

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 034
		Edição: 05
Área: Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 1/12
Assunto: Western Blotting Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

*ÍNDICE

1. OBJETIVO
2. ABRANGÊNCIA
3. RESPONSABILIDADES
4. DOCUMENTOS COMPLEMENTARES
5. DEFINIÇÕES
6. DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS
7. FLUXOGRAMAS
8. ANEXOS
9. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

<i>Edição</i>	<i>Alteração</i>
01	Emissão inicial do documento em 27/07/2015. <i>Nota: inicialmente o conteúdo deste documento estava disponível no ONADOCS , POP 063; com data de vigência de 27/07/2015.</i>

Elaborado por: Joyce T. Kawakami Suely Aparecida Pinheiro Palomino Biologistas	27/07/2015	Aprovado por: Prof.Dra Maria Lourdes Higuchi Pesquisadora	15/03/21
---	------------	--	----------

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 034
		Edição: 05
Área: Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 2/12
Assunto: Western Blotting Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

1. OBJETIVO

- 1.1 Estabelecer normas para a utilização do método Western Blot, utilizado no Laboratório de Patologia Cardíaca, para avaliar a expressão proteica de proteínas em amostras de soro (pellet e sobrenadante) separado em meio H ou tecido (coração, vaso e etc)

2. ABRANGÊNCIA

- 2.1 Todos os colaboradores, alunos e estagiário.

3. RESPONSABILIDADES

- 3.1 Não aplicável.

4. DOCUMENTOS COMPLEMENTARES

- 4.1 Não aplicável.

5. DEFINIÇÕES

- 5.1 Os avanços na biologia molecular têm contribuído significativamente para o entendimento da etiopatogênese das doenças. Proteínas realizam diferentes funções no organismo e são responsáveis por manter sua homeostase. Mudanças em sua composição podem desencadear processos patológicos, sendo de grande importância, a aplicação de métodos moleculares para identificação de marcadores de doenças

O advento da técnica de Western blotting, na década de 70, possibilitou que proteínas separadas pela eletroforese fossem detectadas, caracterizadas e quantificadas. O *western blot* (por vezes chamado imunoblot de proteínas ou transferência western) é um método em biologia molecular e bioquímica para detectar proteínas numa amostra de homogenato (células bem trituradas) de tecidos biológicos ou estratos. Essa técnica usa eletroforese em gel para separar as proteínas nativas pela sua estrutura tridimensional ou proteínas desnaturizadas pelo comprimento da sua cadeia polipeptídica. As proteínas são então transferidas do gel para uma membrana (tipicamente de nitrocelulose ou PVDF), sendo uma técnica de blotting ou transferência. Uma vez na membrana são usados como sonda anticorpos específicos para a proteína alvo. A passagem de electroforese em gel é incluída

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 034
		Edição: 05
Área: Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 3/12
Assunto: Western Blotting Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

nas análises de western blot para resolver o problema da reatividade cruzada dos anticorpos. Como resultado, os pesquisadores podem examinar a quantidade de proteína em uma dada amostra e comparar os níveis entre diversos grupos.

6. DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

6.1 Extração de proteína em amostras de soro:

6.1.1 Estoques: soluções que será usada para preparar o RIPA buffer 4X

Tabela 01: Solução de NaCl 5M

Reagente	Peso Molecular	Quantidade
NaCl	58,44	2,922 g
Água Injeção q.s.p		10 mL de água

Tabela 02: Solução de Tris pH8 1M

Reagente	Peso Molecular	Quantidade
TRIS	121,14	1,211 g
Água Injeção q.s.p		10 mL de água

Tabela 03: Solução de NP40 10%

Reagente	Peso Molecular	Quantidade
NP40 Alternative	CAS 9016-45-9 - Calbiochem	1 mL
Água Injeção q.s.p		10 mL de água

Tabela 04: Solução de Deoxicolato de Sódio 10%

Reagente	Peso Molecular	Quantidade
Deoxicolato de Sódio	414,55	1 grama
Água Injeção q.s.p		10 mL de água

Tabela 05: Solução de EDTA 50 mM

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 034
		Edição: 05
Área: Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 4/12
Assunto: Western Blotting Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

