



Foto: Lumi Shiose

COMUNICADO
TÉCNICO

147

Seropédica, RJ
Maio, 2019

Embrapa

Seleção de método de extração de proteínas de folhas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)

Lumi Shiose
José Ivo Baldani
Ederson da Conceição Jesus
Marcia Soares Vidal

Seleção de método de extração de proteínas de folhas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)¹

¹ Lumi Shiose, estudante do curso de pós-graduação em Ciência do Solo da UFRRJ, BR 465, km 7, Seropédica/RJ, lumi_shiose@hotmail.com. José Ivo Baldani, pesquisador da Embrapa Agrobiologia, BR 465, km 7, Seropédica/RJ, CEP 23890-000, ivo.baldani@cnpab.embrapa.br. Ederson da Conceição Jesus, pesquisador da Embrapa Agrobiologia, BR 465, km 7, Seropédica/RJ, CEP 23890-000, ederson.jesus@embrapa.br. Marcia Soares Vidal, pesquisadora da Embrapa Agrobiologia, BR 465, km 7, Seropédica/RJ, CEP 23890-000, marcia.vidal@embrapa.br.

Em um experimento que envolve análise da expressão de proteínas (proteômico), o passo mais determinante é a extração das proteínas. As proteínas podem ser isoladas de qualquer amostra biológica, como bactérias, leveduras, tecidos e/ou órgãos de origem animal e/ou vegetal, entre outros. Conhecer as particularidades físico-químicas da amostra trabalhada é essencial para escolher o método de extração, que deve possibilitar a obtenção de amostras proteicas com concentração ótima entre 5-10 mg.mL⁻¹ de proteína (GÖRG *et al.*, 2007) e livres de contaminantes.

Dois protocolos básicos foram apresentados durante as últimas décadas, sendo um com base em fenol e outro com base em ácido tricloroacético (TCA), passando por alterações conforme a fonte de material do qual se deseja extrair as proteínas. A extração fenólica foi desenvolvida por Hurkman e Tanaka (1986), sendo uma alternativa para o isolamento de proteínas de tecidos ricos em componentes fenólicos. A extração com TCA/acetona surgiu no mesmo ano e foi

elaborada por Damerval *et al.* (1986), sendo um método rápido e eficiente. Ambos os métodos vêm se mostrando eficientes para extração de proteínas de tecidos vegetais (CARPENTIER *et al.*, 2005). Wang *et al.* (2003) posteriormente combinaram os dois protocolos, associando a precipitação através de TCA/acetona à extração com o fenol.

Mesmo com os protocolos padrões disponíveis, é necessário adaptar e otimizar a metodologia usada de acordo, principalmente, com a origem de seu material de estudo. Görg *et al.* (2004) apresentaram as seguintes sugestões: Para garantir a reprodutibilidade, o método deve ser simples e deve minimizar ao máximo a degradação das proteínas durante o processo. As etapas fundamentais para o preparo da amostra proteica são resumidamente: rompimento celular e extração das proteínas, remoção de contaminantes, enriquecimento proteico e solubilização da amostra (BODZON-KULAKOWSKA *et al.*, 2007). A eficiência da extração pode variar de acordo com os solventes utilizados e

os procedimentos executados e fatores como temperatura ambiente também podem influenciar no processo.

