

	MANUAL – BIOLOGIA MOLECULAR	
Data: 01/07/2018	LABORATÓRIO DE METABOLISMO E LÍPIDES	Nº: 010
Próxima revisão:		Versão: 04
01/07/2019		Página 1

WESTERN BLOT

Introdução

Um Western blot é um método em biologia molecular e bioquímica para detectar proteínas em um homogenato (células bem trituradas) ou um extrato de um tecido biológico. Essa técnica usa eletroforese em gel para separar as proteínas desnaturadas por massa. As proteínas são então transferidas do gel para uma membrana (tipicamente de nitrocelulose), onde foram usados como sonda anticorpos específicos à proteína. Como um resultado, os pesquisadores podem examinar a quantidade de proteína em uma dada amostra e comparar os níveis entre diversos grupos. O nome Western blot é um trocadilho do nome Southern blot, uma técnica para detecção de DNA desenvolvida anteriormente por Edwin Southern. Também há uma técnica chamada Northern blot que serve para a detecção de RNA.

Fragmentos de 1mg de tecido deverá ser colocado em 1mL de tampão tampão de lise A ou RIPA gelado com seus inibidores (1uL de aprotinina, 1uL de leupeptina e 10uL de PMSF) e homogeneizados em polytron. As amostras deverão ser agitadas por 2 horas, centrifugadas a 12.000rpm, por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante deverá ser coletado.

Elaborado por: Maria Carolina Guido	Aprovado por: Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão
Revisado por: Carolina Graziani Vital	



MANUAL – BIOLOGIA MOLECULAR



Data: 01/07/2018

Próxima revisão:

01/07/2019

LABORATÓRIO DE METABOLISMO E LÍPIDES

Nº: 010

Versão: 04

Página 2

Tampão de lise A	50mL
Hepes	0,238g
NaCl	0,44g
Glicerol	5mL
Triton	0,5mL
EGTA	0,019g
MgCl ₂	0,0153g

RIPA	50mL
Tris base pH 8,0	0,121g
NaCl	0,4g
NP-40	0,5mL
Glicerol	5,75mL

Aprotinina	1mL de Hepes 20mM
	0,001g

Leupeptina	1mL de Hepes 20mM
	0,001g

PMSF	10mL de etanol
	0,174g

A determinação da concentração de proteínas será realizada pelo método de Pierce 660nm. O cálculo da dosagem protéica deve ser realizado da seguinte forma:

Branco – 40uL PBS 1x + 120uL Pierce 660

Elaborado por: Maria Carolina Guido	Aprovado por: Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão
Revisado por: Carolina Graziani Vital	

	MANUAL – BIOLOGIA MOLECULAR	
Data: 01/07/2018	LABORATÓRIO DE METABOLISMO E LÍPIDES	Nº: 010
Próxima revisão:		Versão: 04
01/07/2019		Página 3

Curva

C1: 1mg/mL – 1uL BSA (1mg/mL) + 39uL PBS 1x + 120uL Pierce 660

C2: 2mg/mL – 2uL BSA (1mg/mL) + 38uL PBS 1x + 120uL Pierce 660

C3: 1mg/mL – 4uL BSA (1mg/mL) + 36uL PBS 1x + 120uL Pierce 660

C4: 1mg/mL – 8uL BSA (1mg/mL) + 32uL PBS 1x + 120uL Pierce 660

C5: 1mg/mL – 16uL BSA (1mg/mL) + 24uL PBS 1x + 120uL Pierce 660

Amostras

A: 1mg/mL - 1uL BSA (1mg/mL) + 39uL PBS 1x + 120uL Pierce 660

PBS	1L 10x pH 7,2 ou 7,3
Na ₂ HPO ₄ (anidro)	11,05g
KH ₂ PO ₄	3,2g
NaCl	80g
KCl	2g

Após a obtenção das concentrações das amostras, deve-se calcular o volume necessário das amostras para se obter uma concentração protéica de 50ug. Após esse cálculo, acrescentar 1/3 do volume de tampão de amostra e congelar a -20°C.

