

Protocolo para preparo de amostras via SP3 (Single-Pot Solid-Phase-Enhanced Sample Preparation)

Baseado em: Hughes, C.S., et al. *Nat Protoc* 14, 68–85 (2019).

Objetivo: Limpeza de amostras proteicas (removal of detergents/salts), digestão e recuperação de peptídeos para análise proteômica.

1. MATERIAIS E REAGENTES CRÍTICOS

- **Beads Magnéticas:** SpeedBeads Magnetic Carboxylate.
 - Tipo A (Hidrofílicas): **Cat# 45152105050250**
 - Tipo B (Hidrofóbicas): **Cat# 65152105050250**
- **Soluções de Lavagem:** Etanol 80% (preparado na hora - *freshly made*).
- **Tampão de digestão:** Bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3) 100 mM.
- **Enzimas:** Tripsina (sequencing grade) e LysC (opcional).
- **Agentes de redução (escolher um):** Ditioneitol (DTT) ou Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP).
- **Agentes de alquilação (escolher um):** Iodoacetamida (IAA) ou Cloroacetamida (CAA).

2. PREPARO DA SUSPENSÃO DE BEADS (CLEAN-UP DAS ESFERAS)

As *beads* comerciais são mantidas em azida, que inibe o crescimento microbiano. É necessário lavá-las antes do uso.

1. **Homogeneização do estoque:** Antes de pipetar, **sonique os frascos originais** das beads para desfazer aglomerados.
2. **Mistura (Mix 1:1):** Combine volumes iguais dos dois tipos de beads (e.g., 100 μL de Tipo A + 100 μL de Tipo B) em um microtubo único.
 - **Nota:** A concentração original é 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (ou 50 mg/mL).
3. **Lavagem:**
 - Coloque o tubo no rack magnético e aguarde 1 min (ou até a solução clarear). Descarte o sobrenadante com pipeta (não verter).
 - Adicione 500 μL de água ultrapura (Milli-Q), retire do imã, ressuspensa gentilmente, volte ao imã e descarte o sobrenadante.
 - **Repita este processo de lavagem 3 vezes.**
4. **Ressuspensão final:** Ressuspensa as beads lavadas em água ultrapura no mesmo volume inicial da mistura (e.g., se misturou 100 + 100 μL , ressuspensa em 200 μL).
 - **Concentração final de uso:** 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

3. PREPARO DA AMOSTRA: REDUÇÃO E ALQUILAÇÃO

Antes de iniciar a ligação às beads, as pontes dissulfeto devem ser reduzidas e alquiladas. Ajuste o volume da sua amostra (lisado proteico) conforme necessário.

Recomendação de input de proteína: 50 – 100 μg .

A. Redução (escolha uma opção)

- **Opção 1 (DTT):** Adicione DTT para uma concentração final de **5 a 10 mM**. Incube a 56°C por 30 minutos.
- **Opção 2 (TCEP):** Adicione TCEP para uma concentração final de **5 a 10 mM**.

B. Alquilação (escolha uma opção)

Após a redução, resfrie a amostra à temperatura ambiente antes de prosseguir se tiver usado DTT.

- **Opção 1 (IAA):** Adicione Iodoacetamida para uma concentração final de **20 mM**. Incube no **escuro** por 30 minutos a RT.
- **Opção 2 (CAA):** Adicione Cloroacetamida para uma concentração final de **20 mM**. Incube no **escuro** por 30 minutos a RT.

4. PROTOCOLO SP3: LIGAÇÃO E LAVAGEM

Cálculo da quantidade de beads: Utilize uma proporção de **10:1 (bead:proteína)**.

Exemplo: Para 50 µg de proteína, utilize 500 µg de beads.

Como a suspensão está a 50 µg/µL, adicione **10 µL de beads**.

1. **Ajuste de pH:** Verifique se a amostra está em pH neutro (7.0 – 8.0).
2. **Adição das beads:** Adicione o volume calculado de beads lavadas à amostra.
3. **Homogeneização:** Faça homogeneização suave para garantir a mistura.
4. **Binding (ligação):**
 - Adicione um volume de **Etanol 100% (absoluto)** igual ao volume total da mistura (amostra + beads). A concentração final de etanol deve ser **50%**.
 - Incube por **5 minutos** em agitador (Thermomixer) a 1.000 rpm, temperatura ambiente.
5. **Remoção do sobrenadante:**
 - Coloque os tubos no rack magnético por **5 minutos**.
 - Remova e descarte cuidadosamente o sobrenadante.
6. **Etapas de lavagem (washing):**
 - Adicione **180 µL de Etanol 80%** (fresco).
 - Incube por 5 min no agitador, RT, 1.300 rpm.
 - Coloque no rack magnético, aguarde a separação e descarte o sobrenadante.
 - **Repita a lavagem com etanol mais 2 vezes (total de 3 lavagens).**

ATENÇÃO: Não utilize sonicador durante as etapas de lavagem com as proteínas já ligadas às beads, pois isso pode causar cisalhamento e perda de amostra.