Após a obtenção da sua amostra biológica, ou seja, amostra do organismo/tecido a partir do qual serão purificadas as proteínas, a mesma deve ser acondicionada para que não ocorra alteração nas propriedades da(s) proteína(s) a serem extraídas. Em seguida, procede-se o rompimento da célula para possibilitar o acesso a toda proteína contida na mesma. A célula pode ser rompida de diversas formas, tais como: lise por osmose ou detergente, sonicação, maceração, entre outros (GÖRG *et al.*, 2004). Com o rompimento obtém-se uma mistura de macromoléculas, como as proteínas de interesse e contaminantes não proteicos: polifenóis, lipídeos, ácidos nucleicos (DNA e RNA) e pigmentos (WANG *et al.*, 2003). Após o rompimento celular, deve haver a remoção e/ou desativação dos detritos não proteicos, para que os mesmos não interfiram em análises posteriores (GÖRG *et al.*, 2004). Em alguns protocolos, inibidores de proteases são comumente utilizados para prevenir a degradação proteica, porém sua adição pode causar alguma modificação nas proteínas a serem extraídas, dessa forma outro método para inibir a atividade de protease seria a redução do pH (GÖRG *et al.*, 2004). Na etapa de solubilização é esperado que seja adquirida a mesma composição proteica por todo o volume da amostra, em outras palavras, esta precisa estar homogênea. A quebra das interações presentes nos aglomerados

proteicos, como as ligações de hidrogênio, leva à desaglomeração das moléculas, possibilitando a solubilização destas (WILKINS *et al.*, 1996). Às vezes é necessária a adição de agentes caotrópicos (Ex: ureia e/ou tiourea), detergentes (Ex.: triton X-100) e agentes redutores (Ex.: ditioneitol) para favorecer aquele efeito (GÖRG *et al.*, 2004).

Quando se trabalha com amostras vegetais, algumas peculiaridades tornam o procedimento de extração proteica mais complexo. Uma das particularidades é a presença de parede celular nas células vegetais, fator que demanda sua ruptura para posterior lise celular, de modo que a extração seja bem-sucedida. Outro fato relevante diz respeito à massa celular que em grande parte é composta pela própria parede celular e pelo vacúolo, o que leva a um menor rendimento da extração proteica quando comparado a outros materiais (ISAACSON *et al.*, 2006), sendo necessário o ajuste da massa de amostra de tecido inicial a ser empregada na extração. As células vegetais apresentam alguns compostos que podem interferir tanto na extração, separação quanto identificação de proteínas. Os compostos que mais interferem são os compostos fenólicos, os terpenos, os pigmentos, ácidos orgânicos, lipídios, enzimas proteolíticas e oxidativas, íons, ácidos nucleicos e polissacarídeos (WANG *et al.*, 2008; WU *et al.*, 2014).

As metodologias que utilizam a precipitação com TCA/acetona seguida de ressolubilização em tampão contendo detergentes e substâncias caotrópicas

são as mais utilizadas na maioria dos estudos de proteínas vegetais (SANTONI *et al.*, 1998), assim como métodos que empregam a extração fenólica combinada com a precipitação com TCA/acetona (WANG *et al.*, 2006). Para garantir bons resultados em estudos de proteômica é necessário o estabelecimento de um protocolo que seja mais compatível com a amostra biológica analisada.

Neste sentido, foram testados três protocolos de extração de proteínas: (a) Extração com ureia/tiourea, (b) Extração com TCA/acetona e (c) Extração fenólica combinada com TCA/acetona. Cada procedimento foi realizado com triplicata biológica. As amostras de folha de feijoeiro, inoculado com a estirpe CIAT899 de *Rhizobium tropici*, foram obtidas de um experimento conduzido em vasos do tipo “Leonard” contendo areia e vermiculita como substrato estéril na proporção 2:1. Foram semeadas quatro sementes pré-germinadas da cultivar Ouro Negro por vaso seguido da inoculação das estirpes. As folhas do feijoeiro foram coletadas quando estavam na fase do surgimento dos botões florais e armazenadas a -80°C. Posteriormente, as folhas foram maceradas com auxílio de gral e pistilo na presença de nitrogênio líquido, já que seu uso minimiza a proteólise e outras formas de degradação proteica que ocorrem durante a maceração (WANG *et al.*, 2008).

