

Protocolo

Extração de Proteínas Totais de Planta

Método Fenol Modificado de:

Hurkman W. J. and Tanaka C. K. (1986). *Solubilization of Plant Membrane Proteins for Analysis by Two-Dimensional Gel Electrophoresis*. *Plant Physiol.* (81): 802-806

1) Tampão de extração:

Reagentes	Estoque	WC	15 mL	240 mL
Tris HCl (1M, pH=7.5) (PM = 121.14)	60.6 g/0.5L	0.5 M	7.5 mL	120 mL
KCl (1M, PM= 74.56)	7.46 g/100mL	0.1 M	1.5 mL	24 mL
EDTA (0.5M, pH=8.0) (PM = 372.23)	18.6 g/100mL	0.05 M	1.5 mL	24 mL
Sacarose (PM = 342.3)		0.7 M	3.6 g	57.6 g
<i>B</i> -mercaptoetanol *		2% (v/v)	300 µL	4.8 mL
PMSF (PM = 174.2) *		2 mM	5.22 mg	0.084 g
PVPP *		1 %	0.15 g	
milliQ	qsp		15 mL	240 mL

* Obs:

- i)* O PMSF (5.22 mg) deve ser dissolvido em 300 µL de isopropanol, antes de ser adicionado ao tampão.
- ii)* O PVPP deve ser adicionado em pó (0.15 g/15 mL) diretamente, e homogenizado, juntamente com a amostra e não é utilizado na

última lavagem (passo *vii*, do protocolo) subsequente com o tampão.

- iii*) O β -mercaptoetanol (300 μ L) deve ser adicionado à amostra, em seguida à adição do tampão de extração, somente na primeira homogenização.

2) Tampão de Solubilização (TCT):

Reagentes	Estoque	WC	10 mL
Uréia (PM = 60.06)		7.0 M	4.2 g
Tiouréia (PM = 76.12)		2.0 M	1.52 g
DTT (1M) (PM = 154.3) [0.154 g/ 1 mL]		10 mM	100 μ L ou (1 m g/10mL)
Triton X-100		0.01% (p/v)	0.01 g
milliQ		qsp	10 mL

3) Tampão de Precipitação (100% Metanol + 0.1M Acetato de Amônio):

Reagentes	WC	500 mL
Acetato de Amônio (PM = 77.08)	0.1M	3.9 g
Metanol (100%)	qsp	500 mL

Armazenar a (-20°C)

4) Tampão de Lavagem I (100% Metanol + 0.1M Acetato de Amônio):

Reagentes	WC	1000 mL
-----------	----	---------

Acetato de Amônio (PM = 77.08)	0.1M	7.8 g
Metanol (100%)	qsp	1000 mL

Armazenar a (-20°C)

5) Tampão de Lavagem II (100% Acetona):

Reagentes	WC	500 mL
Acetona (100%)	qsp	500 mL

Armazenar a (-20°C)

Extração de Proteínas Totais:

- i) Macere 500 mg a 2g de material biológico (dependendo do tipo de tecido do material biológico de interesse), em cadinho, com auxílio de nitrogênio líquido. Tranfira a amostra para tubos de centrífuga (50 mL) **Nalgene (cat# 3119-0050)**, contendo 15 mL de tampão de extração + (0.15 g de PVPP) + (300uL β -mercaptoetanol) e homogenize (Vórtex).
- ii) Utilize o agitador orbital (70 rpm) para homogenizar as amostras por 30 min a (4°C). Para isso, feche bem os tubos e coloque-os deitados em um caixa de isopor com gelo picado.
- iii) Adicione 1 volume (15 mL) de fenol equilibrado com 10mM de Tris-HCl (pH=8.0) (Sigma cat#P4557). Homogenize as amostras, da mesma forma, com auxílio do agitador orbital, por 30 min, a 4°C.
- iv) Centrifugue (10.000 g), por 30 min. a 4°C.
- v) Recupere o sobrenadante, transfira-o para tubo novo e adicione 1 volume (15 mL) de tampão de extração + 0.15 g de PVPP. Homogenize as amostras, da mesma forma, com auxílio do agitador orbital, por 30 min, a 4°C.
- vi) Centrifugue (10.000 g), por 30 min. a 4°C.

- vii) Repita o passo v e vi. Nessa última vez, utilize o tampão de extração **sem PVPP**.
- viii) Centrifugue (10.000 g), por 30 min a 4°C. Recupere o sobrenadante.
- ix) Adicione 5-6 volumes (25-30 mL) de tampão de precipitação (100% metanol + 0.1 M de acetato de amônio) gelado e mantenha as amostras a -20°C, “overnight”.
- x) Centrifugue (16000 g) por 30 min a 4°C.
- xi) Descarte o sobrenadante e adicione 30 mL de tampão de lavagem I (100% metanol + 0.1M acetato de amônio) gelado (-20°C), sem perturbar o pellet. Deixe no freezer (-20°C) por 1 hora, no mínimo.
- xii) Centrifugue (16000 g) por 30 min a 4°C.
- xiii) Repita os passos xi e xii mais 2 X.
- xiv) Descarte o sobrenadante e adicione 30 mL de tampão de lavagem II (100% acetona) gelado (-20°C), sem perturbar o pellet. Deixe no freezer (-20°C) por 1 hora, no mínimo.
- xv) Centrifugue (16000 g) por 30 min a 4°C.
- xvi) Seque o pellet em dissecador a 4°C, por 24 h (não deixe secar demais). Ressuspenda em 200 - 5000µL de tampão de solubilização (TCT), (dependendo do tipo de tecido utilizado, do rendimento da amostra e do tipo de coluna de dessalinização a ser utilizada). Centrifugue (20.0000 g), por 10 min, a 6°C, para a remoção de impurezas residuais.
- xvii) Recupere o sobrenadante e faça a dessalinização de uma alíquota da amostra (100 a 200 µg), com auxílio das colunas Amicon®Ultra (**Millipore**) ou Vivaspin (**GE Helthcare**), seletivas para **3000-10000 NMWL** (dependendo do peso molecular das proteínas de interesse e do volume de amostra), antes da quantificação que pode ser realizada pelo teste de Bradford ou, no caso de proteínas pouco abundantes, com auxílio do Agilent

Protein 80 ou 230 kit da (**Agilent Technologies**), (dependendo do peso molecular das proteínas de interesse).

- xviii) Prepare um gel de SDS-PAGE para confirmar a quantificação da proteína, juntamente com uma amostra padrão de BSA (1, 2 e/ou 5 ug) para quantificação visual e comparativa em gel. **Obs: Nem sempre, a quantificação por Bradford é compatível com a quantificação em gel (depende do tipo de tecido)**. **Obs: Faça a correção da concentração da amostra, de acordo com o gel, pois a quantificação correta é imprescindível !**
- xix) Subdivida as amostras em alíquotas de 50µL contendo 50µg (1µg/µL) no caso de digestão com tripsina para análise de espectrometria de massas.