Tampão de amostra	25mL
Tris HCl pH 6,8	0,788g
2-Mercaptoetanol	75mL
SDS	2g
Bromofenol	0,02g
Glicerol	10mL

Elaborado por: Maria Carolina Guido	Aprovado por: Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão
Revisado por: Carolina Graziani Vital	

	MANUAL – BIOLOGIA MOLECULAR	
Data: 01/07/2018 Próxima revisão: 01/07/2019	LABORATÓRIO DE METABOLISMO E LÍPIDES	Nº: 010
		Versão: 04
		Página 4

Para separação protéica, gel de acrilamida deverá ser preparado. A concentração deve ser determinada pelo tamanho da proteína de estudo. A tabela abaixo mostra os reagentes, as soluções e a quantidade que deve ser aplicada para a formação dos géis resolving e stacking.

Acrilamida-bis 30%	200mL
Acrilamida	58g
Bis	2g

Tris 1,5M (resolving)	200mL
Tris-base	36,33g

Tris 1M (stacking)	50mL
Tris base	6,1g
Tris HCl	7,9g
SDS 10%	200mL
SDS	20g

Persulfato de amônio	10mL
Persulfato de amônio	1g

Elaborado por: Maria Carolina Guido	Aprovado por: Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão
Revisado por: Carolina Graziani Vital	



MANUAL – BIOLOGIA MOLECULAR



Data: 01/07/2018

Próxima revisão:

01/07/2019

LABORATÓRIO DE METABOLISMO E LÍPIDES

Nº: 010

Versão: 04

Página 5

Solutions for Tris/glycine SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

6%	5 ml	10 ml	15 ml	20 ml	25 ml	30 ml	40 ml	50 ml
H ₂ O	2.6	5.3	7.9	10.6	13.2	15.9	21.2	26.5
30% Acrylamide mix ^{a,c}	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	8.0	10.0
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% SDS ^{b,c}	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% APS ^{c,d}	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED ^{d,e}	0.004	0.008	0.012	0.016	0.02	0.024	0.032	0.04
8%	5 ml	10 ml	15 ml	20 ml	25 ml	30 ml	40 ml	50 ml
H ₂ O	2.3	4.6	6.9	9.3	11.6	13.9	18.5	23.2
30% Acrylamide mix	1.3	2.7	4.0	5.3	6.7	8.0	10.7	13.3
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% APS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.003	0.006	0.009	0.012	0.015	0.018	0.024	0.03
10%	5 ml	10 ml	15 ml	20 ml	25 ml	30 ml	40 ml	50 ml
H ₂ O	2.0	4.0	5.9	7.9	9.9	11.9	15.8	19.8
30% Acrylamide mix	1.7	3.3	5	6.7	8.3	10.0	13.3	16.7
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% APS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
12%	5 ml	10 ml	15 ml	20 ml	25 ml	30 ml	40 ml	50 ml
H ₂ O	1.6	3.3	4.9	6.6	8.2	9.9	13.2	16.5
30% Acrylamide mix	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0	12.0	16.0	20.0
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% APS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
15%	5 ml	10 ml	15 ml	20 ml	25 ml	30 ml	40 ml	50 ml
H ₂ O	1.1	2.3	3.4	4.6	5.7	6.9	9.2	11.4
30% Acrylamide mix	2.5	5.0	7.5	10.0	12.5	15.0	20.0	25.0
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% APS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
STACK	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	6 ml	8 ml	10 ml
H ₂ O	0.68	1.4	2.1	2.7	3.4	4.1	5.5	6.8
30% Acrylamide mix	0.17	0.33	0.5	0.67	0.83	1.0	1.3	1.7
1.0 M Tris (pH 6.8)	0.13	0.25	0.38	0.5	0.63	0.75	1.0	1.25
10% SDS	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
10% APS	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
TEMED	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	0.006	0.008	0.01

^aCommonly 29.2% acrylamide and 0.8% N,N'-methylene-bisacrylamide; ^bsodium dodecyl sulfate; ^cammonium persulfate; ^dN,N,N',N'-tetramethylethylenediamine; ^e see Appendix IV for caution.