Métodos de extração

(a) Protocolo 1: Extração com ureia/tiourea

A metodologia usada nesta extração foi baseada no trabalho de Balbuena *et al.* (2009), com algumas modificações: 500 mg de amostras de tecido previamente macerado foram transferidos para microtubos com capacidade para 2 mL, foram adicionados 1,5 mL de tampão de extração contendo 7 M de ureia, 2 M de tiourea, 1% de ditioneína (DTT), 2% de triton X-100, 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) e inibidor de protease. Após a homogeneização, as amostras foram mantidas em gelo por 30 minutos e, em seguida, submetidas a centrifugação a 12.000 x g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para novos tubos, e a este foi adicionada solução de TCA a 10% em acetona (p/v) para a precipitação das proteínas através de incubação por 30 minutos, a 4°C. Em seguida foi efetuada uma nova centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado 3 vezes com acetona a 100% gelada (v/v). Por fim, as proteínas extraídas foram resolubilizadas em 500 µL de tampão de extração e armazenadas a -20°C para posterior quantificação.

(b) Protocolo 2: Extração com TCA/acetona

O protocolo utilizado foi desenvolvido por Damerval *et al.* (1986) e sofreu

pequenas modificações. Após transferir os 500 mg de amostra de tecido macerado para micro tubos com capacidade para 1,5 mL, 1 mL de TCA/Acetona contendo 20 mM de DTT foram adicionados, a mistura foi homogeneizada rigorosamente com auxílio de agitador de tubos do tipo vórtex e incubada a -20°C por uma hora para precipitação das proteínas. Após esse período as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante descartado. Em seguida o precipitado foi lavado 3 vezes com acetona 100% gelada, seco ao ar e, em seguida foi adicionado 1 mL de tampão de extração, o mesmo usado no protocolo anterior. A amostra foi homogeneizada e mantida por 1 hora a 4°C . Depois de centrifugação a $16.000 \times g$ por 15 minutos, 4°C , o sobrenadante foi transferido para novos tubos que foram armazenados a -20°C para posterior quantificação.

(c) Protocolo 3: Extração fenólica com TCA/acetona

Este protocolo foi baseado no trabalho de Wang *et al.* (2006) com algumas modificações. Primeiramente foram transferidos 300 mg de amostra de tecido previamente macerado para tubos de microcentrifuga com capacidade para 2 mL. A solução de TCA/acetona foi adicionada até o volume máximo dos tubos. Após a homogeneização, os tubos foram incubados a -20°C por uma hora, sendo posteriormente centrifugados a $14.000 \times g$ por 5 minutos a 4°C . O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi adicionada a solução de

0,1 M de acetato de amônio em metanol a 80% (p/v) até o volume máximo. Em seguida, o sistema foi homogeneizado e centrifugado nas mesmas condições anteriores, descartando-se novamente o sobrenadante. Em seguida, ao sedimento foi adicionada acetona 80% (v/v) no volume máximo, seguido pelos mesmos processos de homogeneização, centrifugação e descarte de sobrenadante. O sedimento obtido foi seco em estufa a 37°C por cerca de uma hora e, então transferido para tubos de 15 mL com auxílio de espátula, onde foi adicionada solução de lise composta de 30% de sacarose (p/v), 2% de dodecil sulfato de sódio (SDS) (p/v), 5% de DTT (v/v), 0,1 M de Tris-HCl pH 8,0 na proporção 1:8 (mg de sedimento seco/ μL de solução de lise). O conteúdo foi homogeneizado vigorosamente com auxílio de agitador de tubos do tipo vórtex por 30 segundos e, em sequência, incubado sob agitação por 20 minutos a temperatura ambiente. Ao término da incubação, adicionou-se 1 volume de fenol equilibrado com tampão Tris-HCl (pH 8,0). Após breve agitação, o conteúdo foi incubado por 5 minutos a 30°C e, em seguida, submetido a nova agitação, sendo incubado em gelo por 5 minutos. Para a separação da fase fenólica e aquosa, o material foi centrifugado durante 20 minutos, a $6.000 \times g$ a 4°C . A fase fenólica foi transferida para um novo tubo e foram acrescentados 5 volumes de solução de acetato de amônio a 0,1 M em metanol absoluto gelado. Depois de homogeneizado e incubado por 40 minutos a temperatura de -20°C , o conteúdo foi mais uma

