

Восстанавливающий раствор. Готовят смесь, состоящую из 1 объема исходного раствора А и 3 объемов исходного раствора В (буферный раствор, содержащий 6 М гуанидина гидрохлорида и 0,25 М ТРИС-гидрохлорида).

Методика. Около 10 мкг испытуемого образца растворяют в 50 мкл восстанавливающего раствора и прибавляют около 2,5 мкл исходного раствора С. Выдерживают в течение 2 ч при комнатной температуре в защищенном от света месте в атмосфере азота или аргона. Для проведения реакции пиридинэтилирования к раствору белка прибавляют около 2 мкл 4-винилпиридина и выдерживают дополнительно 2 ч при комнатной температуре в защищенном от света месте. Обессоливают белок/пептид методом ОФ-ВЭЖХ, собирая белковую/пептидную фракцию. Перед кислотным гидролизом собранный образец может быть высушен при помощи вакуумного центрифугирования.

МЕТОД 9

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

Исходные растворы. Готовят, как указано в Методе 8.

Раствор для карбоксиметилирования. Готовят 100 г/л раствор йодацетамида в 96 % спирте.

Буферный раствор. Используют восстанавливающий раствор, приготовленный, как указано в Методе 8.

Методика. Испытуемый образец растворяют в 50 мкл буферного раствора и прибавляют около 2,5 мкл исходного раствора С. Выдерживают в течение 2 ч при комнатной температуре в защищенном от света месте в атмосфере азота или аргона. Прибавляют раствор для карбоксиметилирования в 1,5-кратном избытке по отношению к теоретическому общему содержанию тиолов, и выдерживают дополнительно в течение 30 мин при комнатной температуре в защищенном от света месте. Если содержание тиолов в белке неизвестно, прибавляют 5 мкл 0,1 М раствора йодацетамида из расчета на каждые