

PROTOCOLO PROVISTO POR LA UNIDAD DE ESPECTROMETRÍA DE MASA DEL INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR DE ROSARIO (UEM-IBR).

(Versión 7-nov-2024*)

Para más información contactarse a uem_ibr@ibr-conicet.gov.ar

Preparación de muestras en geles de poliacrilamida para análisis por LC/MS:

(*) Los protocolos sufren actualizaciones. Puede visitar nuestro sitio web indicado para obtener la última versión

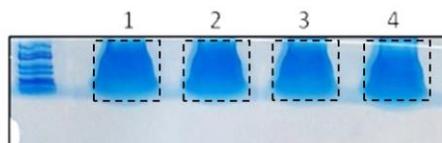
ES DE VITAL IMPORTANCIA SER MUY RIGUROSOS CON LA LIMPIEZA Y UTILIZAR GANTES AL MOMENTO DE MANIPULAR LAS MUESTRAS Y LOS UTENSILIOS.

NO SE RECIBIRÁN MUESTRAS QUE PROVENGAN DE GELES TEÑIDOS CON COOMASSIE BLUE R-250

1- Preparación y manipulación de muestras: desde el comienzo del experimento, es muy importante mantener la limpieza de los distintos instrumentos que se utilizan, evitar la contaminación con queratinas de nuestra piel (usar guantes) y evitar la contaminación cruzada entre las distintas réplicas y/o grupos de muestras. Una vez realizada la extracción de proteínas de interés, deben prepararse para ser corridas por **SDS-PAGE**, y para ello se debe utilizar buffer de siembra **NUEVO**.

2- Geles de poliacrilamida al 12%: es **FUNDAMENTAL** preparar las soluciones **NUEVAS** al momento de realizar la polimerización del gel (Poliacrilamida, Tris-HCl, APS, SDS y Temed) para evitar posibles contaminaciones. Lavar muy bien (con guantes) los vidrios para el armado del gel y la cuba donde se realizará la corrida electroforética. Para un experimento de **LFQ** donde se analiza el **proteoma completo de la muestra de interés**, sembrar al menos **30 ug de proteínas totales por muestra**, dejando una calle vacía entre cada una, donde se recomienda sembrar solo buffer de siembra 1X. **Utilizar preferentemente geles de 0.75 mm de espesor** (el uso de geles de mayor medida podría generar aumentos de costos que serán cargados al usuario del servicio). Es importante para un experimento LFQ, asegurarse de normalizar las muestras para sembrar la misma cantidad de ug entre las distintas réplicas y grupos de muestras. **Realizar un gel por cada grupo de muestras.**

Realizar la corrida a 20 mA constantes, hasta que el frente de corrida haya migrado 1 cm en el gel de separación (pueden marcarse los vidrios a la altura de 1 cm con marcador indeleble del lado de afuera para usar como referencia). **En el caso de querer analizar sólo alguna(s) banda(s) o secciones del gel, se realiza la corrida convencional para garantizar la correcta separación de las proteínas y el posterior corte de la(s) banda(s) de interés** (consultar a la UEM sobre la posible aplicación de métodos de separación previa y/o corridas en geles de poliacrilamida en 2D que contribuyan a lograr una correcta identificación)



Ejemplo de tinción y corte de bandas para experimento de LFQ donde se analiza un proteoma completo.

PROTOCOLO PROVISTO POR LA UNIDAD DE ESPECTROMETRÍA DE MASA DEL INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR DE ROSARIO (UEM-IBR).

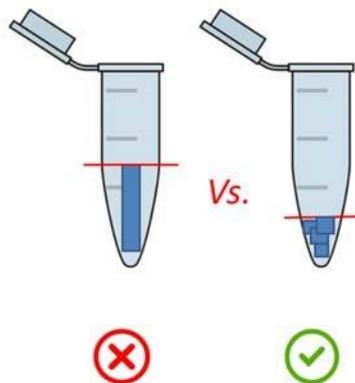
(Versión 7-nov-2024*)

Para más información contactarse a uem_ibr@ibr-conicet.gov.ar

3- Tinción del gel con Coomassie coloidal (ver protocolo de preparación*)

- 1- Colocar el gel en una caja acrílica o placa de vidrio limpia
- 2- Enjuagar el gel con H₂O destilada o preferiblemente agua ultra pura
- 3- Incubar 45 minutos con solución de Fijación c/ agitación
- 4- Realizar 4 lavados con H₂O destilada o preferiblemente agua ultra pura de 10 minutos c/u.
- 5- Incubar el gel con solución de **Coomassie Coloidal** en agitación y al abrigo de la luz. La incubación se realiza **hasta el momento en que se produce la aparición de las bandas de interés**. **Es muy importante NO EXCEDERSE en la tinción.**

4- Cortar las bandas de interés del gel: por ejemplo, para LFQ, normalmente se corta un cuadrado de aproximadamente 1 cm² que incluya el patrón de bandas, y éste a su vez en pequeños cuadrados para poder depositarlas en un tubo marca Eppendorf como se indica en la figura siguiente. El corte puede realizarse con bisturí, sobre una base de vidrio previamente lavada (no es necesario cambiar el bisturí entre las distintas réplicas). Lavar muy bien al cortar geles de otros grupos de muestras o utilizar uno nuevo. **LAS MUESTRAS DEBEN MANTENERSE REFRIGERADAS (- 20°C) HASTA QUE SEAN ENTREGADAS AL SERVICIO.**



*Preparación Coomassie coloidal

Solución de fijación: Vf=100 mL: 60 mL H₂O destilada o agua ultra pura + 30 mL Metanol + 10 mL Ac. Acético

Coomassie coloidal: Vf= 100 mL:

1. Mezclar 10 mL H₂O destilada +11.8 mL solución H₃PO₄ al 85% + 10 g (NH₄)₂SO₄ disolver por completo
2. Agregar 0.12 g de **Coomassie Blue G-250** y disolver por completo.
3. Agregar H₂O destilada cantidad suficiente para Vf=80 mL
4. Agregar 20 mL de Metanol, **MUY LENTAMENTE (gota a gota)**, manteniendo la solución bajo agitación constante.