

Protocolo para Preparação de amostras via MStern Blotting (96-well PVDF)

Baseado em: Berger, S. T., et al. *Mol. Cell. Proteomics* 14, 2814–2823 (2015).

Objetivo: Preparação de amostras proteômicas de alto rendimento (High-Throughput) utilizando placas de filtração com membrana de PVDF hidrofóbica para limpeza e digestão de proteínas.

1. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

- **Placas de filtração:** Placas de 96 poços com membrana de PVDF hidrofóbica de 0.45 µm (Ex: Millipore MultiScreen-HV, Cat# MSIPS4510).
- **Sistema de Vácuo:** *Manifold* de vácuo compatível com placas de 96 poços.
- **Placa coletora:** Placa de 96 poços para recolha de eluato (fundo em V ou U).
- **Tampão de lise/ureia (UA):** 8 M Ureia em 50 mM Bicarbonato de Amônio (ABC) ou Tris-HCl, pH 8.0 - 8.5.
- **Tampão de digestão (ABC):** 50 mM Bicarbonato de Amônio.
- **Soluções de lavagem:**
 - Metanol (MeOH) grau HPLC.
 - Acetona (Opcional, dependendo da variante do protocolo).
- **Reagentes de redução/alquilação:** DTT e Iodoacetamida (IAA).
- **Enzima:** Tripsina (Sequencing Grade).
- **Solução de eluição final:** 40-50% Acetonitrila (ACN) / 0.1% Ácido Fórmico (FA).

2. PREPARAÇÃO DA PLACA E AMOSTRAS

1. **Lise e desnaturação:**
 - Prepare as amostras no Tampão de Ureia (UA).
 - Se as amostras contiverem SDS, certifique-se de diluir a amostra com Ureia 8M para garantir que a concentração de SDS seja < 0.1% antes da digestão, embora o PVDF tolere algum detergente durante a ligação.
 - Quantidade de proteína recomendada: 10 a 30 µg por poço.
 - Volume final da amostra: ~100 µL.
2. **Redução e alquilação (em solução):**
 - Adicione DTT (concentração final 5-10 mM). Incube a 56°C por 30 min ou TA por 45 min.
 - Adicione IAA (concentração final 20 mM). Incube no escuro por 30 min.
 - **Nota:** Estas etapas podem ser feitas diretamente na placa se o volume permitir, mas é recomendado fazer antes do carregamento para uniformidade.

3. ATIVAÇÃO E CARREGAMENTO (BINDING)

As membranas de PVDF são hidrofóbicas e precisam de ser ativadas (molhadas) para permitir o fluxo e a ligação correta das proteínas.

1. **Ativação da Membrana:**
 - Aplique 150 µL de Metanol 70% ou 100% em cada poço.
 - Aplique vácuo suave até todo o líquido passar.
 - Equilibre com 150 µL de Tampão UA. Aplique vácuo.
2. **Carregamento das Proteínas:**
 - Transfira as amostras (em Ureia 8M) para os poços.
 - Aplique vácuo **suave**. A velocidade de fluxo deve ser lenta (aprox. 1-2 gotas/segundo) para maximizar a adsorção das proteínas às fibras do PVDF.
 - *Dica:* Se a amostra for muito diluída, pode carregar múltiplas vezes no mesmo poço.

4. LAVAGEM (WASHING)

Remoção de contaminantes não ligados (sais, detergentes).

1. **Lavagem com Ureia:**
 - Adicione 150 µL de Tampão UA a cada poço.
 - Aplique vácuo até esvaziar.
 - Repita mais 1 vez (Total 2x).
2. **Lavagem para Digestão (Troca de Tampão):**
 - Adicione 150 µL de Tampão ABC 50 mM.

- Aplique vácuo até esvaziar.
- **Repita mais 1 vez** (Total 2x).
- **Importante:** Não deixe a membrana secar completamente após a última lavagem, pois isso pode desnaturar irreversivelmente as proteínas de forma a dificultar a digestão ou inativar a tripsina adicionada.

