

Protocolo para Preparação de Amostras via S-Trap

Baseado em: Zougman, A., et al. *Proteomics* 14, 1006–1000 (2014) e recomendações do fabricante (Protifi).

Objetivo: Remoção de contaminantes (SDS), digestão rápida e eficiente utilizando colunas de centrifugação com matriz de quartzo.

1. MATERIAIS E REAGENTES

- **Colunas:** S-Trap™ Micro Spin Columns (Protifi).
- **Tampão de lise (Lysis Buffer):** 2% SDS em 50 mM TEAB (Bicarbonato de Trietilamônio) ou ABC (Bicarbonato de Amônio), pH 7.5 – 8.0.
- **Ácido fosfórico:** Solução a 12% (H_3PO_4) em água.
- **Tampão de ligação/lavagem (Binding/Wash Buffer):** 90% Metanol, 100 mM TEAB (pH final ~7.1).
- **Tampão de digestão:** 50 mM TEAB ou ABC.
- **Enzimas:** Tripsina/LysC (sequencing grade).
- **Soluções de Eluição:**
 - *Eluição 1:* 50 mM TEAB ou ABC.
 - *Eluição 2:* 0.2% Ácido Fórmico (FA) em água.
 - *Eluição 3:* 50% Acetonitrila (ACN), 0.2% FA.

2. LISE, REDUÇÃO E ALQUILAÇÃO

1. **Lise:** Solubilize a amostra no Tampão de Lise (2% SDS). Sonique se necessário para clarificar e cisalhar o DNA.
2. **Redução:** Adicione DTT (final 20 mM). Incube a 55°C por 15 min ou 95°C por 3 min. Resfrie à temperatura ambiente.
3. **Alquilação:** Adicione IAA (final 40 mM). Incube a temperatura ambiente no escuro por 30 min.
 - *Volume sugerido:* Mantenha o volume inicial da amostra em 25-50 µL para facilitar a etapa seguinte.

3. ACIDIFICAÇÃO E FORMAÇÃO DE SUSPENSÃO

Esta etapa é crítica. O SDS precipita em pH baixo e altas concentrações de metanol, formando partículas finas que são capturadas pelo filtro.

1. **Acidificação:** Adicione **12% Ácido Fosfórico** na proporção de **1:10** em relação ao volume da amostra.
 - *Exemplo:* Para 50 µL de lisado, adicione 5 µL de ácido fosfórico 12%.
 - **Verificação:** O pH deve estar ácido (pH < 1).
2. **Ligação (binding):** Adicione **Tampão de Ligação (90% MeOH)** numa proporção de **6:1** (ou 7:1) em relação ao volume total acidificado.
 - *Exemplo:* Se tem 55 µL (amostra + ácido), adicione ~330-385 µL de Tampão de Ligação.
3. **Mistura:** Vortexar imediatamente e vigorosamente. A solução deve ficar turva (precipitação coloidal).

4. CARREGAMENTO E LAVAGEM (S-TRAP SPIN)

Nota: Use tubos de 1.5 mL ou 2.0 mL como coletores.

1. **Carregamento:** Transfira a mistura coloidal para a coluna S-Trap Micro.
2. **Centrifugação:** Centrifugue a **4.000 xg por 30 segundos**.
 - Descarte o *flow-through*.
 - Se o volume for maior que a capacidade da coluna, repita o carregamento.
3. **Lavagem (Wash):**
 - Adicione **150 µL de Tampão de Ligação** (90% MeOH).
 - Centrifugue a **4.000 xg por 30 segundos**. Descarte o *flow-through*.
 - **Repita esta etapa mais 2 vezes** (Total de 3 lavagens).
 - *Opcional:* Rode uma vez a seco (spin de 1 min) para remover excesso de metanol, ou use pipeta para remover residuais.

5. DIGESTÃO ENZIMÁTICA

1. **Transferência:** Coloque a coluna num tubo coletor novo (apenas para segurança, a digestão ocorre na coluna).
2. **Adição de Enzima:** Adicione a solução de Tripsina (em 50 mM TEAB/ABC) diretamente sobre o filtro.
 - *Proporção:* 1:25 a 1:50 (enzima:proteína).
 - *Volume:* Aproximadamente 20-25 µL (o suficiente para embeber a matriz sem vazar).
3. **Incubação:** Não centrifugue imediatamente. Feche a coluna (evite secar) e incube a 37°C ou 47°C por 1 hora (digestão rápida) ou Overnight (convencional).
 - *Dica:* Adicione um pequeno volume de água no fundo do tubo coletor e feche bem para criar uma câmara húmida.

6. ELUIÇÃO DE PEPTÍDEOS

A eluição no S-Trap é sequencial para recuperar peptídeos hidrofílicos e hidrofóbicos.

1. **Recuperação:** Transfira a coluna para um tubo de eluição final (LoBind).
2. **Eluição 1:** Adicione **40 µL de 50 mM TEAB** (ou ABC). Centrifugue a 4.000 xg por 1 min.
3. **Eluição 2:** Adicione **40 µL de 0.2% Ácido Fórmico** aquoso. Centrifugue a 4.000 xg por 1 min.
4. **Eluição 3:** Adicione **40 µL de 50% ACN / 0.2% Ácido Fórmico**. Centrifugue a 4.000 xg por 1 min.
5. **Secagem:** Junte todos os eluatos no mesmo tubo e seque em SpeedVac.

CHECKLIST DE ACOMPANHAMENTO PARA: S-TRAP MICRO - LETA

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

Centrífuga: 4.000 x g

1. LISE E PREPARAÇÃO

Status	Passo	Detalhes	Tempo / Temp
[]	Lise	Amostra em 2% SDS (Vol: ~50 µL).	-
[]	Redução	Add DTT.	55°C (15') ou 95°C (3')
[]	Alquilação	Add IAA.	30' (Escuro/RT)

2. ACIDIFICAÇÃO E SUSPENSÃO (CRÍTICO!)

Status	Passo	Reagente	Vol (Exemplo)	Check
[]	Ácido	H ₃ PO ₄ 12% (1:10 vol).	5 µL em 50 µL	pH < 1
[]	Binding	Buffer 90% MeOH (6:1 vol).	330 µL	Turvação (OK)
[]	Mix	Vortex vigoroso.	-	-

3. CARREGAMENTO E LAVAGEM (S-TRAP SPIN)

Status	Passo	Ação	Spin (4000g)
[]	Load	Transferir mistura para a coluna.	30 seg
[]	Wash 1	Add 150 µL Binding Buffer.	30 seg
[]	Wash 2	Add 150 µL Binding Buffer.	30 seg
[]	Wash 3	Add 150 µL Binding Buffer.	30 seg
[]	Dry	Remover residual/Spin a seco.	-

4. DIGESTÃO

Status	Passo	Detalhes
[]	Mudar Tubo	Colocar coluna em tubo limpo (para incubação).
[]	Enzima	Add 20-25 µL Tripsina (1:25) em TEAB/ABC.
[]	Incubação	37°C / 47°C. 1h ou O/N. (Câmara húmida).
	<i>Início:</i>	_____ : _____

5. ELUIÇÃO SEQUENCIAL

Todas as eluições no mesmo tubo final (LoBind).

Status	Eluição	Solução	Volume	Spin (4000g)
[]	1 ^a	50 mM TEAB/ABC	40 µL	1 min
[]	2 ^a	0.2% FA (Aq)	40 µL	1 min
[]	3 ^a	50% ACN / 0.2% FA	40 µL	1 min
[]	Fim	Levar ao SpeedVac.	-	-