5. DIGESTÃO ENZIMÁTICA

1. **Ressuspensão:** Adicione 50 a 100 µL de bicarbonato de amônio (AmBic) 100 mM às beads secas.
2. **Digestão (escolha o fluxo):**
 - *Fluxo Padrão:* Adicione **Tripsina** na proporção enzima:proteína de **1:100**. Incube a 37°C, *overnight* (O/N), sob agitação de 1.300 rpm (para evitar sedimentação das beads).
 - *Fluxo Opcional (sequencial):*
 1. Adicione **LysC** (1:250). Incube a 42°C, 2h, 1.300 rpm.
 2. Adicione **Tripsina** (1:100). Incube a 37°C, O/N, 1.300 rpm.

6. RECUPERAÇÃO DE PEPTÍDEOS (ELUIÇÃO)

1. Após a digestão, centrifugue os tubos a 20.000 xg por 2 minutos. Isso ajuda a precipitar qualquer bead que esteja na tampa ou paredes e compactar o pellet magnético.
2. Coloque os tubos no rack magnético por 10 minutos (tempo extra para garantir total imobilização das beads).
3. Recupere cuidadosamente o sobrenadante (contendo os peptídeos) e transfira para um novo tubo (preferencialmente *LoBind*).
4. Seque as amostras em SpeedVac para armazenamento ou ressuspensão subsequente para injeção no sistema LC-MS/MS.

Resumo das Precauções

- Sonicar as beads apenas no frasco de estoque (antes da ligação da proteína).
- Nunca sonicar após adicionar a proteína às beads.
- Sempre preparar **Etanol 80% fresco** para as lavagens.
- Misturar beads Hidrofílicas e Hidrofóbicas (1:1) para maximizar a cobertura do proteoma.

CHECKLIST DE ACOMPANHAMENTO PARA PROTOCOLO SP3 - LETA

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

1. PREPARO DAS BEADS (SPEEDBEADS)

Volume por amostra: 10 µL (para 50 µg de proteína)

Volume total a preparar: _____

Status	Passo	Detalhes
[]	Mix Inicial	Misturar beads A (Hidrofílicas) + beads B (Hidrofóbicas) na proporção 1:1.
[]	Lavagem 1	Rack magnético (1 min). Descartar sobrenadante. Add volume total de H ₂ O Milli-Q.
[]	Lavagem 2	Rack magnético. Descartar sobrenadante. Add volume total de H ₂ O Milli-Q.
[]	Lavagem 3	Rack magnético. Descartar sobrenadante. Add volume total de H ₂ O Milli-Q.
[]	Ressuspensão	Ressuspender no volume inicial com H ₂ O Milli-Q. (Conc: 50 µg/µL).

2. REDUÇÃO E ALQUILAÇÃO (PROTEIN CLEANUP)

Status	Etapa	Condição escolhida (círculo)
[]	Redução	DTT (56°C, 30 min) ou TCEP (RT).
[]	Resfriar	Deixar amostra chegar a Temp. Ambiente (se aquecida).
[]	Alquilação	IAA (20 mM) ou CAA (20 mM). 30 min no escuro (RT).

3. LIGAÇÃO (BINDING) E LAVAGEM (WASHING)

ATENÇÃO: Não sonicar as amostras a partir daqui! Prepare Ethanol 80% fresco agora. Na etapa de Binding, considere a soma dos volumes (amostra inicial + redutor + alquilante + beads) para adicionar igual volume de etanol.

Status	Passo	Detalhes
[]	Add Beads	Adicionar 10 µL de beads lavadas por amostra (vortex suave).
[]	Binding	Add volume igual (1:1) de Etanol 100%. Agitar 1000 rpm, 5 min, RT.
[]	Separação	Rack magnético (5 min). Descartar sobrenadante.
[]	Wash 1	Add 180 µL Etanol 80%. Agitar 1.300 rpm, 5 min. Magneto → Descarte.
[]	Wash 2	Add 180 µL Etanol 80%. Agitar 1.300 rpm, 5 min. Magneto → Descarte.
[]	Wash 3	Add 180 µL Etanol 80%. Agitar 1.300 rpm, 5 min. Magneto → Descarte.
[]	Secagem	Remover qualquer residual de etanol com pipeta fina. Não deixar secar excessivamente.

4. DIGESTÃO ENZIMÁTICA

Status	Passo	Detalhes
[]	Tampão	Ressuspender beads em 50 - 100 µL de AmBic 100 mM.
[]	Enzima	Adicionar Tripsina (1:100) e/ou LysC (1:250).
[]	Incubação	37°C, Overnight, agitação 1.300 rpm (evitar sedimentação).
	Hora Início:	_____ : _____