5. DIGESTÃO ENZIMÁTICA

1. **Adição da Enzima:**
 - Adicione 50 µL de Tampão ABC contendo Tripsina.
 - Proporção enzima:proteína recomendada: 1:25 a 1:50.
2. **Incubação:**
 - Sele a placa com uma folha adesiva ou tampa adequada para evitar evaporação.
 - Incube a 37°C por 2 horas (digestão rápida devido à estrutura aberta do PVDF) ou Overnight.
 - Certifique-se de que a placa está numa câmara húmida.
 - *Nota:* Durante a digestão, **NÃO** aplique vácuo. O líquido deve permanecer no poço.

6. ELUIÇÃO DE PEPTÍDEOS

Diferente do FASP (onde os peptídeos passam pelo filtro), no MStern os peptídeos devem ser soltos da interação hidrofóbica com o PVDF.

1. **Preparo para Recolha:**
 - Coloque uma placa de coleta limpa (Deep Well ou PCR plate) dentro do manifold, por baixo da placa de filtração.
2. **Eluição 1 (aquosa):**
 - Aplique vácuo suave para recolher o tampão de digestão (que contém a maioria dos peptídeos hidrofílicos).
3. **Eluição 2 (orgânica - crítica):**
 - Muitos peptídeos (especialmente os hidrofóbicos) permanecerão ligados ao PVDF.
 - Adicione 50 - 75 µL de 40-50% ACN / 0.1% FA.
 - Aguarde 1-2 minutos para dissolução/interação.
 - Aplique vácuo para recolher no mesmo poço da placa de baixo.
4. **Secagem:**
 - Leve a placa de recolha ao SpeedVac para remover o ACN e reduzir o volume.
 - Acidifique se necessário e prossiga para LC-MS/MS.

CHECKLIST DE ACOMPANHAMENTO PARA PROTOCOLO MStERN BLOTTING (96-WELL) - LETA

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

Placa: 0.45µm PVDF

1. Preparação do Sistema

Status	Passo	Detalhes
[]	Montagem	Manifold de vácuo + Placa MStern (descarte por baixo).
[]	Ativação	150 µL Metanol. Vácuo até passar.
[]	Equilíbrio	150 µL Ureia 8 M (UA). Vácuo até passar.

2. Carregamento da Amostra

Status	Passo	Composição	Vácuo
[]	Amostra	Proteína (~30µg) em Ureia 8 M (reduzida/alquilada).	-
[]	Load	Adicionar ~100 µL amostra/poço.	Suave (Lento)
[]	Check	Todos os poços vazios?	-

3. Lavagens (Wash)

Remoção de contaminantes.

Status	Repetição	Solução	Volume	Vácuo
[]	1x	Tampão UA (8 M Ureia)	150 µL	Sim
[]	2x	Tampão UA (8 M Ureia)	150 µL	Sim
[]	1x	ABC 50 mM	150 µL	Sim
[]	2x	ABC 50 mM	150 µL	Sim
[]	Atenção	<i>Não secar excessivamente a membrana aqui!</i>	-	-

4. Digestão

Status	Passo	Detalhes
[]	Enzima	Add 50 µL ABC c/ Tripsina (1:25).
[]	Selagem	Cobrir placa (Parafilme/Tampa adesiva).
[]	Incubação	37°C, 2h ou O/N. (Sem Vácuo).
	<i>Início:</i>	_____ : _____

5. Eluição (Recolha)

Inserir Placa de Recolha Limpa no Manifold!

Status	Passo	Solução	Volume	Vácuo
[]	Eluição 1	Líquido da digestão (já nos poços).	-	Sim
[]	Eluição 2	Add 40% ACN / 0.1% FA.	50-75 µL	Sim
[]	Final	Levar placa coletora ao SpeedVac.	-	-