vez centrifugado, e o sobrenadante foi descartado. As proteínas obtidas foram ressolubilizadas em 2 mL de metanol a 100%, o sistema foi homogeneizado, e então transferido para microtubos, que foram centrifugados a 14.000 x g. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado com solução de acetona a 80% e seco em temperatura ambiente por no máximo 5 minutos. Por fim, as proteínas foram ressolubilizadas em 500 µL tampão de solubilização de ureia/tiourea e armazenadas em -20°C para posterior quantificação.

Métodos de análise da eficiência dos métodos de extração

A partir de três critérios foi possível avaliar a eficiência de cada metodologia utilizada nas extrações: rendimento, diversidade proteica e laboriosidade. O rendimento é estipulado por espectrofotometria, através da quantificação com Kit 2D Quant conforme as instruções do fabricante GE Healthcare Life Sciences.

Para a análise da diversidade foi empregada a eletroforese uni e bidimensional, em dimensão única as amostras migraram em géis de poliacrilamida a 10% com 1,5 mm de espessura, enquanto que para a eletroforese bidimensional, foram escolhidos um exemplar de cada amostra com diferentes métodos de extração e posteriormente foram isoeletrofocalizadas pelo sistema Ettan IPGphor III. Em seguida, as tiras foram

equilibradas por 30 minutos em tampão de equilíbrio contendo 0,05 M de Tris-HCl (pH 8,8), 6 M de ureia (p/v), 30% de glicerol (v/v), 2% de SDS (p/v) e 20 mM de DTT (p/v) e na sequência mais 30 minutos com o mesmo tampão contendo 125 mM de iodoacetamida, sem o DTT. Após o equilíbrio, as tiras foram acomodadas em géis de poliacrilamida com concentração de 10% com 1,5 mm de espessura, sendo programadas para migrar a 90 mA. Com o término da migração, os géis foram fixados em solução contendo ácido acético e etanol, corados com *Coomassie Brilliant Blue* G-250 e digitalizados com o aparelho ImageScanner III. Por fim, a laboriosidade foi estimada pelo número de etapas e tempo de duração para execução dos protocolos.

Análise comparativa dos métodos

Ao avaliar os três protocolos, pode-se antecipar que para o critério laboriosidade, o terceiro método, de Wang *et al.* (2006), é o pior avaliado, já que o mesmo é uma combinação do protocolo com TCA/acetona, também testado neste estudo, com o protocolo fenólico descrito por Wang *et al.* (2003). A combinação dos dois protocolos tem o intuito de aperfeiçoar os métodos de extração, já que as lavagens com TCA/acetona além de precipitar as proteínas, remove os contaminantes não protéicos (WANG *et al.*, 2003) e é eficiente na inibição de proteases (DAMERVAL *et al.*, 1986).

Devido a seus benefícios, a precipitação com TCA/acetona está presente nos três protocolos testados.

A tabela 1 mostra os resultados quanto ao critério rendimento, com os dados de quantificação de proteínas totais. Os protocolos 1 e 2 apresentaram médias de rendimento muito próximas de $3,86 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ e $3,84 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, respectivamente, e em ambos foram utilizados 500 mg de material vegetal, enquanto que o protocolo 3 apresentou um rendimento superior a $4,91 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, mesmo sendo utilizada uma quantidade menor de amostra (300 mg). Essa maior eficiência do protocolo 3 pode ser devido a minimização de proteólise durante a extração, fator este observado por Schuster e Davies (1983) em métodos de extração com base fenólica. Em todos os protocolos testados foram obtidos valores maiores que $0,1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ de proteína, quantidade mínima exigida para ensaios proteômicos baseados em 2DE, tendo em vista podem existir perdas de proteínas pela adsorção das mesmas nos suportes aos quais são aplicadas durante o processo de isoeletrofocalização. Como mencionado por Görg *et al.* (2007), a concentração ótima de proteínas deve estar entre $5\text{-}10 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. O uso desse parâmetro como referência sugere o protocolo 3 como aquele que mais se aproxima da concentração ótima, contudo, os três protocolos ultrapassam o valor mínimo. A concentração de proteína em todos os protocolos pode não ter atingido o valor ótimo devido ao fato da maceração não apresentar a textura de talco, sugerindo

Tabela 1. Rendimento de extração de proteínas de tecido de folha de feijoeiro utilizando os três (03) protocolos de extração testados.

