

## Matériel

- Tampon bicarbonate d'ammonium  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (MM= 79 g/mol), 50mM, pH 8. Stock de **tampon de bicarbonate d'ammonium  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$**  conservé à  $-20^\circ\text{C}$ , 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  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50mM, pH 8. Stock de **DTT** en solution dans  $\text{H}_2\text{O}$ , conservés à  $-20^\circ\text{C}$ , aliquots de 5 $\mu\text{L}$  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  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50mM, pH 8. Stock **d'iodoacétamide (IAA)** dans des tubes opaques, protégés de la lumière, aliquots en poudre en quantité variable, conservés à  $-20^\circ\text{C}$ .
- Trypsine 3%, en 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 $\mu\text{L}$  à 0.1 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ , ou 10 $\mu\text{L}$  à 1 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ , conservés à  $-20^\circ\text{C}$ .

## Protocole

1. 60-80  $\mu\text{g}$  de protéine (poudre)
2. Ajouter 20  $\mu\text{L}$  de tampon  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 50mM, pH 8.
3. Ajouter 5  $\mu\text{L}$  de DTT 45 mM.
4. Incuber 15 min/  $50^\circ\text{C}$
5. Remettre l'échantillon à température ambiante avant d'ajouter 5  $\mu\text{L}$  d'IAA, 100 mM.
6. Incuber 15min à température ambiante dans le noir.
7. Ajouter la trypsine 3% en masse (soit 3 $\mu\text{g}$  de trypsine pour 100 $\mu\text{g}$  de protéine)
8. Incuber 24h/  $37^\circ\text{C}$ .