajouter les peptides de calibration de votre choix ou utiliser les pics de la matrice qui apparaissent sur les spectres en conditions normales.
- Il est recommandé de ne pas réutiliser le réactif **EnzyBeads™ Chymotrypsine** afin d'éviter toute contamination résiduelle due aux digestions précédentes.

9- PRODUITS ASSOCIES

- **EnzyBeads™ Trypsine** : Kit EnzyBeads™ Trypsine 50 (Agro-Bio réf MT03100), Kit EnzyBeads™ Trypsine 100 (Agro-Bio réf MT03120), Réactif EnzyBeads™ Trypsine 100 (Agro-Bio réf MT03110) : Kits de digestion utilisés pour la digestion des protéines, en vue de l'identification des protéines et des études de séquençage.
- **EnzyBeads™ Magnet** (Agro-Bio réf MT00110) : Aimant dont le design est optimisé pour éviter le prélèvement de billes lors de la récupération du surnageant de digestion.
- **NI™ protein Assay** (Agro-Bio réf 786-005) : Trousse permettant le dosage des protéines en s'affranchissant des agents interférents.
- **UPPA-Protein Concentrate™** (Agro-Bio réf 786-120) : Trousse permettant la concentration des solutions protéiques.
- **Tube-O-dialyzer™** (Agro-Bio réf 786-142) : Trousse permettant la dialyse de vos échantillons en permettant une récupération de 100%.




INSTRUCTIONS

- **FOCUS™ Protein Reduction & Alkylation Reagents** (Agro-Bio réf 786-231) : Trousse permettant en deux étapes rapides la réduction des ponts disulfure et l'alkylation des thiols pour faciliter la digestion des protéines.
- **Enzymes de digestion complémentaires** : MSG-Arginine-C™ (Agro-Bio réf 786-11), MSG-Aspartic-N™ (Agro-Bio réf 786-12), MSG-Trypsine™ (Agro-Bio réf 786-245 et 786-245B), MSG-Lysine-C™ (Agro-Bio réf 786-14), MSG-Glutamic-C™ (Agro-Bio réf 786-15). L'utilisation de différentes enzymes de digestion permet le séquençage des protéines et permet d'augmenter le recouvrement de séquence pour mener à l'identification des protéines.

10- BIBLIOGRAPHIE

- K. Pacaud-Mercier *et al.*, Contribution of trypsin-coated magnetic particles to digestion before spectrometry analysis (17th IMSC, 2006).
- S.Tigrett *et al.*, Rapid and time-controlled protein digest by trypsin magnetic particles prior to mass spectrometry analysis (54th ASMS conference on mass spectrometry, 2006).
- A.R. Varlan *et al.*, Covalent enzyme immobilization on paramagnetic polyacrolein beads. *Biosensors & Bioelectronics* (1996), Vol. 11 No 4.
- T.N. Krogh *et al.*, Protein analysis using enzymes immobilized to paramagnetic beads. *Analytical Biochemistry* (1999), 274, 153-162.
- D.J. Janecki *et al.*, Photoimmobilization of proteins for affinity capture combined with MALDI TOF MS analysis. *Anal. Chem.* (2004), 76, 6643-6650.
- L. Korecka *et al.*, Utilization of newly developed immobilized enzyme reactors for preparation and study of immunoglobulin G fragments. *Journal of Chromatography B* (2004), 808, 15-24.
- G. Massolini *et al.*, Immobilized trypsin systems coupled on-line to separation methods : recent developments and analytical applications. *J. Sep. Sci.* (2005), 28 (1) : 7-21.
- E.J. Finehout *et al.*, Kinetic characterization of sequencing grade modified trypsin. *Proteomics* (2005), 5, 2319-2321.

11- SIGNIFICATION DES SYMBOLES D'ETIQUETAGE

	FR	Code du lot		FR	Utiliser jusque		FR	Limites de température
RUO	FR GB	Research Use Only (à usage de recherche seulement)						

Support technique :

techsupport@agro-bio.fr

Numéro Vert : 0 800 36 38 50

Fax: 02 38 64 83 59