



Instituto Clodomiro Picado - UCR
División Académica - Laboratorio de Proteómica
Servicios de Análisis Proteómicos

Guía para solicitar los servicios de análisis y recomendaciones a los usuarios (2021)

Los servicios de análisis de proteínas y péptidos que el laboratorio ofrece incluyen:

1. Determinación de la masa total de una proteína o péptido:

Para esta determinación se requiere alrededor de 1-10 μg de muestra como mínimo, preferiblemente purificada o semipurificada. La muestra debe estar libre de sales, y puede proporcionarse seca, o disuelta en solventes compatibles con los análisis por espectrometría de masas (MS), por ej. agua, mezclas de agua con acetonitrilo, u otros. La presencia de sales o detergentes en la muestra interfiere con la ionización de péptidos/proteínas e imposibilita la obtención de los resultados. Si la muestra posee sales, el Servicio puede ofrecer una limpieza en puntilla tipo ZipTip o en columna (dependiendo de la cantidad disponible por el usuario), por un costo adicional. El ámbito de masas de las proteínas/péptidos a analizar abarca hasta un máximo de 100.000 Da.

2. Identificación de una (o más) proteína(s) a partir de una banda de gel de poliacrilamida:

Mediante digestión con proteasas y posterior análisis por MS/MS, se puede obtener segmentos cortos de las secuencias de aminoácidos de la(s) proteína(s) presente(s) en una banda de un gel de poliacrilamida (generalmente SDS-PAGE, aunque también es posible utilizar otros tipos de geles), con el fin de comparar su similitud en bases de datos y determinar la probable identidad de la(s) proteína(s). También es posible obtener algunas secuencias *de novo* de segmentos, basadas en espectros MS/MS de alta calidad, en ciertas ocasiones. Para esto se requiere de una banda electroforética del gel, teñido con azul de Coomassie, preferiblemente de intensidad mediana a fuerte luego de la decoloración. Es posible intentar la identificación con bandas tenues, aunque las probabilidades de identificación disminuyen proporcionalmente a la cantidad de proteína. Igualmente, el proporcionar una banda de proteína de intensidad adecuada no garantiza su identificación (especialmente para organismos "no-modelo", es decir, cuyos genomas/transcriptomas/proteomas no se conocen), pues la identificación es muy dependiente de la información disponible en bases de datos. Por razones de consumo de materiales, reactivos y trabajo, se deberá cubrir los costos de todas las muestras que se procesen, independientemente de que resulten o no en una identificación positiva.

Se recomienda manejar los geles con guantes, y en recipientes limpios, para prevenir la contaminación con keratinas o con residuos de muestras usadas previamente en los recipientes. Las bandas pueden cortarse con un sacabocados circular (2-3 mm de diámetro, <2 mm grosor), por ej. con una punta de pipeta recortada, o también con un bisturí limpio. Debe evitarse tomar un exceso de poliacrilamida sin proteína alrededor de la muestra. Igualmente, es importante no macerar el pedacito de gel de interés en trocitos finos. Si los geles se van a almacenar por un



tiempo, es recomendable mantenerlos en refrigeración para prevenir contaminación microbiana. Los trozos de gel con la muestra (ej. 1-3 discos de 2-3 mm, o una bandita rectangular) se pueden depositar en un vial nuevo para microcentrifuga de 1,5 ml (tipo Eppendorf), con unos pocos microlitros de agua o solución decoloradora, y mantenerlos a 4-8 °C hasta su análisis.

3. Digestión proteolítica de muestras en solución e identificación de proteínas por nLC-MS/MS:

Ya sea para muestras de proteínas aisladas, o extractos complejos de proteínas, es posible realizar digestión proteolítica en solución y posteriormente separar los péptidos resultantes mediante nLC acoplado en línea con espectrometría de masas, para la obtención de secuencias parciales e identificación contra bases de datos de proteínas disponibles en la web. La cantidad de muestra preferiblemente debe contener unos 15-20 ug de proteína(s) libre de sales y detergentes, ya sea seca o disuelta en agua o agua/acetonitrilo.

4. Secuenciación N-terminal:

Mediante degradación de Edman, se realiza la secuenciación de proteínas y péptidos desde el extremo N-terminal (excepto si este se encuentra bloqueado). La muestra puede proporcionarse seca o en solución, y debe estar libre de sales y detergentes. La pureza mínima de la proteína a secuenciar debe ser $\geq 90\%$, y la cantidad mínima es 1 nanomol. Para muestras en solución, el solvente preferido es agua o mezclas de agua/acetonitrilo. También pueden procesarse muestras que hayan sido previamente transferidas a una membrana de PVDF.

Procedimiento para solicitar los servicios:

Para consultar las tarifas, o para solicitar una cotización de estos servicios de análisis se puede contactar a la Lic. Jenny Masís (jenny.masis@gmail.com, tel. 2511-7888, Administración). Para consultas o dudas técnicas se puede contactar al Dr. Bruno Lomonte (bruno.lomonte@ucr.ac.cr), tel. 2511-7888.

El cliente proporcionará las muestras junto con la información pertinente (origen biológico, pre-tratamiento), y deberá depositar previamente el monto cotizado para el análisis, según las instrucciones proporcionadas en la cotización. Los resultados se entregarán mediante un informe escrito, preferiblemente mediante correo electrónico. Se solicitará posteriormente a los clientes llenar una boleta de evaluación de los servicios.

El personal a cargo de los trámites administrativos y los análisis de laboratorio está en la mejor disposición de aclarar cualquier duda sobre los servicios a los usuarios que lo requieran.

Instrumentación disponible:

Los instrumentos con que cuenta el laboratorio pueden encontrarse fuera de servicio por razones de mantenimientos y/o reparaciones, y aunque estos plazos se tratan de mantener lo más abreviados que sea posible, es recomendable consultar previamente al envío de muestras a los correos-e arriba indicados.



Espectrómetro de Masas
Thermo
Q-Exactive Plus



Secuenciador N-terminal
Shimadzu
Protein SEquencer PPSQ-33A



Digestor de proteínas
DigestPro MSi
Intavis

Atentamente,

Bruno Lomonte, PhD
Coordinador
Laboratorio de Servicios de Análisis Proteómicos
Instituto Clodomiro Picado - Universidad de Costa Rica
Actualización: 06-JUN-2021