Protocolo*	Concentração de proteína ($\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)
1	$3,86 \pm 1,2$
2	$3,84 \pm 0,4$
3	$4,91 \pm 0,7$

* 1: Ureia/tiourea; 2: TCA/acetona; e 3: fenol com TCA/acetona. As quantificações foram realizadas utilizando-se o 2D Quant Kit e os resultados estão expressos na forma de média $\pm$ desvio padrão ($n=3$).

que a etapa de rompimento das células tenha sido insatisfatória. Görg *et al.* (2007) também alertam que alguns inibidores de protease são inativados por DTT, composto este presente em todos os protocolos de extração testados.

A análise das amostras em gel SDS-PAGE (Figura 1) evidencia a perda de uma banda muito expressiva, de proteínas de alta massa molecular no protocolo 1, banda esta obtida tanto no protocolo 2 quanto no 3. Na realidade, os perfis obtidos nos protocolos 2 e 3 são bem similares. Quando analisados por eletroforese bidimensional (2-DE), conforme observado no gel (Figura 2), verifica-se que o protocolo 1 apresentou interferência durante a primeira etapa de separação por pH, a isoeletrofocalização (IEF). Essa interferência pode ser visualizada devido a formação de estrias no gel 2-DE, indicadas com setas em vermelho, não sendo possível diferenciar as proteínas pelo seu pH.

Essa interferência pode ter sido causada pela grande quantidade de sais

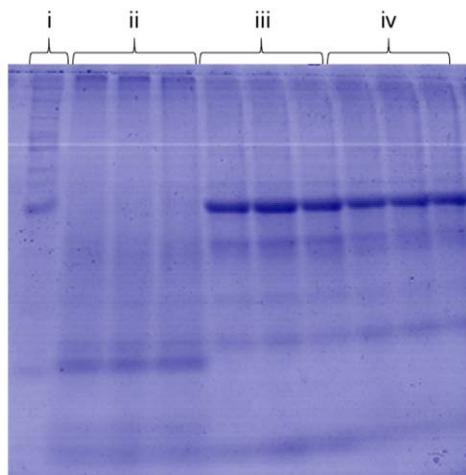


Figura 1. Extratos proteicos de folhas de feijoeiro obtidos por diferentes métodos. Gel de poliacrilamida a 10% em condições desnaturantes (SDS-PAGE) corado com *Coomassie Brilliant Blue*. (i) Marcador de massa molecular *Bench Marker™ Protein Ladder* (Invitrogen) (KDa), Extratos proteicos obtidos com emprego dos protocolos 1 (ii), 2 (iii) e 3 (iv).

presentes na amostra. Görg *et al.* (2000) sugerem que sais em concentrações maiores que 100 mM podem precipitar nos locais de aplicação da amostra proteica no gel, resultando em estrias horizontais e/ou verticais. Essas estrias são observadas no protocolo 1 sugerindo, portanto, a interferência durante o processamento das amostras. Nesse caso, pode-se concluir que os protocolos 2 e 3 apresentam maior pureza, frente ao resultado observado no gel 2-DE (Figura 2). Métodos com base em TCA/acetona e fenol já haviam se destacados, em outro estudo (SHEORAN *et al.*, 2009), como métodos mais compatíveis para análise em gel 2-DE e espectrometria de massa.