Reagente	Peso Molecular	Quantidade
EDTA	374,24	0,232 grama
Água Injeção q.s.p		10 mL de água

Tabela 06: Solução de SDS 10%

Reagente	Peso Molecular	Formula	Quantidade
SDS	288.38 g mol ⁻¹	C ₁₂ H ₂₅ SO ₄ Na	1 grama
Água Injeção q.s.p			10 mL de água

Tabela 07: Solução de EDTase free 10X (Inibidor de Protease)

Reagente	Marca	código	local
EDTase free 10X	Sigma	S8830	Aliquotados no -20°C - 200 <input type="checkbox"/> l

6.1.3 Solução de Uso

Tabela 08: RIPA - Solução 4X conc.

6.1.1 Solução Estoque	Quantidade
Tab.01 Solução de NaCl 5M	600 µL
Tab.02 Solução de Tris pH8 1 M	1000 µL
Tab.03 Solução de NP40 10%	200 µL
Tab.04 Solução de Deoxicolato de Sódio 10%	1000 µL
Tab.05 Solução de EDTA 50 mM*	500 µL
Tab.06 Solução de SDS 10%	200 µL
Água Injeção q.s.p	5mL

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 034
		Edição: 05
Área: Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 5/12
Assunto: Western Blotting Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

Tabela 09: RIPA Solução 1X. com EDTA Free

Solução	Quantidade
Tabela 08 RIPA - Solução 4 X	1 parte
Água Injeção	3 partes
Tabela 07 EDTA free 10X	0,4 partes
NaCl/150 mM, Tris pH8/50 mM, NP40/1%, Deoxicolato de Sódio/0,5%, EDTA/5 mM, SDS/0,1%	

Tabela 10: RIPA Solução 1X. com EDTA Free e Amostra

Solução	Quantidade
Tabela 08 RIPA - Solução 4 X	1 parte
Amostra	3 partes
Tabela 07 EDTA free 10X	0,4 partes
NaCl/150 mM, Tris pH8/50 mM, NP40/1%, Deoxicolato de Sódio/0,5%, EDTA/5 mM, SDS/0,1%	

6.1.4 Solução Final :

Tabela 10: RIPA 1X /Amostra/EDTA Free

Solução. vortexar fortemente por 1 min, e em seguida centrifugar a 14.000 rpm por 5 min à 4°C

Obs.Extração suficiente somente para amostras em suspensão. Para extração tecidual, verificar o que seria ideal. O recomendado encontra-se anexado nesse POP.(?)

Transferir o sobrenadante para um novo eppendorf devidamente identificado, e descartar o sobrenadante contendo os debris celulares. Adicionar 10% de inibidores de proteases 10X, que está armazenado no freezer -20°C .Essa será sua amostra de USO!

6.2 **Dosagem de Proteínas:**

6.2.1 Método BCA

 PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 034
	Edição: 05
Área: Laboratório de Patologia Cardíaca	Página: 6/12
Assunto: Western Blotting Limpeza do Local	Vigência: 08/03/2021

Tabela 11: Solução reagente do Micro BCA™ Protein Assay Kit)

Reagente	Quantidade
reagente A	50 µL
reagente B	49 µL
reagente C	1 µL

Tabela 12: Preparar os pontos da curva (20 µL). Diluição Seriada

Tubos	Reagente		
	Quantidade		Concentração final
	Tab.09 RIPA 1X/EDTA	Transferência dos pontos	
BLANK	20µl	20µl	0 mg
Ponto 1	20µl	20 µl e BSA 2mg/ml	1 mg/ml
Ponto 2	20µl	Retirar do Ponto 1 a quantidade de 20 µl	0,5 mg/ml
Ponto 3	20µl	Retirar do Ponto 2 a quantidade de 20 µl	250 mg/ml
Ponto 4	20µl	Retirar do Ponto 3 a quantidade de 20 µl	0,125 mg/ml
Ponto 5	20µl	Retirar do Ponto 4 a quantidade de 20 µl	0,063 mg/ml
Descarte	20µl	Retirar do Ponto 5 a quantidade de 20 µl	

6.2.1.1 Diluição ideal das amostras de soro separado em meio H [P18/01, P14/01] 1 µL de amostra+ 19 µL de RIPA 1 x EDTA

Obs: O reagente de detecção não reage na ausência de EDTA. Caso a amostra seja designada para Zimografia (onde EDTA não pode ir), diluir a amostra em RIPA com adição de EDTA. para que possa ocorrer a reação colorimétrica.

