

Preparación de muestra

- La cantidad mínima requerida es ~50 pmoles de muestra pura (proteína/péptido) transferida a membrana de PVDF. No obstante, siempre que sea posible se recomienda preparar ~100-200 pmoles.

La pureza de la muestra es un factor crítico, si ésta contiene varias proteínas, en cada ciclo de reacción aparecerán varios aminoácidos y no será posible asignar la secuencia.

- **Transferencia a membrana de PVDF**
 1. Utilizar geles comerciales prefabricados o dejar reposar los geles durante la noche anterior a su uso para eliminar los radicales libres que se forman durante la polimerización de la acrilamida. Añadir tioglicolato sódico 0.1 mM al tampón del cátodo. Estas medidas minimizan el riesgo de bloqueo del extremo N-terminal.
 2. Concentrar la muestra al máximo en el mínimo área de membrana posible (no mayor de 3 x 10 mm). Si es necesario, la muestra puede repartirse entre 3-4 pocillos de un mini gel. Conviene cargar el gel con proteína de más para compensar la pérdida que tiene lugar, en mayor o menor medida, durante la transferencia posterior. Es importante tener presente que una única banda puede contener varias proteínas, cada una de las cuales dará una secuencia distinta.
 3. La membrana se puede teñir con Coomassie Blue R-250*, Ponceau S[♦] o Amido black[#] (no teñir con plata). Se recomienda no teñir en exceso y utilizar soluciones de tinción preparadas recientemente.
 4. Después de desteñir, lavar extensivamente con H₂O Milli-Q para rebajar al máximo la concentración de glicina, Tris y otros restos de tampones provenientes de la transferencia que puedan interferir con la secuenciación de la proteína.
 5. Secar la membrana a temperatura ambiente y recortar la/s banda/s de interés con un bisturí limpio, evitando tomar membrana sin proteína. Poner las bandas recortadas en un tubo Eppendorf sellado con Parafilm. Enviar a temperatura ambiente.

**Coomassie blue R-250 (0.1% solution in 40% methanol/10% acetic acid) staining is carried out for 5 minutes followed by destaining (5-10 minutes) in a methanol solution (50% methanol).*

♦Ponceau S (0.2% solution in 1% acetic acid) staining is carried out for 1-2 minutes followed by a simple rinse with deionized water.

#Amido Black (0.1% Amido Black in 30% methanol/ 10% acetic acid). Destain by several washes in distilled water.

A rough and ready guide is if you can photocopy the bands then they can be sequenced.

- Todos los reactivos y solventes que se usen deben ser de la máxima pureza posible (grado HPLC, grado secuenciación o grado electroforesis). No utilizar reactivos grado biología molecular.
- Usar siempre guantes y trabajar en una zona limpia y libre de polvo. El polvo y las manos son la principal fuente de aminoácidos contaminantes.

Número de residuos (ciclos de reacción) a solicitar:

- ✓ Determinar el punto de corte en una proteína conocida: 4-6 residuos
- ✓ Confirmar la identidad de una proteína conocida: 5-10 residuos
- ✓ Diseñar un oligonucleótido para clonación: 10-20 residuos
- ✓ Identificar una proteína desconocida: mínimo 15 residuos

Bibliografía

Kaye D. Speicher, Nicole Gorman, and David W. Speicher. N-Terminal Sequence Analysis of Proteins and Peptides. *Current Protocols in Protein Science* 11.10.1-11.10.31. Published online August 2009 in Wiley Online Library .DOI:10.1002/0471140864.ps1110s57 <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471140864.ps1110s57/abstract>

Paul T. Matsudaira. *A Practical Guide to Protein and Peptide Purification*. Academic Press, Inc. San Diego, California. 1993.