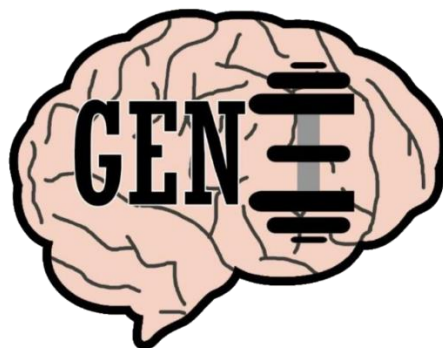


UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
GRUPO DE ESTUDOS EM NEUROCIÊNCIAS E EXERCÍCIO
LABORATÓRIO EXPERIMENTAL DE TREINAMENTO FÍSICO
DEPARTAMENTO DE EDUCAÇÃO FÍSICA



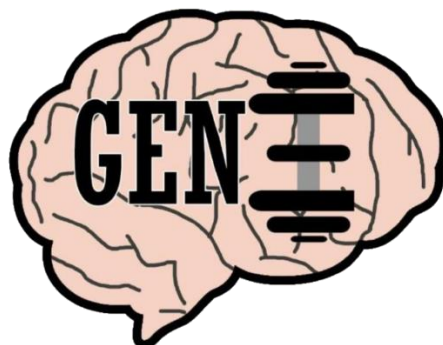
MANUAL TÉCNICO E DE OPERAÇÃO DO *WESTERN BLOT*

Ricardo Augusto Leoni de Sousa

Diamantina-MG

2021

Ricardo Augusto Leoni de Sousa

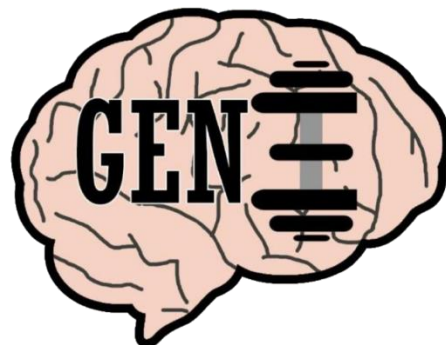


MANUAL TÉCNICO E DE OPERAÇÃO DO *WESTERN BLOT*

Manual técnico e de operação do *western blot* para uso dos alunos de iniciação científica e pós-graduação, professores e técnicos, elaborado no Laboratório Experimental de Treinamento Físico, pertencente ao Departamento de Educação Física, como parte dos trabalhos realizados no Pós-doutorado do Dr. Ricardo Augusto Leoni de Sousa e sob supervisão do Prof. Dr. Ricardo Cardoso Cassilhas.

Diamantina-MG

2021



Catálogo na fonte - Sisbi/UFVJM

S725m Sousa, Ricardo Augusto Leoni de

2021 Manual técnico e de operação do western blot / Ricardo Augusto Leoni de Sousa; supervisão: Ricardo Cardoso Cassilhas -- Diamantina, 2021.

43 p. : il.

Grupo de Estudos em Neurociências e Exercício; Laboratório Experimental de Treinamento Físico; Departamento de Educação Física da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Programa de Pós-Graduação em Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, Diamantina, 2021.

1. Biologia molecular. 2. Proteína. 3. Anticorpo. I. Cassilhas, Ricardo Cardoso. II. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. III. Título.

Elaborada com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Bibliotecária Viviane Pedrosa- CRB-6/2641