Após a diluição da curva seriada e da amostra, adicionar 20 uL do reagente de detecção BCA (A+B+C) aos pontos da curva e da amostra. Aquecer no banho seco à 60 °C por 1 hora antes de dosar.

6.2.1.2 Realizar dosagem no Nanodrop

Abrir o programa ND1000> Protein BCA

Clicar em “Standard”

Adicionar os pontos da curva (0.063, 0.125, 0.250, 0.5, 1)

Dosar 2x cada amostra, clicando em measure para realizar quantificação.

Caso dê discrepância entre as duplicatas, mensurar o BLANK novamente

6.2.1.3 Inserir na equação da curva no Excel, para detectar concentração final.

Criar gráfico de dispersão:

Y: concentração (pts da curva)

X: absorbância (média)

Função para calcular suas amostras ($f = (\text{célula} - \text{valor após X/valor de Y})$)

6.2.2 Método BRADFORD

Preparar NaCl 0,2 N e BSA 1ug/mL.

Nos wells 1-8 (A e B) preparar a curva.

* Branco: 20uL de NaCl 0,2 N + 180uL de Bradford

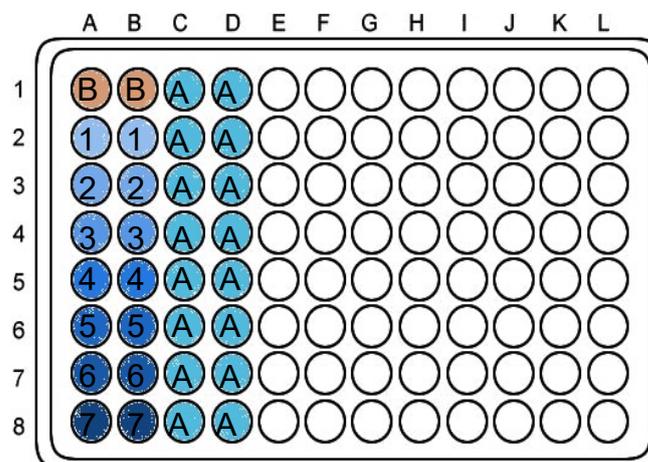
* Ponto 1: 19 uL de NaCl 0,2 N + 180uL de Bradford + 1 uL de BSA

* Ponto 2: 18 uL de NaCl 0,2 N + 180uL de Bradford + 2 uL de BSA

* Ponto 3: 17 uL de NaCl 0,2 N + 180uL de Bradford + 3 uL de BSA

Prosseguir da mesma forma até o ponto 7 ou 8

* Para as amostras: 19 uL de NaCl 0,2 N + 180uL de Bradford + 1 uL da amostra



Lembrar de adicionar $\frac{1}{4}$ de tampão Laemmili 4X (NuPAGE™ LDS Sample Buffer) referente ao valor do volume final. E acrescentar $\frac{1}{10}$ do volume de DTT 10X na amostra com o Laemmili buffer.

*Para amostras da Zimografia não adicionar Laemmili buffer pois o mesmo contém EDTA, neste caso preparar o tampão de amostra Tris-Glycine SDS sample buffer 2X.

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 034
		Edição: 05
Área: Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 8/12
Assunto: Western Blotting Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

Tabela 13 Tris-Glycine SDS sample buffer 2X (10 mL)

Solução	Quantidade
0,5M Tris-HCl, pH 6,8	2,5 mL (0,788g em 10 mL)
Glicerol	2 mL
10% (w/v) SDS	4 mL (1 g em 10 mL de água)
0,1% (w/v) Azul de Bromofenol	0,5 mL (0,01g em 10 mL de água)

Após aliquotar os volumes necessários para concentração desejada, aquecer no banho seco à 100°C por 5 min, para desnaturação.

****Observações: Para Zimografia não aquecer a amostra!**

6.3 Corrida de Eletroforese

Tabela 14 Preparar tampão de corrida 10X e depois diluir para 1X. Após diluir, estocar em geladeira em frasco âmbar (4°C).

