

PROTOCOLO

DIGESTION DE PROTEÍNAS EN SOLUCIÓN

Soluciones y materiales

- Buffer de desnaturalización: 6 M urea/2M thiourea en 10mM HEPES (pH 8.0). Para 10 mL disolver 3.6 g urea, 1.52 g thiourea and 23.83 mg HEPES in 4 mL de H₂O. Ajustar el pH con NaOH. Centrifugar la solución, a 5,000 x g por 10 min. Esta solución se puede almacenar en pequeñas alícuotas a -70 °C por 4 meses.
- Buffer de ABC (NH₄HCO₃): 50 mM de ABC (40 mg) en 10 mL H₂O
- DTT. 10 mM DTT en 50 mM ABC. Para 1 mL diluir 10 uL de 1M DTT (solución de stock) en 990 uL de ABC. Se pueden guardar alícuotas a -20°C.
- IAA. Iodacetamid. 55 mM en 50 mM ABC. Para hacer 1 mL disolver 10.2 mg iodacetamide en 1 mL ABC. Se puede almacenar a -20 °C y cubrir de la luz.
- 10% de FA en H₂O.
- 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 siempre antes del procesamiento. El H₂O es de tipo Milli-Q.

METODOLOGÍA

1. Solubilizar las proteínas en el buffer de desnaturalización (utilizar aproximadamente 20-40 uL por pellet)
2. Adiciona 1uL DTT/ (50 ug de proteína) e incubar por 60 minutos a 56 °C.
3. Adiciona 1 uL IAA/10 uL del buffer de digestión e incuba por 30 minutos a temperatura ambiente y en cuarto oscuro.

4. Diluye la muestra con 4X de ABC (la concentración final de urea no debe exceder 2M).
5. Adicionar 1ug de enzima/50 ug de proteína e incubar toda la noche a 37 °C.
6. Para parar la digestión se debe de acidificar la muestra a un pH menor a 3, adicionando 10 uL de la solución de 10% FA.
7. Proceder con el desalado de los péptidos con Zip Tip C18 o Cartuchos C18.
8. Concentrar los péptidos en el equipo Savant y cuantificar con BCA.