

**Protocolo de Digestão Triptica de Amostra Complexa para LC-MS para
análise no TimSTof (Bruker)
Laboratório Max Feffer de Genética de Plantas
Departamento de Genética
Esalq/Usp**

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, TFA e Hidróxido de amônio 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 uso.
- iii) Sempre verifique a limpeza dos tubos, frascos de preparo dos tampões e os vidros da cuba de eletroforese. É aconselhável separar a vidraria que deve ser de borossilicato (**Tabela 1**), para tal finalidade. Evite o uso de detergentes poliméricos, tais como: Triton X100, SDS, Tween, etc.. Recomenda-se fazer a lavagem da vidraria com água miilQ (5 a 6 vezes) e um enxágue final com metanol, antes do uso.

Soluções:

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

Procedimento:

- 1) Ressuspenda as amostras complexas de proteínas totais, obtidas a partir de 100 mg de tecido, em 400uL de tampão de suspensão apropriado. Dessalinize as amostras utilizando a solução de 50mM NH_4HCO_3 fresca, com auxílio de uma coluna Amicon®Ultra Centrifugal Filters da Millipore (cat # UFC 5003BK) ou Vivaspin, da **GE Healthcare**, seletivas para **3000-10000 NMWL** (dependendo do peso molecular das proteínas de interesse e do volume da amostra, antes da quantificação pelo teste de Bradford.
- 2) Corra um gel de SDS-PAGE das amostras, juntamente com uma amostra padrão de BSA (2ug) para confirmar a quantificação da proteína por Bradford, pela análise visual e comparativa do gel. **Obs:** Nem sempre, a quantificação por Bradford é compatível com a quantificação em gel. **Obs:** Faça a correção da concentração da

amostra, de acordo com o gel, pois a quantificação correta é imprescindível!

- 3) Transfira o volume equivalente a 10ug de amostra para um tubo eppendorf (1.5 mL) (**Axygen, cat# MCT-150-L-C**). Ajuste o volume ($qsp = 10\mu\text{L}$), pela adição de 50 mM NH_4HCO_3 . Essa é a quantidade de amostra (em μg) necessária para a digestão com tripsina.
- 4) Adicione 2.5 μL de uma solução **RapiGest SF** (0.2%) e agite (Vórtex). A solução de 0.2% **RapiGest SF** é preparada pela adição de 500 μL de água (grau MS) a um "vial" de 1 mg de **RapiGest SF (Waters Part No186001861, 5 x 1 mg)**. A concentração final de RapiGest recomendada, deve estar entre 0.025% a 0.1% (w/v).

ii) Nesse caso, estamos utilizando a proporção de 0.05% de RapiGest. Respeite essa proporção se o volume da digestão for alterado.

- 5) Transfira o tubo para um bloco aquecido ou banho-maria (80°C). Aqueça por 15 min.
- 6) Remova o tubo do bloco aquecido ou banho-maria. Centrifugue (pulso). Adicione 0.62 μL de 100 mM ditiotreitol (**DTT, BioRad, cat# 161-0611, MW=154.3**) = [1.5 mg/100 μL H_2O grau MS], para abrir a proteína e deixá-la mais acessível aos passos de alquilação e digestão. Agite (Vórtex). A concentração final do DTT deve ser de 5mM.

iii) Se houver alteração do volume amostral, mantenha sempre a molaridade final do DTT que deve ser de 5mM.

- 7) Transfira o tubo para bloco aquecido ou **banho-maria** (60°C). Aqueça por 30 min.
- 8) Remova o tubo do bloco aquecido ou banho-maria. Espere a amostra chegar à temperatura ambiente. Centrifugue (pulso).
- 9) Adicione 0.66 μL de 300 mM **iodoacetamida (IAA, GE, cat# RPN 6302V, MW=185.0)** = [5.55 mg/100 μL H_2O grau MS], para a alquilação de cisteínas. Agite (Vórtex). A concentração final do IAA deve ser de 15mM. **Obs: Composto muito sensível à luz. (CRÍTICO)**
- 10) Transfira as amostras para o escuro, à temperatura ambiente e mantenha-as por 30 minutos (tempo de reação).

iv) Se houver alteração do volume amostral, mantenha sempre a molaridade final do IAA que deve ser de 15mM.

- 11) Adicione 2 μL de solução de tripsina (Promega) em 50 mM NH_4HCO_3 (Preparada pela adição de 4 mL de 50 mM NH_4HCO_3 em um “vial” de 20 μg da **Promega Trypsin (= 50ng/ μL), Part No. V511A, 100 μg em 5 x 20 μg aliquotas). Agite (Vórtex). Proceda a digestão a (37°C) “overnight”. *Nesse caso a proporção final enzima:proteína é de 1:100 (wt:wt).***

v) No caso da tripsina, o volume de 2 μL deve ser mantido, independentemente do volume da digestão, pois a proporção de enzima:proteína de 1:100 deve ser considerada.

- 12) Após a digestão, para hidrolisar o **RapiGest SF**, adicione 1 μL de 5% (v:v) 5 μL **TFA** (preparado em 100 μL **H₂O grau MS**, a partir de ampolas de alta pureza, **Pierce, Part No. 53102, HPLC Grade**, 10 x 1 mL). Agite (Vórtex). Incube as amostras a (37°C) por 90 min. Centrifugue (16.000 g) a 4°C, por 30 min. Transfira o sobrenadante para “vial” (**Waters Total Recovery Vial, Waters Part No. 186000385c, 100/pkg, preslit PTFE/silicone caps**).

vi) Nesse caso, leve em consideração o volume de RapiGest utilizado para cada volume amostral e utilize a proporção de (0.4v:1v): (TFA 5%:RapiGest).

- 13) Seque as amostras em “speed vac”. Depois de secas, as amostras precisam passar por uma coluna C18 de purificação (**ZipTip Reversed-Phase ZipTip C18, P10, da Millipore, cat# ZTC18S960**) antes de serem analisadas.
- 14) No caso de utilização da coluna C18 de purificação (ZipTip Reversed-Phase ZipTip C18, P10, da **Millipore, cat# ZTC18M096**), ressuspenda as amostras em 10 μL de solução 0.1% TFA preparada em **H₂O grau MS**.
- 15) Purifique os peptídeos resultantes da digestão, com auxílio do ZipTip (ver protocolo no site). Faça a eluição dos mesmos em 10 μL da solução de 0.1% TFA em (50%) **ACN** e transfira para um “vial” (**Waters Total Recovery Vial, Waters Part No. 186000385c, 100/pkg, preslit PTFE/silicone caps**).
- 16) Seque as amostras em “speed vac” e mantenha-as a -80°C até o momento da análise.
- 17) No momento da análise, as amostras serão suspendidas em 0.1% (v:v) de **ácido fórmico em H₂O grau MS (cat# 27001, Sigma)**.