Extracción de proteínas totales

Para espectrometría de masas

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | Elaboró: | Revisó: | Autorizó: |
| Nombre: | Dr. Oscar Medina Contreras | Dr. Oscar Medina Contreras | Dra. Jenny Vilchis Gil |
| Firma: |  |  |  |
| Fecha: | 2020-04-08 | 2020-04-08 | 2020-05-01 |

1. **Propósito**

Extraer las proteínas totales de las muestras de interés para su posterior análisis en el espectrometro de masas.

1. **Alcance**

Este procedimiento involucra a todo el personal técnico, científico y estudiantes que deseen extraer proteínas totales de alguna muestra de interés para su posterior análisis en el espectrometro de masas en la Unidad de Investigación Epidemiológica en Endocrinología y Nutrición del Instituto Nacional de Salud Hospital Infantil de México Federico Gómez.

1. **Políticas de operación, normas y lineamientos**

Es responsabilidad de todo el personal técnico, científico y estudiantes adscritos a la Unidad de Investigación Epidemiológica en Endocrinología y Nutrición del Instituto Nacional de Salud Hospital Infantil de México Federico Gómez conocer y dar seguimiento a este procedimiento.

Los residuos de tipo CRETI (Corrosivas, Reactivas, Explosivas, Toxicas e Inflamables) se deberán eliminar con base en su clasificación y especificaciones de manejo según la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002; así como sus características intrínsecas y su toxicidad al ambiente según la NOM-052-SEMARNAT- 2005.

1. **Descripción del Protocolo**

**Lisis**

* Se tiene que considerar que partiendo de una cantidad de 3 millones de células se obtiene aprox. 50µg de proteína. Transferir las células a un tubo falcon y centrifugar a 3500 RPM/ 5 min/ 4°C, retirar el sobrenadante.
* Lavar 2 veces el botón celular con PBS (1X; 4ml/frío).
* Recuperar el botón celular y añadir buffer de extracción de lisis (300µl), resuspender la muestra y transferir a un tubo eppendorf.
* Nota: si el número de células ≥10 millones, agregar buffer de extracción de lisis (500l).
* Sonicar 20 pulsaciones a media potencia (1 pulso:1 seg; descanso: 1 seg; en frío), evitar tocar las paredes del tubo).

**Reducción y alquilación**

* Incubar 30 min/40ºC. Añadir Tris (90µl, pH 8.6).
* Agregar IAM (1M; 78µl), incubar TA/oscuridad/ 30 min.

**Precipitación de proteínas**

* Tomar 100µl del lisado y agregar 4 volúmenes acetona 99.5% (400µl).

Nota: los pasos consecutivos se tienen que realizar si se tiene ≥ 3 millones de células; si hay una cantidad menor de células: primero precipitar todo el lisado, saltar los pasos siguientes hasta determinación de proteínas y resuspender el botón de proteínas en NH₄HCO₃ (50mM; 20µl) y GndCl (50mM; 100µl) y continuar con la digestión de proteínas.

* Incubar toda la noche a -20°C.
* Lavar el botón obtenido con acetona al 95% (200µl), resuspender con vortex y centrifugar a 14 000 RPM/15ºC/10 minutos, retirar sobrenadante. Realizar dos veces.
* Descartar el sobrenadante y secar el botón a TA/~5 minutos.

**Determinación de proteínas**

* Resuspender el botón de proteínas en NH₄HCO₃ (50mM; 20µl) y CHAPS 5% (20µl). Agitar en vortex, no tocar la tapa del tubo (5 minutos).
* Agregar urea (4M; 20µl), agitar en vortex 5 minutos.
* Cuantificar proteína por Bradford: 300µl del reactivo + 10µl de muestra. Leer la absorbancia a una longitud de onda de 595nm, extrapolar el dato obtenido en una curva estándar de proteína disuelta en NH₄HCO₃ (50mM; 20µl) y CHAPS 5% (20l), para obtener la concentración de proteína del lisado total.
* Con base al dato obtenido del lisado celular, volver a precipitar solo el volumen necesario para obtener 50µg de proteína.
* Resuspender el botón de proteínas en NH₄HCO₃ (50mM; 20µl) y GndCl (50mM; 100µl). Agitar en vortex, no tocar la tapa del tubo (5 minutos).

**Digestión de las proteínas**

* Añadir tripsina a una concentración 1g/l, agitar suavemente.
* Incubar a 37 °C y en agitación por ≤18hrs.
* Transcurrido el tiempo acidificar la muestra agregando TFA que quede con un volumen final al 0.1%.

**Desalado con SEP PAK C18**

* Preparar **solución A:** Agua Milli Q/TFA (0.1%) y **solución B**: Acetonitrilo/Agua Milli Q/TFA 60:40:0.1.
* La muestra debe tener un pH2-3 sino acidificar la muestra con ácido fórmico o trifluoroacético (pH 2-3).
* Activar la columna con 2ml de solución B (hacer pasar el volumen por una micropipeta o jeringa).
* Equilibrar la columna con 3ml de solución A.
* Pasar por la columna la muestra (en un volumen no menor de 500µl, si se tiene menos agregar solución A) dos veces y despacio; goteo no mayor a una gota por segundo.
* Desalar con 5ml de solución A (eluir despacio).
* Eluir con 500µl de solución B, recuperar el eluato y volverlo a pasar por la columna. Agregar 500µl más de solución B a la columna (hacerlo pasar solo una vez), para obtener un volumen final de 1ml.
* Congelar la muestra (20 min a -80) y secar al vacío. Congelar los péptidos secos antes de ser analizados. Al momento de analizar resuspender en 50 µl agua ácida (FA 0.1%).

1. **Diagrama de Flujo**
2. **Documentos de Referencia**

Geiger, T., Wehner, A., Schaab, C., Cox, J. & Mann, M. Comparative proteomic analysis of eleven common cell lines reveals ubiquitous but varying expression of most proteins. Mol. Cell. Proteomics 11, M111.014050 (2012).

Aasebo EMO, Vaudel M, Farag Y, Selheim F, Berven F, et al. Freezing effects on the acute myeloid leukemia cell proteome and phosphoproteome revealed using optimal quantitative workflows. J Proteomics. )2016).

1. **Anexos**

|  |  |
| --- | --- |
| **Buffer de extracción lisis** |  |
| SDS | 4% |
| DTT | 100 mM |
| TRIS | 100 mM, pH 8.6 |
| Inhibidores de proteasas y fosfatasas | 1X |
| H₂O Milli Q | 117 µl |

**Nomenclatura**

CHAPS: 3-(cloroamido propil)-dimetilamonio-1- propanosulfato

DTT: ditiotreitol

GndCl: cloruro de guanidinio

IAM: iodoacetamida

NH₄HCO₃: bicarbonato de amonio

SDS: dodecilsulfato sódico

TA: temperatura ambiente

TFA: ácido trifluoroacético