RESUMO

Western blot é uma técnica de biologia molecular na qual detectamos proteínas específicas em amostra macerada de quaisquer tecidos biológicos. Essa técnica utiliza um sistema de eletroforese em gel utilizada para separar as proteínas pelo seu peso molecular. Consiste de duas etapas iniciais que são a corrida, que corresponde a separação das proteínas no gel, e a transferência das proteínas do gel para uma membrana, a qual pode ser de nitrocelulose ou polifluoreto de vinilideno (PVDF). A técnica de transferência pode ser realizada úmida ou semi-seca, de acordo ao equipamento disponível no laboratório. As membranas são, então, bloqueadas, incubadas com anticorpos primários e, posteriormente, secundários para que sejam feitas lavagens e, por fim, a revelação. O anticorpo primário se liga a nossa proteína de interesse e o secundário se liga ao primário, sendo, portanto, uma técnica de quantificação de proteína qualificada como semi-quantitativa ou indireta. Nesta última etapa, revelação, podemos saber qual a quantidade de uma proteína específica existente em cada grupo e compará-las. Existem vários métodos de detecção que podem ser utilizados, contudo a mais comumente usada é a quimioluminescência. A técnica de *western blot* é utilizada para detectar o anticorpo em algumas patologias, como no caso da síndrome de imunodeficiência adquirida. Quando utilizada na pesquisa científica, esta técnica pode ajudar a descobrir alvos moleculares específicos para que sejam desenvolvidas novas terapias para a condição ou patologia estudada.

Palavras-chave: biologia molecular, proteína, anticorpo.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
PVDF	Polifluoreto de vinilideno
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio



SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	06
2. PROTOCOLO OPERACIONAL PADRÃO DO <i>WESTERN BLOT</i>	07
3. REFERÊNCIAS	43



1. INTRODUÇÃO

Western blot é uma técnica de biologia molecular na qual detectamos proteínas específicas em amostra macerada de quaisquer tecidos biológicos (RENART; REISER; STARK, 1979). Inicialmente, ela foi descrita como uma transferência por eletroforese de proteínas em géis de poliacrilamida para membranas. Também eram chamados de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) com dodecil sulfato de sódio (SDS) (TOWBIN; STAEHELINT; GORDON, 1979).

Western blot utiliza um sistema de eletroforese em gel para separar as proteínas pelo seu peso molecular. Após realizar a separação das proteínas no gel, é feita a transferência das proteínas do gel para uma membrana, a qual pode ser de nitrocelulose ou polifluoreto de vinilideno (PVDF) (DE SOUSA et al., 2020a; TOWBIN; STAEHELINT; GORDON, 1979). A técnica de transferência pode ser realizada úmida ou semi-seca, de acordo ao equipamento disponível no laboratório. As membranas são, então, bloqueadas, incubadas com anticorpos primários e, posteriormente, secundários para que sejam feitas lavagens e, por fim, a revelação (DE SOUSA et al., 2020b; TOWBIN; STAEHELINT; GORDON, 1979). O anticorpo primário se liga a nossa proteína de interesse e o secundário se liga ao primário, sendo, portanto, uma técnica de quantificação de proteína semi-quantitativa ou indireta. Nesta última etapa, revelação, podemos saber qual a quantidade de uma proteína específica existente em cada grupo e compará-las. Existem vários métodos de detecção que podem ser utilizados, contudo a mais comumente utilizada é a quimioluminescência (RENART; REISER; STARK, 1979; TOWBIN; STAEHELINT; GORDON, 1979).

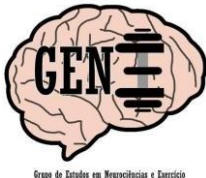
A técnica de *western blot* pode ser utilizada para detectar o anticorpo em algumas patologias, como no caso da síndrome de imunodeficiência adquirida. Quando utilizada na pesquisa científica, esta técnica pode ajudar a descobrir alvos moleculares específicos para que sejam desenvolvidas novas terapias para a condição ou patologia estudada.

2. PROTOCOLO OPERACIONAL PADRÃO DO *WESTERN BLOT*

O protocolo para operacionalizar o *western blot* é descrito em detalhes nas próximas páginas. Para facilitar a execução, o protocolo foi subdividido em etapas. No cabeçalho de cada página, ao invés de visualizar números de páginas vocês irão ter a seguinte descrição:

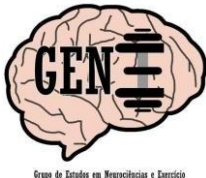
- Nº, se refere ao número da etapa presente naquela página;
- Edição, se refere ao número da edição do procedimento. Como esta é a primeira edição deste procedimento, todas as páginas irão constar o número 01 para a presente edição;
- *Western Blot*, nome em itálico e com cada palavra iniciando com uma letra maiúscula designando o nome da técnica presente neste manual;
- Elaborado, se refere à data de elaboração do protocolo, neste caso o mês de abril de 2021. É sugerido que o protocolo seja atualizado no máximo a cada 2 anos. O ideal seriam atualizações anuais ao protocolo;
- Autor, se refere ao nome do autor deste protocolo. Logo, em todas as páginas vocês irão encontrar o nome de Ricardo Augusto Leoni De Sousa.
- O número de página foi colocado no canto inferior direito.
- Não foi utilizado recuo de início de parágrafo para as páginas onde o protocolo é descrito.



