

**Utilização de ZipTip para purificação de amostras de peptídeos, provenientes da digestão trípica de spots de gel ou amostra complexa, para espectrometria de massas para MALDI e SynaptG2**

**Laboratório Max Feffer de Genética de Plantas**

**Departamento de Genética**

Referência: *User Guide For Reversed-Phase ZipTip C18, P10 - Millipore (cat# ZTC18S096)*, (modificado)

*Antes da análise MS/MS, os peptídios precisam ser dessalinizados. Para esse propósito, utilizamos os ZipTips.*

Material Necessário:

- 1) Reversed-Phase ZipTip C18, P10 - **Millipore (cat# ZTC18S096)**
- 2) Micropipeta (10 µL)
- 3) Soluções:
  - a) 100% Acetonitrila (ACN), (**CAS# 75-05-8, Fluka, cat# 34967**).
  - b) 0.1% (v:v) TFA (Ácido Trifluoracético, **Sigma-Aldrich, cat# 299537, CAS# 76-05-1**) em 100% ACN = [5 µL TFA em 5 mL ACN 100%].
  - c) 0.1% (v:v) TFA em 50% (v:v) solução de ACN em H<sub>2</sub>O grau MS = [5 µL TFA em 2.5 mL H<sub>2</sub>O grau MS + 2.5 mL ACN 100%].
  - d) 0.1% (v:v) TFA em H<sub>2</sub>O grau MS = [5 µL TFA em 5 mL H<sub>2</sub>O grau MS].
  - e) 0.1% (v:v) TFA em 5% (v:v) solução de metanol (**Merck, cat# 1.06009.1000**) = [5 µL TFA + 250 µL MeOH + 5 mL H<sub>2</sub>O grau MS].

**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, Metanol e TFA são **tóxicos** e o FA 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](http://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 aderidas 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.

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**), para tal finalidade. 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.

#### Procedimento:

**Obs: Toda amostra que estiver armazenada em freezer, deve ser previamente homogeneizada em vórtex à temperatura ambiente, antes de se iniciar a purificação.**

- 1) Preparo da amostra: ajuste o pH da amostra de forma a obter um pH < 4.0. Para isso, ressuspenda a amostra de peptídios em 10 µL da solução 0.1% TFA preparada em H<sub>2</sub>O grau MS.
- 2) Equilíbrio dos ZipTips I: ajuste o ZipTip em uma micropipeta (10 µL) e aspire 10 µL da solução 0.1% TFA preparada em 100% ACN. Descarte a solução.
- 3) Equilíbrio dos ZipTips II: ajuste o ZipTip em uma micropipeta (10 µL) e aspire 10 µL da solução 0.1% TFA preparado em 50% Acetonitrila (em H<sub>2</sub>O grau MS). Descarte a solução.

- 4) Equilíbrio dos ZipTips III: ajuste o ZipTip em uma micropipeta (10 µL) e aspire 10 µL da solução 0.1% TFA preparado em H<sub>2</sub>O grau MS. Descarte a solução.
- 5) Ligação da amostra à coluna: aspire e dispense, repetitivamente (7 a 10 X), 10 µL da amostra de peptídeos, dissolvida em 0.1% TFA preparada em H<sub>2</sub>O grau MS, para garantir a fixação da mesma à coluna, particularmente, no caso de amostras complexas.
- 6) Lavagem I: aspire 10 µL da solução 0.1% TFA preparada em 5% solução de metanol (em H<sub>2</sub>O grau MS). Descarte a solução e repita esse passo mais 2X. **Obs:** *Essa lavagem com metanol é opcional, mas melhora bastante a eficiência de dessalinização, caso seja necessária.*
- 7) Eluição para amostras (de gel) a serem analisadas por MALDI: aspire e dispense, repetitivamente (7 a 10X), em um “vial”, 10 µL da solução de 0.1% TFA em (50%) ACN, para eluição dos peptídeos. Os peptídios devem ser transferidos para “vials” (**Waters Total Recovery Vial, Waters Part No. 186000385c, 100/pkg, preslit PTFE/silicone caps**). **Obs:** *Nessa concentração menor de ACN (50%) melhora-se a detecção de peptídios hidrofílicos.*

#### **Cuidados Importantes:**

- i) *Em nenhum passo, deixe que a coluna no interior do ZipTip resequie.*
- ii) *ACN e Metanol são muito voláteis e evaporam rapidamente. Caso isso ocorra, adicione mais eluente para recuperar a amostra.*