Solução	Quantidade	
Tris base	30,2g	MW: 121,14
Glicina	144g	MW: 75,07
SDS	10g	MW:288,38

Obs Misturar os reagentes acima e completar para 900 mL de água MilliQ. Acertar o pH para 8,3 (usar HCl fumegante) e ajustar o volume final para 1L.

6.3.1 Preparar gel de poliacrilamida (Stacking e Resolving .: Quanto mais pesada a proteína menos concentrado deverá ser o gel (6%-8%), para proteínas leves mais concentrado deverá ser (12%-15%), e proteínas de pesos intermediários recomenda-se 10% ou 8%).

6.3.2 Colocar o gel e o gasket na cuba de eletroforese. Posteriormente, adicionar tampão de corrida gelado até cobrir. (O tampão de corrida pode ser re-utilizado, quando começar a ficar amarelo claro descartar na pia).Adicionar o ladder e as amostras de interesse.

6.3.3 Correr 140V – por ~1 h e 30 min (monitorar a cada 30 minutos durante a corrida). Quanto mais denso for o gel mais irá demorar pra correr, dessa forma quando o gel for menos denso mais rápido irá correr. Após a corrida realizar transferência.

Figura 01

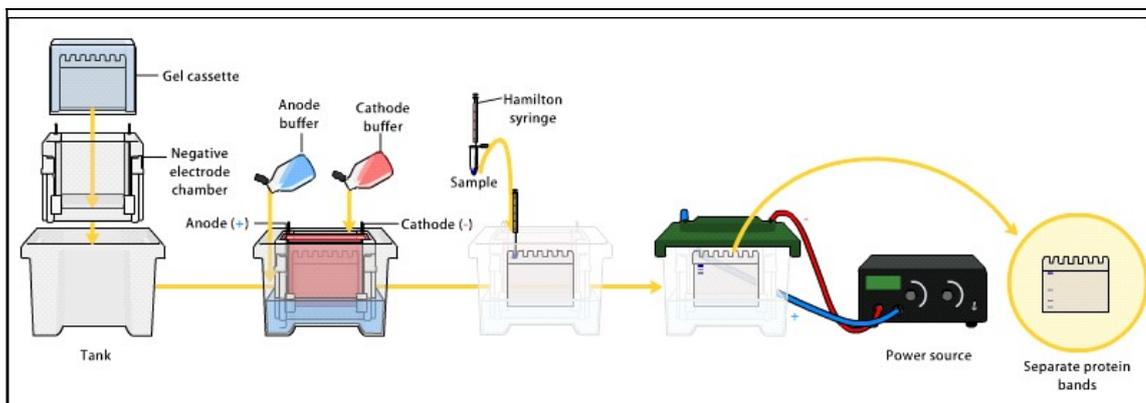


Tabela 15 Preparar, Tampão de Transferência 1X – semi dry (pH 8,3)

Solução	Quantidade		
	500 mL	1 L	2 L
Glicina	1,45 g	2,9 g	5,8 g
Tris base	2,9 g	5,8 g	11,6 g
SDS	0,1355g	0,37 g	0,74 g
Metanol	100 mL	200 mL	400 mL
H2O	até 400 mL	até 800 mL	até 1.600 mL

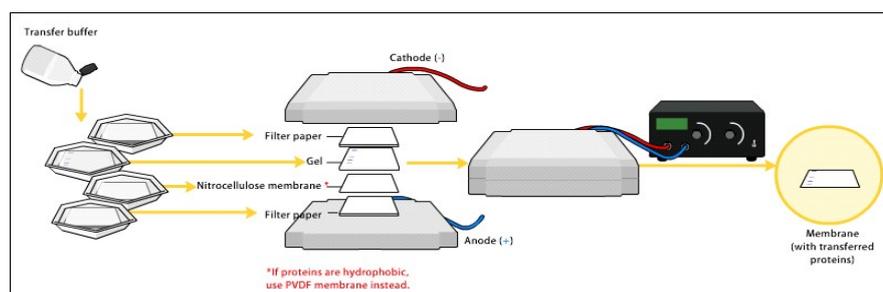
Tabela 16 Tampão de Transferência Towbin 10X – úmida (pH 8,3)