Com base nos critérios estabelecidos para determinar o método mais apropriado para extração de proteínas verificou-se que o protocolo 2 (TCA/acetona) foi

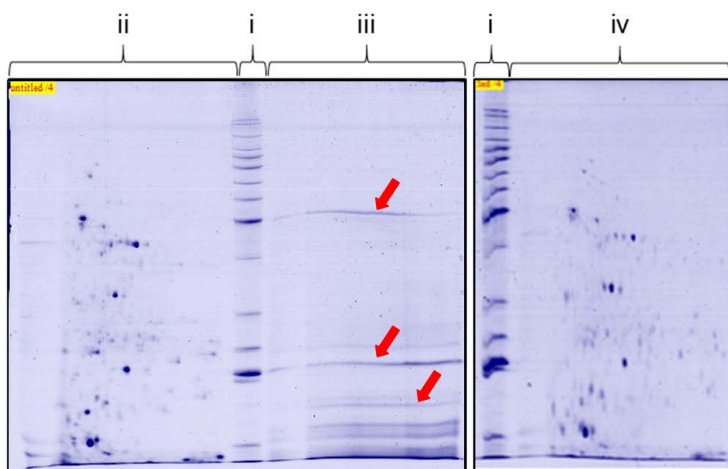


Figura 2. Extratos proteicos de folhas de *P. vulgaris* obtidos por diferentes métodos. Géis bidimensionais de poliacrilamida (2-DE) a 10% corados com *Coomassie Brilliant Blue*. (i) Marcador de massa molecular *Bench Marker™ Protein Ladder* (Invitrogen) (KDa), Extratos proteicos obtidos com emprego dos protocolos 2 (ii), 1 (iii), e 3 (iv). Setas em vermelho indicam as estrias.

o que apresentou o melhor resultado e, desta forma, foi escolhido como o mais apropriado para extração de folhas de feijoeiro já que ultrapassou a concentração mínima de $0,1 \mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$ (JING *et al.*, 2004; GÖRG *et al.*, 2007), apresentou maior diversidade de proteínas em géis de eletroforese unidimensionais, tanto de alta quanto baixa massa molecular, e spots bem definidos em géis 2-DE, além de ser um protocolo simples e de fácil execução, o que aumenta sua processividade.

Agradecimentos

Este trabalho foi parcialmente financiado Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), (Projeto No. 02.13.08.005.00.00) e pela Fundação Carlos Chagas de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) sob a forma de bolsa de Iniciação Científica da primeira autora (Projeto No. E-26/202.404/2015).

Referências

- BALBUENA, T. S.; SILVEIRA, V.; JUNQUEIRA, M.; DIAS, L. C. D.; SANTA-CATARINA, C.; SHEVCHENKO, A.; FLOHA, E.I.S. Changes in the 2-DE protein profile during zygotic embryogenesis in the Brazilian Pine (*Araucaria angustifolia*). **Journal of Proteomics**, v. 72, n. 3, p. 337-352, 2009.
- BODZON-KULAKOWSKA, A.; BIERCZYNSKA-KRZYSIK, A.; DYLAG, T.; DRABIK, A.; SUDER, P.; NOGA, M.; JARZEBINSKA J.; SILBERRING J. Methods for samples preparation in proteomic research. **Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 849, n. 1-2, p. 1-31, 2007.
- CARPENTIER, S. C.; WITTERS, E.; LAUKENS, K.; DECKERS, P.; SWENNEN, R.; PANIS, B. Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: an evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. **Proteomics**, v. 5, n. 10, p. 2497-2507, 2005.
- DAMERVAL, C.; VIENNE, D. D.; ZIVY, M.; THIELEMENT, H. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. **Electrophoresis**, v. 7, n. 1, p. 52-54, 1986.
- GÖRG, A.; KLAUS, A.; LÜCK, C.; WEILANDAND, F.; WEISS, W. **Two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients for proteome analysis. A laboratory manual**. Technische Universität München, 2007. 166p.
- GÖRG, A.; OBERMAIER, C.; BOGUTH, G.; HARDER, A.; SCHEIBE, B.; WILDGRUBER, R.; WEISS, W. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis**, v. 21, n. 6, p. 1037-1053, 2000.
- GÖRG, A.; WEISS, W.; DUNN, M. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**, v. 4, n. 12, p. 3665-3685, 2004.
- HURKMAN, W. J.; TANAKA, C. K. Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. **Plant Physiology**, v. 81, n. 3, p. 802-806, 1986.
- ISAACSON, T.; DAMASCENO, C. M.; SARAVANAN, R. S.; HE, Y.; CATALÁ, C.; SALADIÉ, M.; ROSE, J.K. Sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of plant tissues. **Nature Protocols**, v. 1, n. 2, p. 769-774, 2006.
- SANTONI, V. ROUQUIÉ, D.; DOUMAS, P. Mansion M, Boutry M, Degand H, Dupree P, Packman L, Sherrier J, Prime T, Bauw G, Posada E, Rouzé P, Dehais P, Sahnoun I, Barlier I, Rossignol M. Use of a proteome strategy for tagging proteins present at the plasma membrane. **The Plant Journal**, v. 16, n. 5, p. 633-641, 1998.
- SCHUSTER, A. M.; DAVIES, E. Ribonucleic acid and protein metabolism in pea epicotyls: The aging process. **Plant Physiology**, v. 73, n. 3, p. 809-816, 1983.

