

DIGESTIÓN TRIPTICA DE PROTEÍNAS SEPARADAS MEDIANTE ELECTROFORESIS (SDS-PAGE O 2D-PAGE) PARA POSTERIOR IDENTIFICACIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Geles Teñidos con Tinción de Coomasie

1. CORTE DE LAS MANCHAS:

Cortar las bandas o manchas con una hoja de bisturí o con una punta de pipeta recortada y depositar cada una en un pocillo de una placa de 96 pocillos o en tubos eppendorf.

2. LAVADO:

Realizar 2 lavados con agua milli-Q durante 10 min.

3. DESHIDRATACIÓN:

Añadir acetonitrilo (AcN) hasta que cubra la banda o mancha (20 μ l) y esperar 5 min para que el gel se deshidrate y libere el colorante. Repetir esta operación dos veces para que el gel quede más o menos blanco.

4. SECAR A VACÍO EN CENTRÍFUGA "SPEED-VAC".

5. REDUCCIÓN Y ALQUILACIÓN

1. Cubrir las bandas con una solución 10 mM Di-tio-treitol (DTT) en bicarbonato amónico 25 mM (NH_4HCO_3), 30 min a 56°C.
2. Dejar a temperatura ambiente, eliminar el DTT y añadir AcN que se retira rápidamente para incubar con Iodoacetamida 55mM (10 mg /ml) en 25 mM NH_4HCO_3 durante 15 min en oscuridad.

6. LAVADO

1. Incubar 5 min con AcN y retirarlo.
2. Añadir NH_4HCO_3 25 mM e incubar 5 min tras los cuales sin retirar el sobrenadante se añade igual volumen de AcN y se incuba 15 min.
3. Retirar el sobrenadante.

7. SECAR A VACÍO EN CENTRÍFUGA "SPEED-VAC"

8. DIGESTIÓN

1. Añadir tripsina en una concentración de 12,5 ng/ μ l en 25 mM de NH_4HCO_3 y en un volumen que cubra bastante por encima las bandas que ahora están deshidratadas. Incubar en hielo 45 min para que se absorba pero sin que llegue a actuar.
2. Retirar el sobrenadante y añadir NH_4HCO_3 25 mM hasta cubrir las bandas.
3. Incubar toda la noche a 37°C (o al menos 6 horas).
4. Tras la digestión agitar con vortex y centrifugar para pasar el sobrenadante a una nueva placa o tubos.

9. EXTRACCIÓN DE PÉPTIDOS

1. Cubrir las bandas con 50% AcN /0.5% ácido trifluoroacético(TFA) y sonicar 10 min. Pasar el sobrenadante a otro tubo o placa.
Repetir 3 veces esta operación recogiendo todos los sobrenadantes de cada extracción juntos.
2. Realizar otras tres extracciones con AcN de 10 min cada una y depositar los sobrenadantes junto con los de las tres extracciones anteriores.

10. JUNTAR TODOS LOS SOBRENADANTES

Secar en centrifuga "speed-vac" y resuspender en 5 μ l de 50% AcN en 0.1% TFA.