

Precipitação de Proteínas com Sulfato de Amônio Saturado

(Obtenção de globulina total)

O sulfato de amônia saturado altera as características estruturais das proteínas fazendo com que as mesmas percam a capacidade de se tornarem solúveis, sendo assim, na presença deste as proteínas precipitam.

Procedimento:

3,5ml de soro de cão (“pool”)

3,5 de tampão Borato de Sódio 0,1M pH 7,4 (o Borato de Sódio é uma substância inorgânica que tem como finalidade impedir o crescimento de contaminantes bacterianos)

7,0ml Sulfato de Amônio saturado (deve ser colocado aos poucos para que a precipitação ocorra de maneira adequada. Se precipitar tudo de uma vez fica difícil desfazer o “pellet”)

Coloca-se 3,5ml de soro + 3,5ml do tampão Borato em um béquer e leva-se ao agitador. Acrescenta-se o Sulfato de Amônia aos poucos (7,0ml), deixa no agitador por 10 minutos aproximadamente. Em seguida, transfere-se a solução para um tudo de rosca de centrífuga e acrescenta-se mais 7,0ml de Sulfato de Amônia saturado. O material é centrifugado por 20 minutos a 5000rpm. Após a centrifugação, despreza-se o sobrenadante ficando apenas o “pellet” no fundo do recipiente.

Acrescenta-se 5,0ml de solução de PBS pH 7,2 ao precipitado para diluir as proteínas (desfaz o “pellet”). Em seguida, passa-se este conteúdo para a membrana de diálise, amarrando-se as extremidades do mesmo com barbante.

Coloca-se a membrana em um béquer estéril e acrescenta-se 200ml de PBS, deixando o material no agitador por uma hora. Em seguida troca-se o PBS por um novo e deixa o material “overnight” na geladeira.

Se houver a necessidade, troca-se novamente o PBS e deixa por mais 4 horas. Quanto maior a quantidade de PBS para a diálise, melhor é o resultado.

A diálise é um fenômeno similar à osmose que ocorre nas paredes das células de plantas e animais permitindo a passagem de água, íons e moléculas pequenas, mas restringe a passagem de proteínas.