

Protocolo de Preparo de Amostras via FASP (Filter Aided Sample Preparation)

Baseado em: Wisniewski, J.R., et al. *Nat Methods* 6, 359–362 (2009).

Objetivo: Preparo de amostras proteômicas utilizando filtros de corte de peso molecular (MWCO) para remoção de detergentes, troca de tampão e digestão.

1. MATERIAIS E REAGENTES

- **Dispositivo de Filtração:** Unidades Microcon YM-10 (10 kDa MWCO - Millipore) ou equivalente (e.g., Amicon Ultra 0.5 mL).
- **Tampão UA (denaturante):** Ureia 8 M em Tris-HCl 0,1 M, pH 8,5.
 - *Nota:* Preparar fresco ou verificar pH antes do uso para evitar carbamilação.
- **Agente redutor (DTT):** Ditioneitol 20 mM dissolvido em tampão UA.
- **Agente alquilante (IAA):** Iodoacetamida 50 mM dissolvida em tampão UA.
- **Tampão de digestão (ABC):** Bicarbonato de Amônio 50 mM em água ultrapura.
- **Enzima:** Tripsina (Sequencing Grade).
- **Parada de reação:** Ácido Trifluoroacético (TFA) 10%.

2. PREPARO E CARREGAMENTO DA AMOSTRA

1. **Condicionamento do filtro:** Insira a unidade de filtro no tubo coletor. Adicione 100 μ L de Tampão UA e centrifugue a 14.000 xg por 10 min para lavar a membrana (conforme recomendação do fabricante). Descarte o *flow-through* (líquido que passou pelo filtro).
2. **Carregamento:** Misture até 30 μ L do seu extrato proteico com 200 μ L de Tampão UA.
3. **Spin 1 (denaturação):** Transfira a mistura para o filtro. Centrifugue a 14.000 xg por 15 min.
 - *Objetivo:* Remover sais e detergentes de baixo peso molecular, restando as proteínas na membrana.
4. **Spin 2 (lavagem com Ureia):** Adicione 200 μ L de Tampão UA ao filtro. Centrifugue a 14.000 xg por 15 min.
5. **Descarte:** Remova o líquido do tubo coletor (*flow-through*).

3. REDUÇÃO E ALQUILAÇÃO “ON-FILTER”

1. **Redução:** Adicione 100 μ L de solução de DTT (20 mM em UA) sobre o filtro.
 - Agite suavemente (ou bata levemente com o dedo) para misturar.
 - Incube por 30 minutos à temperatura ambiente (RT) ou 56°C (cuidado com evaporação).
 - Centrifugue a 14.000 g por 10 min. Descarte o *flow-through*.
2. **Alquilação:** Adicione 100 μ L de solução de IAA (50 mM em UA) sobre o filtro.
 - Agite suavemente.
 - Incube por 30 minutos à temperatura ambiente no escuro.
 - Centrifugue a 14.000 xg por 10 min. Descarte o *flow-through*.

4. TROCA DE TAMPÃO (REMOÇÃO DA UREIA)

A ureia inibe a atividade da tripsina e deve ser removida antes da digestão.

1. **Lavagens com UA:** Adicione 100 μL de Tampão UA ao filtro e centrifugue a 14.000 xg por 15 min.
 - **Repita este passo mais 2 vezes** (Total de 3 lavagens com UA).
2. **Lavagens com ABC (Troca de tampão):** Adicione 100 μL de Tampão ABC (50 mM) ao filtro e centrifugue a 14.000 xg por 10 min.
 - **Repita este passo mais 2 vezes** (Total de 3 lavagens com ABC).
 - *Nota:* Após a última centrifugação, a membrana deve estar úmida, mas sem volume excessivo de líquido.

5. DIGESTÃO ENZIMÁTICA

1. **Adição de tampão de digestão:** Adicione 60 μL de Tampão ABC ao filtro.
2. **Controle pré-digestão (QC):** Pipete suavemente para cima e para baixo para ressuspender as proteínas na membrana.
 - *Ação:* Retire uma alíquota equivalente a 2 μg de proteína para análise em gel SDS-PAGE (controle de digestão – pré-digestão).
3. **Adição de Enzima:** Adicione tripsina à amostra no filtro na proporção enzima:proteína de 1:100 ou 1:200.
 - Misture suavemente (vortex leve ou pipetagem).
 - Feche bem a tampa (para evitar evaporação).
4. **Incubação:** Incube a câmara úmida a 37°C *Overnight* (O/N).

6. RECUPERAÇÃO DE PEPTÍDEOS (ELUIÇÃO)

1. **Transferência:** Transfira a unidade de filtro (parte superior) para um novo tubo coletor limpo (preferencialmente *LoBind*).
2. **Eluição 1:** Centrifugue a 14.000 xg por 10 min. Os peptídeos digeridos passarão através do filtro para o tubo coletor.
 - *Controle pós-digestão (QC):* Retire uma alíquota equivalente a 2 μg do filtrado para análise (controle de digestão – pós-digestão).
3. **Eluição 2 (lavagem da membrana):** Adicione 50 μL de Tampão ABC ao filtro. Centrifugue a 14.000 xg por 10 min. Junte este volume ao eluato anterior.
4. **Acidificação:** Adicione TFA 10% ao eluato final até atingir pH ~2 (Geralmente 2 a 3 μL são suficientes para o volume final de ~110 μL).
5. **Finalização:** Prossiga para a dessalinização (C18 ZipTip ou StageTip) conforme rotina do laboratório.

CHECKLIST DE ACOMPANHAMENTO PARA PROTOCOLO FASP - LETA

Responsável: _____ Nº de Amostras: _____ Data: ____/____/____

Centrífuga: 14.000 xg Filtro: Microcon 10kDa (YM-10)

1. LIMPEZA E CARREGAMENTO

Status	Passo	Volume/Ação	Tempo / Spin
[]	Condicionar	100 µL Tampão UA (no filtro).	10 min
[]	Mix Amostra	30 µL Extrato + 200 µL Tampão UA.	N/A
[]	Carregar	Transferir mix para filtro.	15 min
[]	Lavagem UA	Add 200 µL Tampão UA.	15 min
[]	Descarte	Esvaziar tubo coletor (<i>Flow-through</i>).	-

2. REDUÇÃO E ALQUILAÇÃO (ON-FILTER)

Status	Passo	Reagente	Condição	Spin
[]	Redução	100 µL DTT (20 mM em UA)	30 min (RT ou 56°C)	10 min
[]	Descarte	Esvaziar coletor	-	-
[]	Alquilação	100 µL IAA (50 mM em UA)	30 min (escuro, RT)	10 min
[]	Descarte	Esvaziar coletor	-	-

3. LAVAGENS E TROCA DE TAMPÃO

Etapa crítica para remover a Ureia.

Status	Repetição	Tampão	Volume	Spin (14.000 xg)
[]	1x	UA Buffer	100 µL	15 min
[]	2x	UA Buffer	100 µL	15 min
[]	3x	UA Buffer	100 µL	15 min
[]	1x	ABC Buffer	100 µL	10 min
[]	2x	ABC Buffer	100 µL	10 min
[]	3x	ABC Buffer	100 µL	10 min

4. DIGESTÃO (ON-FILTER)

Status	Ação	Detalhes
[]	Ressuspensão	Add 60 µL ABC.
[]	QC Point 1	Retirar alíquota (Pré-digestão).
[]	Enzima	Add tripsina (1:100 ou 1:200). Misturar levemente.
[]	Incubação	37°C, Overnight, Câmara úmida. (Início: ____:____)