SHEORAN, I. S.; ROSS, A. R. S.; OLSON, D. J. H.; SAWHNEY, V. K. Compatibility of plant protein extraction methods with mass spectrometry for proteome analysis. **Plant Science**, v. 176, n. 1, p. 99-104, 2009.

WANG, W.; SCALI, M.; VIGNANI, R.; SPADAFORA, A.; SENSI, E.; MAZZUCA, S.; CRESTI, M. Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds. **Electrophoresis**, v. 24, n. 14, p. 2369-2375, 2003.

WANG, W.; TAI, F.; CHEN, S. Optimizing protein extraction from plant tissues for enhanced proteomics analysis. **Journal of Separation Science**, v. 31, n. 11, p. 2032-2039, 2008.

WANG, W.; VIGNANI, R.; SCALI, M.; CRESTI, M. A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. **Electrophoresis**, v. 27, n. 13, p. 2782-2786, 2006.

WILKINS, M. R.; SANCHEZ, J. C.; GOOLEY, A. A.; APPEL, R. D.; HUMPHERY-SMITH, I.; HOCHSTRASSER, D. F.; WILLIAMS, K. L. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 13, n. 1, p. 19-50, 1996.

WU, X.; GONG, F.; WANG, W. Protein extraction from plant tissues for 2DE and its application in proteomic analysis. **Proteomics**, v. 14, p. 645-658, 2014.

Exemplares desta edição
podem ser adquiridos na:

Embrapa Agrobiologia
BR465, km7
Caixa Postal 74505
CEP 23891-000, Seropédica, RJ
Fone: (21) 3441-1500
Fax: (21) 2682-1230
www.embrapa.br/agrobiologia
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

1ª edição

1ª impressão (2019): 50 exemplares

Comitê Local de Publicações
da Embrapa Agrobiologia

Presidente
Bruno José Rodrigues Alves
Secretário-Executivo
Carmelita do Espírito Santo

Membros
*Ednaldo Silva de Araújo, Janaina Ribeiro
Costa Rouws, Luc Felicianus Marie Rouws,
Luis Cláudio Marques de Oliveira, Luiz
Fernando Duarte de Moraes, Maria Elizabeth
Fernandes Correia, Marcia Reed Rodrigues
Coelho, Nádia Élen Auras*

Supervisão editorial
Maria Elizabeth Fernandes Correia

Normalização bibliográfica
Carmelita do Espírito Santo

Tratamento das ilustrações
Maria Christine Saraiva Barbosa

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Maria Christine Saraiva Barbosa

Foto da capa
Lumi Shiose



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO

