

Protocolo de Digestão em Gel
Laboratório Max Feffer de Genética de Plantas
Departamento de Genética
Esalq/Usp

Shevchenko et al (2006). In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols* 1 (6): 2856-2860. doi:10.1038/nprot.2006.468

Obs: Todos os ácidos e solventes orgânicos devem ser manipulados com muito cuidado e sempre no interior de capela de exaustão e descartados de acordo com as normas para descarte de resíduos. Acetonitrila e Metanol são **tóxicos** e o ácido fórmico é **corrosivo**. Dessa forma, devem ser manipulados com muito cuidado.

Obs: Cuidados a serem tomados para minimizar contaminações com queratina, polímeros e outras impurezas que podem interferir na qualidade das amostras:

- i) Use luvas de nitrila: www.danny.com.br o tempo todo e lave-as, caso necessário, para evitar contato com poeira e fios de cabelo que eventualmente podem ficar aderidos devido à estática do material das luvas.
- ii) Utilize sempre químicos (**grau MS**), ponteiros e microtubos novos, graduados e **não siliconizados** (**Tabela 1**), para evitar contaminação por polímeros na amostra. Mantenha os tubos em locais livres de poeira e não autoclave-os. Se possível, utilize pipetas exclusivas para tal finalidade.
- iii) Sempre verifique a limpeza dos tubos e frascos de preparo dos tampões. É aconselhável separar a vidraria que deve ser de boro silicato (**Tabela 1**), se possível. Evite o uso de detergentes poliméricos, tais como: Triton X100, SDS, Tween, etc.. Recomenda-se fazer um enxágüe da vidraria com metanol, antes do uso.

Soluções:

Obs: As soluções devem ser novas (**CRÍTICO**), preparadas na quantidade necessária, **no dia do uso**. Não devem ser estocadas. O bicarbonato de amônio é extremamente volátil.

Obs: É recomendável, preparar um volume maior de 50mM AmBic e a partir dessa solução, preparar todas as outras.

- 1) Solução de descoloração: 50% (v/v) de acetonitrila (ACN) (**CAS# 75-05-8, Fluka, cat# 34967**) e 25 mM de bicarbonato de amônio (AmBic) (NH_4HCO_3 , **CAS# 1066-33-7, Sigma, cat# 9830** MW= 79.06) = [0.1 g/50 mL H_2O grau MS]. *Essa solução pode ser feita a partir da solução estoque de 50 mM AmBic.*

Obs: Essa solução de descoloração é utilizada para o caso de spots de géis corados com Coomassie. Géis corados com prata devem ser descorados com Acetonitrila 100%.

- 2) Acetonitrila (ACN) 100%.
- 3) Solução de redução: 20mM ditioneína (**DTT, BioRad, cat# 161-0611**, MW=154.3) = [30 mg/10 mL de solução 50 mM AmBic = [0.2 g/50 mL H_2O grau MS].
- 4) Solução de alquilação: 55 mM de iodoacetamida (**IAA, GE, cat# RPN 6302V**, MW=185.0) = [102 mg/10 mL de solução 50 mM AmBic. **Obs: o IAA é sensível à luz! (CRÍTICO)**.
- 5) Solução de tripsina (**Promega Trypsin, Part No. V511**): estoque de 10 ng/ μL .
- 6) Solução bloqueadora: 5% (v:v) ácido fórmico 96% (**Fluka/Sigma-Aldrich, cat# 56302**) em 50% (v:v) ACN. *Para 2 mL, aliquotar 1 mL de ACN 100% em um frasco de vidro, pipetar 104.16 μL de ácido fórmico (96%) e completar o volume para 2 mL, com H_2O grau MS (895.84 μL).*
- 7) Solução de eluição I: 1% (v:v) ácido fórmico (96%) em 60% (v:v) metanol (**Merck, cat# 1.06009.1000**). *Para 2 mL, aliquotar 1.2 mL de metanol 100% em um frasco de vidro, pipetar 20.83 μL de ácido fórmico (96%) e completar o volume para 2 mL, com H_2O grau MS (779.17 μL).*
- 8) Solução de eluição II: 1% (v:v) ácido fórmico em 50% (v:v) ACN. *Para 2 mL, aliquotar 1 mL de ACN 100% em um frasco de vidro, pipetar 20.83 μL de ácido fórmico (96%) e completar o volume para 2 mL, com H_2O grau MS (979.17 μL).*

