

## Protocolo de Preparo de Amostras via MAP (Miniprep Assisted Proteomics)

**Baseado em:** Mousseau, C. B., et al. Anal. Methods, 15, 916 (2023).

**Objetivo:** Preparo rápido e de baixo custo de amostras proteômicas utilizando colunas de *miniprep* de DNA para limpeza de detergentes (SDS) e digestão.

### 1. MATERIAIS E REAGENTES CRÍTICOS

- **Colunas de Spin:** Colunas de sílica para *miniprep* de DNA (e.g., Epoch Life Science, Bioneer ou equivalentes genéricos de kits de plasmídeo).
- **Acetato d Amônio (AmAcet):** Solução estoque 5 M, ajustada para pH 5.0.
- **Tampão de ligação/lavagem (Binding/Wash Buffer):** 95% Metanol : 5% Bicarbonato de Amônio (ABC) 500 mM.
  - **Preparo:** Misturar 95 mL de Metanol com 5 mL de ABC 500 mM.
- **SDS (Dodecil Sulfato de Sódio):** Para solubilização (até 6% é tolerado).
- **Agentes de redução/alquilação:** TCEP e Iodoacetamida (IAA).
- **Enzima:** Tripsina (Sequencing Grade).
- **Soluções de Eluição:**
  - E1: 0.1% Ácido Fórmico (FA) em água.
  - E2: 0.2% FA em 50% Acetonitrila (ACN).

### 2. PREPARO DA AMOSTRA (LISE, REDUÇÃO E ALQUILAÇÃO)

1. **Solubilização:** Ressuspenda/dilua a amostra em 50 mM ABC contendo SDS (concentração final de SDS pode ser de 1% a 6%).
  - *Volume sugerido de trabalho:* 50 µL.
2. **Redução:** Adicione TCEP para uma concentração final de 10 mM.
  - Incube a 95°C por 3 min (desnaturação térmica).
3. **Alquilação:** Adicione IAA para uma concentração final de 20 mM.
  - Incube no **escuro** por 30 min a temperatura ambiente.

### 3. PROTOCOLO MAP: LIGAÇÃO E LAVAGEM

1. **Ajuste de força iônica:** Adicione **Acetato de Amônio 5 M (pH 5.0)** à amostra na proporção de 1:10 (v/v).
  - **Exemplo:** Para 50 µL de amostra, adicione 5 µL de AmAcet 5 M.
  - **Nota:** Se necessário, complete o volume com ABC 50 mM para manter um padrão (e.g, 50 µL totais antes da adição do solvente).
2. **Precipitação/ligação:** Adicione 7 volumes do **Tampão de Ligação** (95% MeOH : 5% ABC 500 mM).
  - **Exemplo:** Para ~50 µL de amostra, adicione 350 µL do tampão.
  - Misture bem (vortex).
3. **Carregamento (loading):**
  - Transfira a mistura para a coluna de miniprep.
  - Centrifugue a 1.200 xg por 30 segundos.
  - Descarte o *flow-through*.

#### 4. Lavagem (washing):

- Adicione ao filtro o mesmo volume usado no passo de ligação (e.g., ~350-400  $\mu$ L) ou volume suficiente para cobrir (e.g., 500  $\mu$ L) do **Tampão de Lavagem** (95% MeOH : 5% ABC 500 mM).
- Centrifugue a 1.200 xg por 30 segundos.
- Repita a lavagem mais uma vez (Total de 2 lavagens).
- Descarte o *flow-through* e coloque a coluna em um tubo limpo se necessário.

#### 4. DIGESTÃO ENZIMÁTICA (ON-COLUMN)

1. **Preparo da Enzima:** Ressuspenda a tripsina em ABC 50 mM.
2. **Adição:** Adicione a solução de tripsina diretamente sobre a membrana da coluna.
  - **Proporção:** 1:100 (enzima:proteína).
  - Adicione tampão ABC 50 mM extra se necessário para cobrir a membrana (volume total ~50  $\mu$ L).
3. **Incubação:** Feche a coluna (use Parafilme se a tampa não vedar bem) e incube a 37°C por 8 horas (ou Overnight) em câmara úmida.
  - **Nota:** Certifique-se de que a membrana não seque.

#### 5. ELUIÇÃO DE PEPTÍDEOS

1. **Recuperação Inicial:** Transfira a coluna para um tubo coletor novo (LoBind).
  - Centrifugue a 1.200 xg por 30 segundos para coletar o digerido.
2. **Lavagem/Eluição 1:** Adicione **100  $\mu$ L de Solução E1** (0.1% FA em água) à coluna.
  - Centrifugue e colete no mesmo tubo.
3. **Lavagem/Eluição 2:** Adicione **150  $\mu$ L de Solução E2** (0.2% FA em 50% ACN) à coluna.
  - Centrifugue e colete no mesmo tubo.
4. **Secagem:** Seque o eluato combinado em SpeedVac.
5. **Finalização:** Ressuspenda em 0.1% FA para dessalinização (StageTip/C18) ou injeção direta.

## CHECKLIST DE ACOMPANHAMENTO PARA PROTOCOLO MAP - LETA

Responsável: \_\_\_\_\_ Nº de Amostras: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Centrífuga: 1.200 xg (Baixa velocidade para não compactar demais a resina/membrana)

### 1. PREPARO DE SOLUÇÕES

Status	Item	Detalhes
[ ]	AmAcet 5 M	pH 5.0.
[ ]	Binding Buffer	95 mL Metanol + 5 mL ABC 500 mM. (Manter fechado - volátil).
[ ]	Amostra	Vol: 50 µL. Tampão: 50 mM ABC + SDS (até 6%).

### 2. REDUÇÃO E ALQUILAÇÃO (PRÉ-COLUNA)

Status	Passo	Condição	Tempo
[ ]	Redução	Add TCEP (10 mM final).	<b>95°C</b> , 3 min.
[ ]	Resfriar	Deixar chegar a Temp. Ambiente.	-
[ ]	Alquilação	Add CAA (20 mM final).	<b>30 min</b> , escuro.

### 3. LIGAÇÃO (BINDING) E LAVAGEM

Use colunas de Miniprep de DNA.

Status	Passo	Ação / Volume	Spin (1200 x g)
[ ]	Sal (AmAcet)	Add 5 µL de AmAcet 5 M (para 50 µL amostra).	-
[ ]	Solvente	Add 350 µL de Binding Buffer (7x vol). Vortex.	-
[ ]	Load	Transferir tudo para a coluna.	30 seg
[ ]	Wash 1	Add 350-500 µL Binding Buffer.	30 seg
[ ]	Wash 2	Add 350-500 µL Binding Buffer.	30 seg
[ ]	Descarte	Eliminar todo o <i>flow-through</i> .	-

### 4. DIGESTÃO (ON-COLUMN)

Status	Passo	Detalhes
[ ]	Enzima	Add Tripsina (1:100) em 50 µL de ABC 50 mM.
[ ]	Incubação	37°C, 8h - Overnight. (Câmara úmida).
	<i>Início:</i>	___ : ___