	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	Nº: 01
		Edição: 01
	WESTERN BLOT	Western Blot
		Elaborado: 04/2021
		Autor: Ricardo Augusto Leoni De Sousa

ETAPA 1 – HOMOGENEIZAÇÃO EM TAMPÃO RIPA

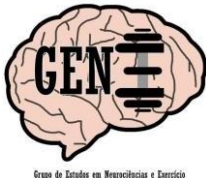
1. Retirar amostras do menos 80 e colocar no gelo picado. Esperar descongelar. Preparar os *ependorfs* novos com a identificação das amostras.
2. Preparar o tampão RIPA **sem** inibidores.
3. **Colocar os inibidores apenas no momento de uso do tampão.**
4. Utilizar 1:100 para os inibidores de fosfatase e, também, 1:100 para os inibidores de protease. Caso não tenha os inibidores para uso pode-se fazer estes no laboratório. Olhar o protocolo de preparo dos inibidores de fosfatase e protease.
5. Colocar a quantidade de tampão de acordo ao peso do tecido no *ependorf* onde a amostra será homogeneizada. Exemplo: em hipocampo de camundongos *Swiss* adultos com 6 meses de idade costumo usar 150 microlitros por hipocampo. Utilizamos os dois hipocampus (direito e esquerdo) juntos na homogeneização, dentro do mesmo *ependorf*. Seguimos a mesma idéia para outras estruturas como o córtex pré-frontal, por exemplo. Em hipocampo de ratos *Wistar* adultos com 6 meses de idade usamos, normalmente, 500 microlitros do tampão RIPA para homogeneizar. Obviamente o peso do tecido irá mudar de acordo à idade e outros fatores, como espécie e linhagem, portanto, a quantidade de tampão deverá ser adequada ao peso do tecido utilizado igualmente para todos os grupos. Se você utilizar 500uL em um tecido para um grupo deverá obrigatoriamente usar 500uL para todos os outros grupos. Lembre-se que é melhor ter uma amostra muito concentrada, pois você pode diluir depois.
6. Homogeneizar as amostras em ***ependorf* de 1.5 ml** utilizando um pilão (manual) ou o homogeneizador elétrico, caso o tenha, **sempre com o *ependorf* dentro do gelo picado**. Abaixo uma figura ilustrativa de onde e como o *ependorf* deve ser posicionado dentro do gelo picado.

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	Nº: 01
		Edição: 01
	WESTERN BLOT	Western Blot
		Elaborado: 04/2021 Autor: Ricardo Augusto Leoni De Sousa



Gelo picado Gelo picado Gelo picado Gelo picado Gelo picado
Gelo picado Gelo picado Gelo picado Gelo picado Gelo picado
Gelo picado Gelo picado Gelo picado Gelo picado Gelo picado

7. Deve ser evitada a formação de espuma a qualquer custo durante a homogeneização. Por quê? **A formação de espuma pode ser prejudicial para certas enzimas, já que todas as bolhas de espuma aumentam a interfase entre o gás e o estado aquoso.** Portanto, muito oxigênio pode entrar no líquido. Muitas enzimas podem ser afetadas durante essas oxidações e isso reduzirá a atividade delas. A formação de espuma ocorre quando utilizamos detergentes no tampão e pode ser aumentada de acordo ao tipo de tecido, como em tecidos com muitos lipídeos, e também depende do método de homogeneização (neste caso, usar pilão manualmente é melhor do que sonicator, por exemplo). Existe a opção de usar um homogeneizador elétrico, se tiver essa ferramenta no laboratório, pois a homogeneização é constante, em velocidade baixa e muito semelhante ao processo manual com pilão, porém muito mais rápido. A homogeneização deve ser feita com o tampão de extração gelado para ajudar a diminuir a espuma.
8. O ideal é que você trabalhe sempre com o *eppendorf* no gelo o mais rápido possível **evitando a formação de espuma ao máximo.** Alguns cientistas gostam de fazer a extração em 2 estágios. Primeiro você homogeneizaria sem detergentes