Procedimento 1: Preparo dos spots/bandas

- 1) Corte os spots/bandas dos géis, com auxílio de uma ponteira de 1 mL (adaptar a ponta com auxílio de uma gilete, para o tamanho do spot) ou para o caso de bandas, utilizar uma lâmina de bisturi pequena.
- 2) Pique os spots/bandas em fragmentos de aproximadamente 1 mm³ (use placas de Petri de vidro previamente enxaguadas com metanol e água milliQ) e transfira-os para tubos Eppendorf com auxílio de uma pipeta Pasteur de vidro e água milliQ.

Descoloração dos fragmentos de gel: lave-os (3X ou mais, até a remoção completa do corante) com solução de descoloração (200 µL/spot) e agite (vórtex). Espere 5 a 10 min a cada lavagem. *Obs: alguns spots, mesmo depois de várias lavagens não descoram (prossiga mesmo assim).*

Obs: Os spots de géis corados com prata devem ser descorados com Acetonitrila 100%.

- 3) Remova a solução de descoloração, com auxílio de uma pipeta Pasteur de vidro e desidrate o gel com 100% ACN (200 µL/spot), por 10 min. Dê um pulso na centrífuga, para remoção completa da ACN. Os fragmentos de gel devem ficar bem branquinhos. Repita o processo até desidratação completa do gel (normalmente 1X), ou seja, percebe-se que os fragmentos de gel se soltam da parede do tubo. O resíduo remanescente do gel deve evaporar à temperatura ambiente, em capela (15 min). ***Obs: Nesse ponto, caso seja necessário, pode-se interromper o procedimento e manter as amostras a -20°C por 1 a 2 horas, antes de prosseguir.***
- 4) Redução: reidrate os fragmentos de gel, pela adição de solução de redução (40 µL/spot). Mantenha as amostras a **56°C**, por 40 min.

Obs: No caso de spots de géis corados com prata deve-se repetir (1 X) a etapa de redução.

- 5) Dê um pulso na centrífuga. Descarte o sobrenadante para remoção completa da solução de redução.
- 6) Desidrate o gel com 100% ACN (200 µL/spot), por 10 min. Remova a ACN. A ACN residual remanescente deve evaporar à temperatura ambiente, em capela (15 min).

- 7) Alquilação: adicione a solução de alquilação (de forma a cobrir os fragmentos de gel, 40µL/spot). Incube as amostras no escuro, à temperatura ambiente, por 30 min.

Obs: No caso de spots de géis corados com prata deve-se repetir (1 X) a etapa de alquilação.

- 8) Dê um pulso na centrífuga. Descarte o sobrenadante e lave os spots com 25 mM AmBic (200 µL/spot), com auxílio do vórtex, seguido de desidratação com 100% ACN (2X). Dê um pulso na centrífuga para remoção completa da ACN. O resíduo remanescente do gel deve evaporar à temperatura ambiente, em capela de exaustão (15 a 20 min).
Obs: Nesse ponto, caso seja necessário, pode-se interromper o procedimento e manter as amostras a -20°C por 1 a 2 semanas, antes de prosseguir com a digestão.

Procedimento 2: Preparo da Tripsina

Obs: A tripsina geralmente é fornecida pelo fabricante liofilizada (100 ug em 5 vials de 20 µg da (***Promega Trypsin, Part No. V511A***). A quantidade de enzima deve ser ressuspensa vagarosamente (***Não utilize VÓRTEX!***) em AmBic (50mM).

Preparo da tripsina para digestão em gel: 20 µg de tripsina em 200 µL de 50 mM AmBic (Conc. Final = 100 ng/µL). Distribua alíquotas de 60 µL em “vials”- ***Waters Total Recovery Vial (Waters Part No. 186000385c, 100/pkg, preslit PTFE/silicone caps)***. Congele (-80°C) esses tubos até o momento do uso. Recomenda-se manter a tripsina armazenada congelada em ácido acético e deve-se evitar ciclos de descongelamento.

Procedimento 3: Digestão

- 1) No momento do uso, o volume das alíquotas (10 µL) da solução de tripsina (100ng/µL), que está congelada, deve ser completado para 50 µL com solução de AmBic (50 mM) gelada. Assim, a concentração final da enzima será de 20 ng/µL em cada tubo. Essa é a concentração de enzima que será utilizada na digestão.
- 2) Adicione 15µL (no mínimo) da solução de tripsina (20 ng/µL) sobre os fragmentos de géis desidratados.
- 3) Deixe as amostras 15 min a **4°C** para que a tripsina penetre nos fragmentos de gel. Retire o excesso da solução de tripsina, caso haja.

- 4) Adicione 50 mM de AmBic até cobertura completa dos spots (40 μ L). Incube as amostras a **37°C**, por 14 horas.

Procedimento 4: Eluição dos peptídios

- 1) A ação da tripsina deve ser interrompida pela adição de 15 μ L de solução bloqueadora. Recupere o sobrenadante (= 55 μ L) e transfira-o para um tubo novo. **Obs: Nesse ponto, caso seja necessário, pode-se interromper o procedimento e manter as amostras a -20°C por 1 semana.**
- 2) Eluição I: adicione volume suficiente de solução de eluição I para cobrir os fragmentos de gel remanescentes nos tubos da digestão (40 μ L). Incube as amostras por 15 min a **40°C**, com agitação (vórtex), a cada 5 min. Repita esse passo. Recupere o sobrenadante de cada passo e transfira-os para o mesmo tubo que contém o sobrenadante da digestão e a solução bloqueadora (= 135 μ L). *Guarde os “tips” nos tubos iniciais, que contêm os fragmentos de géis remanescentes, para utilizá-los nos próximos passos.*
- 3) Eluição II: adicione volume suficiente de solução de eluição II para cobrir os fragmentos de gel (40 μ L). Incube as amostras por 15 min a **40°C**, com agitação (Vórtex), a cada 5 min. Repita esse passo. Recupere o sobrenadante de cada passo e transfira-os para o mesmo tubo que contém os sobrenadantes resultantes da Eluição I (= 215 μ L).
- 4) Eluição III: adicione volume suficiente (40 μ L) de ACN 100% para desidratar os fragmentos de gel. Recupere o sobrenadante e transfira-o para o mesmo tubo que contém os sobrenadantes da Eluição I e II. (= 295 μ L). **Obs: Nesse ponto, caso seja necessário, pode-se interromper o procedimento e manter as amostras a -20°C por 1 a 2 semanas.**
- 5) A solução final (~300 μ L), contendo os peptídios eluídos do gel, deve ser concentrada em concentrador a vácuo (“speed vac”), à temperatura ambiente, até 1 μ L (*ir acompanhando de tempos em tempos, +/- 1min/ μ L*). Armazenar a amostra a **-20°C** até a ressuspensão da mesma, para análise de espectrometria de massas. **Obs: Nesse ponto, as amostras podem ficar armazenadas por 1 a 2 meses até a análise.**
- 6) A amostra deve ser ressuspensa em 10 μ L TFA 0.1% (v:v) em H₂O grau MS (**Sigma-Aldrich, cat# 299537, CAS# 76-05-1**), agitada (vórtex),

dessalinizada com auxílio do ZipTip (*ver protocolo site*), eluída em 10 µL de 50% (v:v) ACN em H₂O grau MS e transferida para “vials”- **Waters Total Recovery Vial (Waters Part No. 186000385c, 100/pkg, preslit PTFE/silicone caps)**. Seque a amostra no “speed vac” caso seja necessário armazená-la (-80°C). No caso de análise por **MALDI**, reduza o volume da amostra eluída, com auxílio do “speed vac” para 5µL e utilize 2µL (1+1) para aplicar na placa de **MALDI**.

- 7) Já no caso da análise pelo **SynaptG2**, após a passagem da amostra pelo ZipTip e eluição em 10 µL de 50% (v:v) ACN em H₂O grau MS, deve-se secar a mesma a vácuo (“speed vac”), à temperatura ambiente, até completa secagem (*ir acompanhando de tempos em tempos, +/- 1min/µL*).