

Protocolo para Preparação de Amostras via PreOmics iST (in-StageTip)

Baseado em: Kulak, N. A., et al. *Nat Methods* 11, 319–324 (2014) e manuais do fabricante (PreOmics GmbH).

Objetivo: Preparação rápida, robusta e reprodutível de amostras para proteómica *bottom-up* com intervenção manual mínima.

1. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

- **Kit PreOmics iST:** Inclui cartuchos, tubos de recolha (Waste/Collection), adaptadores e reagentes.
- **Bloco Térmico (Heating Block):** Capaz de agitação (ex: Eppendorf Thermomixer) para temperaturas de 37°C e 95°C.
- **Centrífuga:** Para tubos de 1.5/2.0 mL (velocidade necessária: 3.800 x g).
- **Reagentes (Fornecidos no Kit):**
 - **LYSE:** Tampão de lise/desnaturação/redução/alquilação.
 - **DIGEST:** Enzimas liofilizadas (Tripsina/LysC).
 - **STOP:** Solução de paragem (ácida).
 - **WASH 1 & WASH 2:** Soluções de lavagem.
 - **ELUTE:** Solução de eluição.
 - **LC-LOAD:** Solução para injeção direta (opcional).

2. LISE E DESNATURAÇÃO

1. **Preparação da Amostra:**
 - Pellet de células, tecido ou fluido biológico (Input recomendado: 1 a 100 µg de proteína).
 - Adicione **50 µL do tampão LYSE** à amostra.
 - **Nota:** Para tecidos ou pellets celulares difíceis, recomenda-se sonicação (10 ciclos de 30s) para cisalhar o DNA e facilitar a lise.
2. **Incubação (Desnaturação/Redução/Alquilação):**
 - Coloque a amostra no bloco térmico a **95°C por 10 minutos** com agitação (1.000 rpm).
 - **Atenção:** Se a amostra não reduzir volume, certifique-se que o tubo está bem fechado (travado).

3. DIGESTÃO ENZIMÁTICA

1. **Ressuspensão da Enzima:**
 - Adicione **210 µL de Água Ultrapura** (Ressuspension Buffer) ao frasco **DIGEST** (enzimas liofilizadas). Agite levemente ou inverta para dissolver.
2. **Digestão:**
 - Adicione **50 µL da solução DIGEST** preparada à amostra lisada (total ~100 µL).
 - Incube a 37°C por 60 minutos com agitação (500 rpm).

4. PURIFICAÇÃO (CLEANUP)

1. **Paragem (Stop):**
 - Adicione 100 µL da solução STOP à amostra digerida.

- Vortex misturar. (Isso acidifica a amostra e permite a ligação à membrana C18/SCX do cartucho).

2. Carregamento no Cartucho:

- Coloque o Cartucho iST num tubo de descarte (Waste).
- Transfira toda a amostra (~200 µL) para o cartucho.
- Centrifugue a 3.800 x g por 1 a 3 minutos.
- Descarte o *flow-through*.

3. Lavagens (Wash):

- **Wash 1:** Adicione **200 µL da solução WASH 1** ao cartucho.
 - Centrifugue a 3.800 x g por 1-3 min. Descarte o *flow-through*.
- **Wash 2:** Adicione **200 µL da solução WASH 2** ao cartucho.
 - Centrifugue a 3.800 x g por 1-3 min. Descarte o *flow-through*.
 - *Dica:* Remova qualquer líquido residual da ponta do cartucho tocando num papel absorvente limpo.

5. ELUIÇÃO DE PEPTÍDEOS

1. Preparação:

- Transfira o cartucho para um **Tubo de coleta (Collection Tube)** novo.

2. Eluição:

- Adicione **100 µL da solução ELUTE** ao cartucho.
- Centrifugue a 3.800 x g por 1 a 3 minutos.
- Mantenha o eluato (contém os peptídeos limpos).

3. Finalização:

- **Opção A (SpeedVac):** Seque a amostra completamente e ressuspenda em **LC-LOAD** ou no seu tampão A (ex: 0.1% FA).
- **Opção B (Injeção Direta):** Se a concentração permitir, adicione o tampão **LC-LOAD** diretamente ao eluato e injete. (Verifique compatibilidade de volume com o seu vial).

CHECKLIST DE ACOMPANHAMENTO PARA PROTOCOLO PreOmics iST Kit - LETA

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

Centrífuga: 3.800 x g | Termobloco: 95°C e 37°C

1. Lise (LYSE)

Status	Passo	Detalhes	Tempo / Temp
[]	Add Lyse	Adicionar 50 µL LYSE à amostra (1-100µg).	-
[]	Sonicação	(Opcional) Se houver DNA/Tecido.	-
[]	Aquecimento	Incubação com agitação (1000 rpm).	95°C, 10 min
[]	Resfriar	Deixar chegar a Temp. Ambiente.	-

2. Digestão (DIGEST)

Status	Passo	Detalhes	Tempo / Temp
[]	Prep Enzima	Ressuspender frasco DIGEST c/ H ₂ O (conforme kit).	-
[]	Add Enzima	Adicionar 50 µL DIGEST à amostra.	-
[]	Incubação	Agitação (500 rpm).	37°C, 60 min

3. PURIFICAÇÃO (CARTUCHO)

Use tubo de descarte (waste).

Status	Passo	Solução / Ação	Spin (3800 g)
[]	Stop	Add 100 µL STOP à amostra. Vortex.	-
[]	Load	Transferir tudo para o Cartucho.	1-3 min
[]	Wash 1	Add 200 µL WASH 1.	1-3 min
[]	Wash 2	Add 200 µL WASH 2.	1-3 min
[]	Dry Tip	Remover residual de líquido da ponta.	-

4. ELUIÇÃO (ELUTE)

Mudar para tubo de coleta (collection)!

Status	Passo	Solução	Spin (3800 g)
[]	Eluir	Add 100 µL ELUTE.	1-3 min
[]	Descarte	Descartar o cartucho. Manter o líquido.	-

5. Finalização

Status	Passo	Detalhes
[]	Secagem	SpeedVac (45°C) até secar.
[]	Ressusp.	Add LC-LOAD ou 0.1% FA.
[]	Transfer	Transferir para vial de autosampler.

