

PROCOLO 1. PREPARACIÓN DE PROTEÍNAS SEPARADAS POR GEL DE POLYACRYLAMIDE (1D Y 2D) PARA IDENTIFICACIÓN POR ESPECTROMETRIA DE MASAS

DIGESTIÓN *in gel*

Soluciones y materiales

- Acetonitrilo (C₂ H₃N)
- H₂O Milli-Q
- 100 mM y 50 mM de bicarbonato de amonio (NH₄HCO₃)
- 10 mM dithiothreitol (DTT) en 100 mM de (NH₄HCO₃)
- 50 mM iodoacetamine (IAA) en 100 mM de (NH₄HCO₃). Proteger de la luz.
- Solución de tripsina: Resuspender 20 µg de Tripsina (Promega, Madison, WI) en 200 µl de bicarbonato de amonio a 50mM. Guardar en alícuotas a -20 °C. La concentración final es 0.1 µg/µL
- Solución para desteñir: 50% (v/v) MeOH y 5% (v/v) ácido acético
- Solución de extracción: 50% (v/v) acetonitrilo y 5% (v/v) ácido fórmico
- ZipTips C18 (MilliPore, Billerica, MA)
- Tubos plásticos de bajo pegado (Protein LoBind) de Eppendorf AG (Hamburg, Germany).
- Concentrador SpeedVac Savant SPD1010 (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA).

NOTA. Las soluciones deben prepararse inmediatamente antes del procesamiento. El H₂O es de tipo Milli-Q. El acetonitrilo y metanol son de grado HPLC. Todos los reactivos utilizados (DDT, IAA, bicarbonato de amonio) son adquiridos de Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO). La tripsina utilizada es de grado secuenciación y esta ha sido modificada para inhibir autólisis.

Procedimiento

Día 1

1. Cortar las bandas del gel lo más cercano posible del borde de tinción y dividir en pequeñas piezas, aproximadamente de 1mm a 2mm de diámetro. Evitar pulverización de las piezas, las pequeñas partículas pueden tapar las columnas capilares y ZipTips.
2. Colocar las piezas de gel en un tubo de 1.5mL. Adicionar 200 μ L de la solución para desteñir por una noche.
3. Remover la solución de la muestra y desechar.

Día 2.

4. Adicionar 200 μ L de acetonitrilo y deshidratar las piezas de gel por 5 min a temperatura ambiente. Las piezas deben de presentar un color blanco opaco y tamaño reducido.
5. Retirar el acetonitrilo y desechar.
6. Colocar la muestra en un Speed-Vac Savant por 5 min hasta que las piezas de gel estén completamente secas.
7. Rehidratar las piezas de gel y reducir las proteínas colocando 50-60 μ L de la solución de DTT a 56°C por 30 min.
8. Retirar el excedente de la solución de DTT y desechar.
9. Adicionar de 50-60 μ L de la solución de IAA y dejar a temperatura ambiente al abrigo de la luz durante 30 min para permitir la alquilación de los grupos sulfidrilo libres.
10. Retirar el excedente de la solución de IAA y desechar.
11. Adicionar 50 μ L de 100 mM de NH_4HCO_3 e incubar por 5 min. Retirar la solución y desechar.
12. Adicionar 100 μ L acetonitrilo para deshidratar las piezas de gel por 5 min a temperatura ambiente. Retirar la solución y desechar.
13. Adicionar solución 50 μ L de 100 mM de $\text{NH}_4 \text{HCO}_3$ por 5 min. Al término del tiempo retirar el excedente y desechar.
14. Adicionar 100 μ L acetonitrilo para deshidratar las piezas de gel por 5 min a temperatura ambiente. Descartar el sobrenadante.
15. Colocar la muestra en Speed-Vac por 5 min hasta que las piezas de gel estén completamente secas.

16. Adicionar 30-40 μL de la solución de tripsina (4 μL de la solución stock en 50 mM de NH_4HCO_3) para permitir la rehidratación de las piezas de gel a 4°C durante 20 min.
17. Retirar el exceso de la solución de tripsina.
18. Adicionar 1 mL de H_2O Milli-Q al tubo que contiene las piezas de gel y agitar por 30 s en Vortex a baja velocidad.
19. Centrifugar la muestra por 30 s para asegurar que las piezas de el gel se queden en el fondo del tubo. Desechar el sobrenadante.
20. Colocar 40 μL de 50 mM NH_4HCO_3 a 37 °C por 12-18 h.

Día 3

Extracción de péptidos trípticos.

21. Centrifugar la muestra por 30 s y transferir la solución a un tubo nuevo, colocar 1 μL de ácido fórmico.
22. Adicionar 100 μL de la solución de extracción al tubo que contiene las piezas de gel e incubar por 15 min a temperatura ambiente. Retirar la solución y combinar en el tubo nuevo.
23. Adicionar 50 μL de 100% acetonitrilo al tubo que contiene las piezas de gel. Colocar en un vortex por 30 s, centrifugar para permitir que las piezas de gel queden en el fondo del tubo. La solución debe de transferirse al mismo tubo nuevo.
24. Para reducir el volumen la solución que contiene los péptidos trípticos debe de colocarse en un SpeedVac, evitando que el extracto llegue a la sequedad (5-10 μL aproximadamente)

PURIFICACIÓN Y CONCENTRACIÓN DE PÉPTIDOS POR Zip-Tip

Soluciones

Solución A - Agua Milli-Q, 0.1 % ácido fórmico (AF)

Solución B - Acetonitrilo, 0.1 % AF

Solución C - acetonitrilo:agua, 0.1% AF (50:50)

Solución D - acetonitrilo:agua, 0.1% AF (80:20)

Muestra deberá ser diluida en 50 μL de la solución A.

Colocar 100 μL de cada una de las soluciones en tubos Eppendorf de 1.5 mL.

*Etiquetar un tubo nuevo para la elución de los péptidos purificados.

Activación del Tip

1. Aspirar y dispensar 10 μL por 10 veces el Tip con la solución B utilizando una pipeta de 20 μL .
2. Aspirar y dispensar 10 μL por 10 veces el Tip con la solución A con una pipeta de 20 μL .

Unión de muestra

3. Aspirar y dispensar 10 μL de la muestra hasta pasar toda la solución contenida.
4. Lavar la muestra con la solución A, realizando 3-4 ciclos (aspirar-dispensar).

Elución de péptidos

5. Eluir los péptidos utilizando la solución C con 2 ciclos (aspirar-dispensar) y depositar en un tubo nuevo.
6. Realizar 2 ciclos más con la solución D y colocar en el mismo tubo del paso anterior.