



Questo documento fornisce le linee guida generali per la preparazione di campioni proteici che verranno poi analizzati al CISM con metodi di spettrometria di massa. I richiedenti l'analisi sono invitati a contattare il personale del CISM per qualunque questione non espressamente trattata in queste linee guida. Ogni richiesta di analisi prevede la compilazione di un apposito modulo di richiesta.

Identificazione di proteine attraverso digestione, analisi LC-MS/MS e ricerca in banca dati.

Il servizio prevede l'identificazione di una proteina in gel o in soluzione attraverso digestione sito-specifica seguita da analisi LC-MS/MS di digeriti e ricerca in databases.

- La quantità di proteina analizzabile in massa è, ovviamente, proteina dipendente. Come riferimento riportiamo comunque che, con il nostro attuale sistema, è possibile analizzare quantità assolute di BSA in soluzione nell'ordine delle 50-500 fmoli con coperture amminoacidiche, rispettivamente, del 20% e del 60% circa. Notare che tali valori si riferiscono a singola proteina.
- Per campioni derivanti da fluidi biologici o da colture cellulari in particolari media è necessaria la deplezione delle proteine più abbondanti di non interesse quali, per esempio, albumina e transferrina sierica. Dopo deplezione provvedere ad una valutazione della quantità delle proteine rimaste.
- I richiedenti dell'analisi dovrebbero usare, ove possibile, il colorante Coomassie compatibile con la spettrometria di massa. Sono compatibili con l'analisi LC-MS/MS anche i coloranti SYPRO Ruby e CyDye. Il colorante Silver è fortemente sconsigliato. Se l'utilizzo di quest'ultimo colorante risultasse indispensabile si prega di utilizzare solo kit compatibili con la spettrometria di massa.
- La digestione, e l'estrazione se si tratta di gel, possono essere eseguite dal richiedente dell'analisi o dal personale del CISM (secondo tariffario). Se il cliente lo desidera il CISM può fornire un protocollo standard di digestione enzimatica in soluzione o da gel.
- Se la digestione viene eseguita dal cliente si raccomanda di effettuare, contemporaneamente alla digestione delle proteine da identificare, anche la digestione in soluzione della proteina standard BSA ad una concentrazione di circa 500 fmoli/ μ l. Si consiglia inoltre di eseguire un processo di digestione su bianco al fine di poter valutare la presenza

CISM

Polo biomedico: Viale G. Pieraccini, 6 – 50139 Firenze – Tel: +39 055 275 8122/8123

Polo scientifico: Via U. Schiff, 6 - 50019 Sesto F.no (Firenze) – Tel: +39 055 457 3783/3782

e-mail: cism@unifi.it | www.cism.unifi.it

P.IVA | Cod. Fis. 01279680480



di eventuali inquinanti in solventi e reattivi utilizzati durante tutto il processo.

- I campioni non devono contenere detergenti o inquinanti di altro genere (per esempio polimeri come PEG e PPG). Utilizzare solo Eppendorf low-binding.
- Estrema attenzione deve essere posta durante tutto il processo al fine di evitare contaminazioni cheratiniche, specialmente per i campioni derivanti da gel e le proteine a bassa concentrazioni. Indossare sempre guanti, camice e cuffia puliti. Non toccare mai il gel, o una superficie che potrebbe venire in contatto con il gel, a mani nude. Non adagiare il gel direttamente sulla superficie di un imager di uso comune poichè la maggior parte di queste superfici sono pesantemente contaminate da impronte digitali.
- Lavorare sotto cappa a flusso laminare. Non lasciare mai i campioni esposti alla polvere del laboratorio nè usare contenitori lasciati aperti in laboratorio.
- Il cliente deve sempre comunicare al CISM la banca dati sulla quale desidera sia effettuata la ricerca.