Solução	Quantidade
	1L (H2O q.s.p)
Glicina	144,1 g
Tris base	30,3 g
SDS 20%	5 mL (opcional)

OBS: Para preparar 1X diluir (100 mL 10X+200mL de metanol e completar para 1L com água de injeção)

6.3.4 Incubar gel, membrana de nitrocelulose 0,45 um (AMERSHAM – ref: RPN203D) e esponja “filter paper” (Blot Absorbent Filter Paper Bio-Rad – ref: 1703965) no tampão de transferência por 10 minutos. Montar o “sanduíche” da transferência (esponja-membrana-gel-esponja) (Obs: Para transferência úmida montar no mesmo sistema da corrida).

Figura 02



6.3.5 Na transferência úmida montar o “sanduíche” em cima do lado transparente (papel filtro-membrana-gel e papel filtro). A parte transparente ficará inserida para o lado vermelho do suporte interno da cuba!. Colocar para transferir – Semi dry: (20 V – 1 hora) / Úmida: (100V - 1 h)

6.3.6 Após a transferência, corar a membrana com Ponceau, para confirmação da eficiência da transferência. Pesar 0,5 g de Ponceau e diluir em aproximadamente 250 mL de água. Adicionar 50 mL de ácido acético glacial lentamente (capela!). Completar o volume final para 500 mL com água MilliQ. Armazenar na geladeira em frasco escuro!
Lavar membrana com TBST 0,1. até retirar todo o ponceau.

Tabela 17 TBST 0,1% (2L)

Solução	Quantidade		
	2 L	4 L	6 L
NaCl	17,53 g	35,06	43,83
Tris base	12,11 g	24,22	30,28
Tween 20	11 mL	4 mL	5 mL

Pesar os reagentes e diluir em um volume menor que o final para, poder ajustar o pH para 7,5 com HCl 3N. Completar o volume final com água de injeção.

6.4 Incubação

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 034
		Edição: 05
Área: Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 11/12
Assunto: Western Blotting Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

6.4.1 Após a etapa da transferência. Incubar *overnight* a 4°C, sob agitação constante, com anticorpo primário diluído em TBST 1X. Lavar membrana com TBST 1X (3x – 10 minutos) sob agitação constante.

Incubar com anticorpo secundário (T.A – 1 hora) sob agitação constante.. Repetir etapa de lavagem (2).As membranas serão incubadas (5 min – T.A.) com solução de ECL (Enhanced Chemiluminescence – Thermo Fisher Scientific® inc, Waltham, MA, Estados Unidos), a fim de promover uma reação de luminescência.

6.4.2 Realizar impressão do produto em filmes de raios-X (CL-XPosure™ Film, 7 x 9.5 in. (18 x 24 cm) (ref. 34089). - Colocar o filme sobre a membrana, envolvê-la com plástico filme, e colocá-la no cassete. Em câmara escura, cortar o filme, colocá-lo dentro do cassete, durante 5min (variável).- Retirar o filme e revelá-lo, deixando-o 2 minutos em solução reveladora, lavar, deixar mais dois minutos em solução fixadora. (100 mL de revelador – 100 mL de fixador)

6.4.3 Se a aquisição for feita pelo fotodocumentador, ignorar a o Item 6.4.2.

6.5 **Quantificação pelo programa UVITEC (UVI-1D) da proteína**

6.5.1 Open> Analysis > Quantification > New lane> Selecione a banda de interesse com o cursor em “caixa”> Next> Background subtraction – “do rolling ball” se quiser remover fundo> Delet All > Add separation > Next. Copie os resultados dados em vol de pixels no excel.

6.6 **Limpeza**

Após o término limpar com uma gaze com álcool 70°C, o local, lavar todo material utilizado e guardar. Conservar o local limpo e organizado

6.7 **EPI:** Luvas nitrílicas, avental

6.8 **EPC:** Fluxo Laminar e Estação de Trabalho

7. **FLUXOGRAMAS**

7.1 Não aplicável.

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 034
		Edição: 05
Área: Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 12/12
Assunto: Western Blotting Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

8. ANEXOS

8.1 Não aplicável.

9. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

9.1 .