

### Proteínas y péptidos

- Se requieren 5-10  $\mu\text{g}$  de proteína/péptido puro para obtener un análisis cuantitativo preciso.
- Utilizar siempre reactivos y disolventes de la máxima pureza posible.
- Los tampones, detergentes, metales traza, sales y el glicerol pueden interferir con el análisis, por lo que previamente deben ser eliminados o reducidos al mínimo.
- Evitar la presencia en la muestra de sustancias que contengan grupos amino (Tris) susceptibles de reaccionar con la ninhidrina.
- Utilizar tubos de polietileno o polipropileno del menor volumen posible. La muestra debe estar en un volumen  $< 200 \mu\text{l}$ .
- Evitar liofilizar la muestra. La liofilización puede acarrear pérdida sustancial de proteína. Si se requiere concentrar la muestra es preferible reducir el volumen en una centrífuga de vacío.
- Usar siempre guantes y trabajar en una zona limpia y libre de polvo. El polvo y las manos son la principal fuente de aminoácidos contaminantes.

### Protocolos para preparación de muestras a partir de tejidos vegetales

*Importante: Estos protocolos deben ser realizados por el usuario*

#### **A) Determinación de aminoácidos libres (extracción con metanol:cloroformo:agua)**

(Hacham et al., Plant Physiology 128: 454-462, 2002)

- 1- Congelar  $\sim 150$  mg de tejido en nitrógeno líquido.
- 2- Triturar con un mortero en presencia de  $600 \mu\text{l}$  de agua: cloroformo: metanol (3: 5: 12 v / v) hasta conseguir un polvo lo más fino y homogéneo posible. El mortero debe estar al menos 1 hora antes a  $-80^\circ\text{C}$ . Evitar que se descongele la muestra.
- 3- Transferir a un tubo Eppendorf y centrifugar a velocidad máxima durante 2 minutos.
- 4- Recoger el sobrenadante y pasarlo a un tubo de 2 ml.
- 5- Resuspender el pellet en  $600 \mu\text{l}$  de agua: cloroformo: metanol.
- 6- Centrifugar a velocidad máxima durante 2 minutos.
- 7- Recoger el sobrenadante y combinarlo con el obtenido en el paso 4.
- 8- Añadir  $300 \mu\text{l}$  de cloroformo y  $450 \mu\text{l}$  de agua.

- 9- Centrifugar a velocidad máxima durante 2 minutos.
- 10- Recoger la fase superior (agua:metanol) y pasarla a un tubo nuevo.
- 11- Evaporar en una centrifuga de vacío (aproximadamente 3 horas).
- 12- Congelar a -20 °C.

**B) Determinación de proteína total (Extracción con TCA/acetona)**

- 1- Congelar ~ 150 mg de tejido en nitrógeno líquido.
- 2- Triturar con un mortero hasta conseguir un polvo lo más fino y homogéneo posible. El mortero debe estar al menos 1 hora antes a -80 °C. Evitar que se descongele la muestra.
- 3- Resuspender el polvo en TCA al 10% en acetona (p/v) (5-15 ml de solución por gramo de tejido). Añadir  $\beta$ -mercaptoetanol en el momento de usar la solución de forma que quede al 2% (v/v).
- 4- Incubar al menos 1 hora a -20 °C.
- 5- Centrifugar 30 min a 4 °C y 5.000 g. Desechar el sobrenadante (con mucho cuidado) con la pipeta.
- 6- Añadir 10 ml de acetona (-20 °C). Intentar disgregar al máximo el pellet.
- 7- Incubar al menos 1 hora a -20 °C.
- 8- Centrifugar 10 min a 4 °C y 5.000 g. Desechar el sobrenadante (con mucho cuidado) con la pipeta.
- 9- Repetir los pasos 6-8 dos veces más.
- 10- Dejar abiertos los tubos para secar el pellet al aire y eliminar la acetona totalmente. El pellet debería ser blanco o ligeramente coloreado.
- 11- Congelar a -20 °C.