

Directives de préparation des échantillons « sans gel » pour les besoins de l'analyse par MS

Il nous tient à cœur de vous produire d'excellents résultats mais ceux-ci dépendent avant toutes choses de la préparation adéquate de vos échantillons. La qualité de vos échantillons est garante de vos résultats. Nous connaissons plusieurs problèmes courants qui empêchent souvent d'identifier vos protéines d'intérêt. Ils sont reconnus pour compromettre les processus d'ionisation. Il est très important de considérer les points suivants pour la soumission de vos échantillons en protéomique.

- En règle générale, il faut environ de 0,05 à 20 µg de protéines pour obtenir une identification fiable. **N'ENVOYEZ PAS PLUS DE 20 µg. Si une analyse protéomique quantitative est désirée, envoyez-nous la même quantité pour chaque échantillon.**
- Idéalement, les échantillons ne devraient se composer que de vos protéines d'intérêt (aucun sel, uniquement des tampons volatils, **aucun détergent, aucun polymère, ni plastifiant résiduel**).
 - À éviter : Na, K, Ca, Mg, Mn, Li (ou maintenez une concentration inférieure à 100 mM). Les sels suppriment le signal, compromettent l'ionisation et forment des adduits dans le cas de nombreux composés.
 - Les tampons nuisent à l'ionisation de la même manière que les sels. **Utilisez uniquement des tampons volatils de faible concentration (bicarbonate d'ammonium, formate d'ammonium, carbonate d'ammonium, etc.).**
 - À éviter : SDS et tous les détergents à base de polyéthylène glycols (PEG) [Tween, Triton, NP-40]. Les détergents réduisent nettement l'activité de la trypsine, détruisent de nombreux processus d'ionisation, éluent avec les peptides et leur font concurrence pour l'ionisation. **Communiquez avec nous s'il s'agit d'un composé essentiel de votre protocole.**
 - Évitez aussi les polymères car ils suppriment le signal et éluent avec les peptides.
 - À éviter : EDTA et Glycérol (généralement fortement contaminé par des PEG)
- Utilisez des tubes recommandés pour la protéomique tels les tubes LoBind Protein d'Eppendorf. Les plastifiants et les phalates sont omniprésents dans de nombreux nouveaux plastiques mous et ionisent facilement.
- Si votre mélange est complexe, n'oubliez pas que les molécules les plus légères et les molécules les plus abondantes ionisent généralement plus facilement. Pour cette raison, PURIFIEZ votre échantillon pour que vos protéines d'intérêt soient les seules disponibles à l'ionisation.

Une mauvaise préparation des échantillons est à l'origine de la plupart des problèmes de détection et d'interprétation, et exige beaucoup de travail. Même une analyse minutieuse ne pourra pas compenser pour une mauvaise qualité d'échantillon.

Nettoyage de l'échantillon

Utilisez les techniques suivantes pour éliminer les composés nuisibles de votre échantillon :

- Précipitation des protéines :
 - TCA pour les échantillons de faible abondance
 - Acétone pour les échantillons d'abondance élevée
 - Acétone-TCA pour les échantillons contenant du SDS ou des détergents à base de PEG, répéter la procédure d'Acétone-TCA deux fois si les échantillons présentent une concentration de SDS supérieure à 1 %.
- Colonnes de dessalage/SEC/purification basées sur le poids moléculaire
- Adsorption par C4 ou C18 (extraction en phase solide) du composé, suivi d'un bon rinçage pour éliminer les contaminants avant l'élution (technique non efficace pour les détergents à base de PEG).

Pour éviter le nettoyage de l'échantillon

- Utiliser uniquement :
 - Tampons volatils (de 1 à 20 mM) : bicarbonate d'ammonium, formate d'ammonium, carbonate d'ammonium.
 - Détergents compatibles avec la spectrométrie de masse tel ProteaseMax Surfactant (Promega). Protea Biosciences offre aussi plusieurs détergents de ce type.
 - Acides volatils : acide formique, acide acétique, acide trifluoroacétique
 - Bases volatiles : triéthylamine, hydroxyde d'ammonium

Manipulation des échantillons

Portez un sarrau de laboratoire propre, des gants en nitrile, un bonnet et un masque propres pour manipuler les échantillons. Travaillez dans un environnement propre (particulièrement la paillasse) et loin des endroits passants. Utilisez des embouts de pipettes propres et refermez toujours le couvercle de la boîte d'embouts de pipettes. Utilisez des tubes en polypropylène à fond conique de 1,5 ml non colorés (nous suggérons les tubes LoBind Protein d'Eppendorf).

Dans la mesure du possible, couvrez les échantillons. Utilisez des solutions fraîches, des tubes et des articles de verrerie propres (nettoyez 2 ou 3 fois avec un mélange 50/50 d'eau et d'acétonitrile de qualité HPLC) et des embouts de pipettes propres (rincez avec la solution de travail/tampon).

Veuillez consulter nos protocoles de précipitation si cette étape est nécessaire.