

тирозин и триптофан также модифицируются в ходе пробоподготовки, полный анализ состава белка при использовании этой методики невозможен.

МЕТОД 7

Восстановление и алкилирование цистеина/цистина происходит при пиридилэтилировании в паровой фазе.

Восстанавливающий раствор. 83,3 мкл пиридина, 16,7 мкл 4-винилпиридина, 16,7 мкл трибутилфосфина и 83,3 мкл воды помещают в подходящий сосуд и перемешивают.

Методика. Ампулу для гидролиза с образцом белка/пептида (от 1 мкг до 100 мкг) помещают в ампулу большего размера. Переносят весь восстанавливающий раствор в ампулу большего размера, которую затем вакуумируют и герметично запаивают (около 0,05 мм рт. ст. или 6,7 Па). Реакцию проводят при температуре около 100 °С в течение 5 мин. Затем внутреннюю ампулу помещают в вакуумный эксикатор и сушат в течение 15 мин для удаления остатков реактивов. Пиридилэтилированный образец затем гидролизуют согласно описанным выше методикам. Для оценки значения открываемости, рассчитанного для пиридилэтилцистеина, параллельно проводят реакцию пиридилэтилирования стандартного образца белка, содержащего 1–8 остатков цистеина. Длительное время инкубации при реакции пиридилэтилирования может привести к модификации концевых α- и ε-аминогрупп лизина в белке.

МЕТОД 8

Восстановление и алкилирование цистеина/цистина происходит при пиридилэтилировании в жидкой фазе.

Исходные растворы. Готовят и фильтруют 3 раствора: 1 М раствор ТРИС-гидрохлорида с рН 8,5, содержащий 4 мМ динатрия эдетата (исходный раствор А); 8 М раствор гуанидина гидрохлорида (исходный раствор В); 10 % раствор 2-меркаптоэтанола (исходный раствор С).