

**Protocolo de digestão em solução: Laboratório de Espectrometria de Massas
LN Bio**

(Nature Protocols, vol.3/no10/1630-1638; 2008, modificado)

Esse protocolo pode ser utilizado para análises que serão realizadas em ESI Q-ToF e LTQ Orbitrap Velos para misturas complexas.

Obs.: Utilizar até 100 µg de proteína em um volume máximo de 200 µl.

Reagentes (todos devem ser preparados no dia do uso)

1. Ureia 8M: massa molar 60.06g/mol; 480,48mg em 1 ml de água purificada.
2. Bicarbonato de amônio 100 mM: 100 mM de bicarbonato de amônio em água purificada (massa molar 79,06 g/mol; 158 mg em 20 mL de água purificada).
3. Bicarbonato de amônio 50 mM: 50 mM de bicarbonato de amônio em água purificada (massa molar 79,06 g/mol; 79 mg em 20 mL de água purificada).
4. Ditioneitol (DTT) 0.5M: 0.5M de DTT em bicarbonato de amônio 50 mM (massa molar 154.25g/mol; 77,12mg em 1mL de bicarbonato de amônio 50 mM).
5. Cloreto de cálcio (CaCl₂) 0.1M: 0,0110g em 1ml de água purificada (massa molar: 110.99g/mol).
6. Iodoacetamida (IAA) 0.5M: 0.5M de IAA em bicarbonato de amônio 50 mM (massa molar 184.96g/mol; 92,5 mg em 1ml de bicarbonato de amônio 50 mM).
7. Solução de Tripsina: 20 ng/µL (Sequence grade Modified Trypsin V5111-Promega): solubilizar em bicarbonato de amônio 50mM, alíquotar e armazenar a -20°C.

Procedimento

Dia 1

1. Adicionar ureia 8M (1:1) na solução.
2. Redução: adicionar solução de DTT 5 mM final. Incubar durante 25 minutos a 56°C.
3. Alquilação: adicionar solução de IAA 14 mM final. Incubar durante 30 minutos à temperatura ambiente protegido da luz.

4. Quench da IAA livre: adicionar solução de DTT 5 mM final. Incubar durante 15 minutos à temperatura ambiente protegido da luz.
5. Diluir a amostra 1:5 em 50mM de bicarbonato de amônio para reduzir a concentração da ureia para 1.6M.
6. Adicionar solução de CaCl₂ 1mM final.
7. Preparo da tripsina: 20 µg de tripsina em 1000 µL de bicarbonato de amônio 50 mM gelado. Concentração final da tripsina 20ng/µL.
8. Adicionar solução de tripsina (sugestão usar na proporção de 1:50 de enzima: substrato). Incubar durante 16 h a 37°C.

Dia 2

1. Parar a reação da enzima adicionando TFA (ácido trifluoacético) na concentração final de 0.4%. Verificar se o pH está abaixo de 2.0; caso não esteja adicionar mais TFA 0.4%. Para as amostras que não forem passar por dessalinização parar a reação com ácido fórmico 0.4% final.
2. Centrifugar a 2500g por 10 minutos em temperatura ambiente. Descartar o pellet.
3. Liofilizar as amostras que não tenham sal; do contrário proceder com o desalting dos peptídeos usando colunas de dessalinização como SepPack (Waters, C18) ou OASIS (Waters, HLB).
4. Armazenar a amostra a -20°C até a realização da análise.