For additional Portable Protocol sets call 800-843-4388/Continental U.S. and Canada, other locations 516-349-1930; Fax 516-349-1946; E-mail calhoun@calhoun.org

Elaborado por: Maria Carolina Guido

Revisado por: Carolina Graziani Vital

Aprovado por:

Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão

	MANUAL – BIOLOGIA MOLECULAR	
Data: 01/07/2018	LABORATÓRIO DE METABOLISMO E LÍPIDES	Nº: 010
Próxima revisão:		Versão: 04
01/07/2019		Página 6

Após polimerização do gel, as amostras contendo o tampão de amostra, devem ser aquecidas a 95°C por 5 minutos e aplicados no stacking. Lembrar de colocar em uma lane 7,5uL de marcador.

A eletroforese deverá ser iniciada por 70V por 35 minutos, tempo esse suficiente para que as amostras migrem para a região resolving. Após essa etapa, aumentar a voltagem para 250V por aproximadamente 90 a 120 minutos. Interromper a corrida após as amostras terem “caído” do resolving. Essa voltagem e tempo é equivalente para 4 géis. O tampão de corrida está detalhado abaixo.

Tampão de corrida	1L 10x pH8,3
Glicina	144g
Tris-base	30,2g
SDS	10g

Após a corrida, será realizada a transferência das proteínas do gel para membrana de nitrocelulose. Para isso, o sistema deverá ser montado nessa ordem: suporte parte branca, esponja, papel filtro, membrana, gel, papel filtro, esponja e suporte parte preta. O tampão de transferência deve estar gelado e a corrida também deve ser feita no gelo. O tempo da transferência é de 60 minutos e corrente de 350mA e 100V.

Tampão de transferência	1L	2L
Tris base	5,81g	11,62g
Glicina	2,93g	5,85g
SDS	0,37g	0,74g
Metanol	200mL	400mL

Elaborado por: Maria Carolina Guido	Aprovado por: Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão
Revisado por: Carolina Graziani Vital	

	MANUAL – BIOLOGIA MOLECULAR	
Data: 01/07/2018	LABORATÓRIO DE METABOLISMO E LÍPIDES	Nº: 010
Próxima revisão:		Versão: 04
01/07/2019		Página 7

Com o término da corrida a membrana deverá ser corada com Ponceau S ou kit para verificar a transferência das proteínas para a membrana. O Ponceau S deverá ser retirado da membrana com lavagens de TBS-T.

Ponceau S
Ácido acético 5%
Ponceau S 0,1%

TBS-T	1L 1x pH7,6
Tris base	1,21g
NaCl	8,76g
Tween	1mL

O bloqueio da membrana deverá ser em 5% de leite desnatado ou em BSA diluído em TBS-T por no mínimo 60 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, a membrana deve ser incubada com anticorpo primário por 12 horas a 4°C, diluído em TBS-T. A concentração do anticorpo deve ser determinada de acordo com a bula do anticorpo de estudo.

Após incubação, lavar a membrana 3 vezes com TBS-T por 5 minutos cada e incubar com anticorpo secundário também diluído em TBS-T por 120 minutos em temperatura ambiente.

Por fim, lavar as membranas por 3 vezes com TBS-T por 5 minutos cada e incubar a membrana com revelador quimioluminescente (ECL) por 3 a 5 minutos (kit ou preparar solução de ECL). As bandas deverão ser observadas em fotodocumentador Amersham Imager 600.

Elaborado por: Maria Carolina Guido	Aprovado por: Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão
Revisado por: Carolina Graziani Vital	



MANUAL – BIOLOGIA MOLECULAR



Data: 01/07/2018

Próxima revisão:

01/07/2019

LABORATÓRIO DE METABOLISMO E LÍPIDES

Nº: 010

Versão: 04

Página 8

ECL

100uL luminol

44uL ácido p coumárico

10uL água oxigenada

2mL tris 1M pH 8,5

18mL de água milliQ

Elaborado por: Maria Carolina Guido

Revisado por: Carolina Graziani Vital

Aprovado por:

Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão