

Protocolo de digestão in gel: Laboratório de Espectrometria de Massas-LNBio (Anal.Chem., 1996 68:850-858 modificado)

1. Reagentes (todos devem ser preparados no dia do uso)

1. Destain (remover o SDS): metanol 50% + ácido acético 2,5% em água purificada.
2. Bicarbonato de amônio 100mM: 100mM de bicarbonato de amônio em água purificada (PM=79,06; 158mg em 20mL de água purificada).
3. Bicarbonato de amônio 50mM: 50mM de bicarbonato de amônio em água purificada (PM=79,06; 79 mg em 20mL de água purificada).
4. Acetonitrila (100%).
5. Ditiotreitól (DTT) 10mM: 1.5 mg de DTT em 1mL de bicarbonato de amônio 100mM.
6. Iodoacetamida (IAA) 50mM: 9,2mg de IAA em 1mL de bicarbonato de amônio 100mM e proteger da luz.
7. Solução de Tripsina: 20ng/ μ L (Sequencing Grade Modified Trypsin, V5111-Promega): solubilizar em bicarbonato de amônio 50mM, alíquotar e armazenar a -20°C.
8. Solução de extração 1: ácido fórmico 5% (em água purificada).
9. Solução de extração 2: ácido fórmico 5% em acetonitrila 50%.

2. Procedimento Dia 1

1. Cortar as bandas do gel (tentar cortar pedaços de 1 mm).
2. Descoloração das bandas: adicionar 0,5mL da solução 1 (destain). Incubação por 1h à temperatura ambiente.
3. Remover esta solução e adicionar mais 0,5mL da solução 1 (destain) Incubação por 1h à temperatura ambiente. Repetir esse passo (total de 3 horas, trocando a cada hora a solução de destain).
4. Desidratação: remover a solução de destain (descartar) e desidratar o gel adicionando 200 μ L de acetonitrila (100%). Deixar nesta solução por 5 minutos. Remover a acetonitrila e repetir este passo.
5. Evaporar o que restou de acetonitrila em evaporador (2 a 3 minutos).
6. Redução: adicionar 30 μ L da solução de DTT 10mM. Incubar por 30 minutos à temperatura ambiente.
7. Dar um spin rápido e remover a solução de DTT.
8. Alquilação: adicionar 30 μ L da solução de IAA 50mM. Incubar por 30 minutos à temperatura ambiente e protegido da luz.

9. Dar um spin rápido e remover a solução de IAA.
10. Lavar o gel com 100 μ L de bicarbonato de amônio 100mM por 10 minutos e, em seguida, remover esta solução.
11. Desidratar o gel com 200 μ L de acetonitrila (100%), incubando por 5 minutos a temperatura ambiente. Remover a acetonitrila.
12. Reidratação: reidratar o gel com 200 μ L de bicarbonato de amônio 100mM por 10 minutos.
13. Dar um spin rápido e remover a solução de bicarbonato de amônio.
14. Desidratar o gel com 200 μ L de acetonitrila (100%), incubando por 5 minutos a temperatura ambiente. Remover a acetonitrila. Repetir este passo.
15. Evaporar o que restou de acetonitrila em evaporador (2 a 3 minutos, alternativamente pode-se usar um liofilizador por \sim 5min).
16. Preparo da tripsina: 20 μ g de tripsina em 1000 μ L de bicarbonato de amônio 50mM gelado. Concentração final da tripsina 20ng/ μ L.
17. Adicionar 30-50 μ L da solução de tripsina e reidratá-los por 30 minutos em banho de gelo. Acertar a quantidade de tripsina adicionada de acordo com a quantidade de proteínas na banda ou spot.
18. Dar um spin rápido, remover o excesso de solução de tripsina e adicionar 5 a 20 μ L de bicarbonato de amônio 50mM para cobrir o gel. Deixar overnight a 37°C.

3. Procedimento dia 2

(Não remover a solução de bicarbonato de amônio do dia anterior)

19. Extração: adicionar 10 μ L da solução #1 de extração (poderá ser adicionado 30 μ L caso o pedaço de gel seja grande). Incubar por 10 minutos a temperatura ambiente, dar um spin rápido e colocar o sobrenadante em outro tubo.
20. Adicionar 12 μ L da solução #2 de extração (poderá ser adicionado um volume que seja suficiente para cobrir o gel). Incubar por 10 minutos a temperatura ambiente, dar um spin rápido e coletar o sobrenadante no tubo que fora previamente separado (e já contém o extrato do passo anterior). Repetir este passo.
21. Evaporar a amostra em evaporador (\sim 40 minutos) de forma a restar aproximadamente 1 μ L (tentar não evaporar totalmente a amostra).
22. Armazenar a amostra a -20°C.