

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

# Geles Teñidos con Tinción Plata

### 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 mili-Q durante 10 min.

### 3. DESTEÑIDO:

Cubrir las bandas con la solución de desteñido e incubar 10 min.

**Solución de desteñido: 30 mM de ferrocianuro potásico (9.9 mg/ml) y 100 mM de tiosulfato sódico (24.8 mg/ml).**

### 4. LAVADO:

Con agua milli-Q para retirar la solución de desteñido.

### 5. DESHIDRATACIÓN:

Añadir acetonitrilo (AcN) hasta que cubra la banda o mancha (20  $\mu$ 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.

### 6. SECAR A VACÍO EN CENTRÍFUGA "SPEED-VAC".

### 7. REDUCCIÓN Y ALQUILACIÓN

1. Cubrir las bandas con una solución 10 mM Di-tio-treitol (DTT) en bicarbonato amónico 25 mM ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ), 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  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  durante 15 min en oscuridad.