

SERVICIO DE PROTEÓMICA Y GENÓMICA

INSTRUCCIONES PARA ENVIAR MUESTRAS AL SERVICIO

Es necesario previamente cumplimentar el formulario de solicitud disponible en la página web del Servicio que puede ser entregado al laboratorio en mano o adjuntarlo en el envío de las muestras.

<https://www.cib.csic.es/facilities/scientific-facilities/proteomics-and-genomics>

1) Determinación de masas moleculares por MALDI-TOF.

- Las disoluciones deben estar libres de sales, detergentes y contaminantes que puedan interferir con espectrometría de masas. Debe evitarse la presencia, entre otros, de compuestos como NaCl, KCl, CaCl₂, DMSO, DMF, Glicerol, Polietilenglicol, SDS, Triton X-100, Tween 80, N-octilglucósido, Urea y Cloruro de Guanidinio. No interfieren con espectrometría de masas compuestos como el β-Mercaptoetanol, DTT, Ácido Trifluoroacético, Ácido Fórmico, Ácido Acético, HCl, ni disolventes orgánicos volátiles. Los reactivos a utilizar deben ser de grado de pureza para HPLC y el agua debe ser milli-Q.

Para evitar estos inconvenientes recomendamos:

- Dializar la muestra.
 - Desalar la muestra mediante Zip-Tip, OMIX, etc. (puntas con resinas de fase reversa C4 o C18).
 - Proporcionar la muestra tan concentrada como sea posible para realizar la dilución con los solventes adecuados.
- Para el análisis por espectrometría de masas, la concentración de los péptidos debe ser del orden de los femtomoles. Para proteínas de alrededor de 20 kDa se necesitan algunos picomoles, y para proteínas mayor masa molecular se requieren decenas de picomoles.

El rango de masas para proteínas es de hasta unos 40 kDa y el error de masas es de aproximadamente la masa media de un aminoácido. El error de masa para péptidos es de unas 80 ppm.

2) Identificación de proteínas mediante la huella peptídica

- La muestra puede consistir en bandas de proteínas aisladas de geles monodimensionales (SDS-PAGE) o manchas proteicas procedentes de geles bidimensionales (IEF+SDSPAGE).

La concentración necesaria para poder analizar una proteína por espectrometría de masas es aquella en la que es posible visualizar la proteína aislada en un gel de poliacrilamida por cualquiera de los métodos anteriores (5 fmol/μl a 1 pmol/μl).

- Aquellas bandas que provienen de geles monodimensionales pueden contener una mezcla de proteínas que incrementará la dificultad del proceso de identificación por espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF. En estos casos se puede analizar la muestra mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas nLC-MS/MS (LTQ Orbitrap Velos o QExactive).

SERVICIO DE PROTEÓMICA Y GENÓMICA

- Durante todo el proceso de obtención de la muestra para su posterior análisis por espectrometría de masas se debe extremar la limpieza del material usado (vidrio, plástico, etc., lavados con agua milli-Q, no autoclavados).
- Es IMPRESCINDIBLE el uso de guantes (sin talco, ni polvo) en todo momento para evitar contaminaciones con queratinas, que se encuentran en el pelo, la piel, determinado tipo de ropa (lana), etc. SIEMPRE hay que impedir el contacto con las manos descubiertas, los cabellos desprendidos y la piel. Las queratinas son muy ubicuas e interfieren en la digestión e identificación de las proteínas de interés. Los bajos niveles de identificación pueden deberse a la contaminación por queratinas.

3) ELECTROFORESIS 1D

- Emplear disoluciones recientemente preparadas, utilizando H₂O milli-Q o de grado HPLC para todos los buffers de electroforesis y de tinciones.
- Los geles deben polimerizarse durante para toda una evitar la reactividad de la acrilamida no polimerizada con las proteínas durante la electroforesis.
- Hay que utilizar recipientes LIMPIOS para teñir los geles, sin BSA o caseína procedente de western blots previos, etc. De lo contrario estas proteínas imposibilitarán la correcta identificación de las proteínas de interés.
- Es necesario asegurarse de seguir un protocolo de tinción que sea compatible con espectrometría de masas. Muchos protocolos pueden ocasionar que las proteínas no sean aptas para el análisis por espectrometría de masas. Los geles pueden revelarse con las tinciones de Azul de Coomassie común o con Coomassie Coloidal. Es necesario incluir en un carril del gel estándares de peso molecular no modificados.

Los geles teñidos deben conservarse en ácido acético al 1 % o agua y enviarse a nuestro servicio lo antes posible. Es preferible realizar la adquisición de las imágenes del gel y la extracción de las bandas de interés en el servicio.

Si se decide lo contrario, hay que extremar el cuidado y asegurarse de usar superficies absolutamente limpias, y cuchillas o bisturís nuevos. Incluso las trazas de contaminantes podrían anular cualquier intento de analizar las proteínas. Si las muestras son bandas de un gel monodimensional, se deberán recortar (aprox. 1.5 -2.0 mm) con un bisturí y unas pinzas limpias; si son manchas proteicas de un gel bidimensional, se pueden recortar con una punta de micropipeta, evitando cantidades innecesarias de gel y mezcla de proteínas. La porción de gel que contiene la mancha proteica se deposita en un tubo marca eppendorf y se cubre con agua milli-Q. Se tiene que enviar un archivo con la imagen del gel.

- Muestras de usuarios externos. Deben enviarse las muestras liofilizadas o congeladas en disolución (el volumen no debe exceder los 20 μ l). En este último caso deben contener inhibidores de proteasas.

Otra posibilidad es enviar las muestras en el tampón de carga de electroforesis (el volumen no debe exceder los 30 μ l).

4) Identificación de proteínas mediante LC-MS/MS

SERVICIO DE PROTEÓMICA Y GENÓMICA

Instrucciones para el usuario:

- La muestra puede estar en gel o en solución.
- La cantidad mínima de muestra depende de los objetivos del trabajo (consultar con el personal del Servicio de Proteómica).
- Los extractos de proteínas se deben almacenar a -70°C y nunca volver a congelar tras su descongelación.
- Se debe estimar la cantidad de proteínas totales mediante algún método colorimétrico y/o corriendo un gel SDS-PAGE. En la preparación de los geles se seguirán las recomendaciones del punto 3 (ELECTROFORESIS 1D).

Para el análisis de Inmunoprecipitaciones (IP), Pull-Down, subproteomas o proteomas, ponerse en contacto con el personal técnico del Servicio para diseñar protocolo de análisis por espectrometría de masas acorde a los objetivos del trabajo y/o a las características de la muestra (origen, cantidad de proteína, solventes, etc.).

Nota:

El servicio no se hace responsable de los resultados obtenidos si las muestras no cumplen las condiciones especificadas en estas instrucciones.