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	Nº: 01
		Edição: 01
	WESTERN BLOT	Western Blot
		Elaborado: 04/2021 Autor: Ricardo Augusto Leoni De Sousa

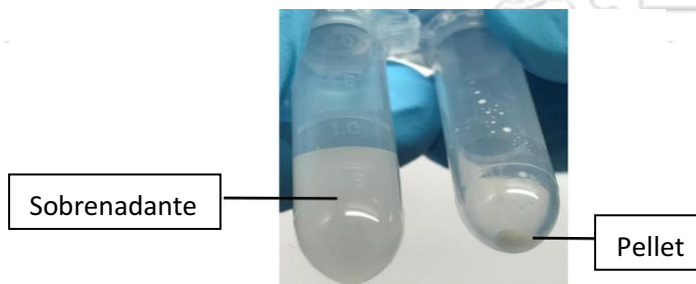
(triton e dodecil sulfato de sódio (SDS)) para quebrar todas as células. Depois de homogeneizar você adicionaria os detergentes. Esta é uma opção para quem não consegue homogeneizar sem fazer muita espuma, contudo **recomendo o uso do tampão RIPA completo para homogeneizar**.

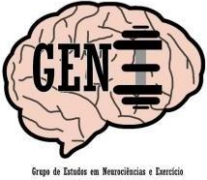
9. Para centrifugar as amostras utilizar o protocolo de 10 minutos a 4° C e 12.000rpm (obs: a velocidade e tempo foram adaptadas para a **centrífuga do LETFIS**. Centrifugação padrão de amostra para *blot* é 5 minutos a 4°C e 10.000 rpm).



Lembre-se de balancear (colocar a mesma quantidade de *eppendorfs* com mesmo peso de ambos os lados) a centrífuga sempre!!!

10. Retirar o sobrenadante e transferir para um novo *eppendorf*. Descartar o *pellet*.



	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	Nº: 01
		Edição: 01
	WESTERN BLOT	Western Blot
		Elaborado: 04/2021
		Autor: Ricardo Augusto Leoni De Sousa

TAMPÃO RIPA SEM INIBIDORES (100 mL)

Objetivo

O tampão RIPA é utilizado para extração de proteínas e deve ser usado em gelo. É necessária a adição de inibidores, **na hora do uso**, a fim de se evitar a degradação protéica e é usado para realizar a homogeneização de amostras.

1. Materiais

- Becker
- Barquetas
- Proveta de 100 mL
- Balança analítica
- pHmetro

2. Reagentes

- 625mg de Trizma base ou Tris
- 876,6mg de NaCl
- 37,22mg de EDTA
- 1mL de Triton-X 100
- 1g de Deoxiglicolato
- 100mg de SDS (Dodecil sulfato de sódio)

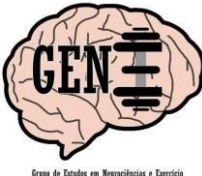
3. Procedimento

Inicialmente, deve-se pesar 625 mg de Tris (0,625g), 876,6 mg de NaCl (0,8766g) e 37,22 mg de EDTA (0,0372g). Depois transferir todos os sólidos para um becker e adicionar água o suficiente para solubilizar os pós (aproximadamente 50 mL). Em seguida, é necessário ajustar o pH da solução para 7,4 com HCl ou NaOH antes de adicionar os detergentes a fim de evitar danos ao pHmetro. Depois do ajuste de pH, deve-se adicionar os detergentes, 1g de Deoxiglicolato e 100mg de SDS (0,1g), agitar lentamente, afim de se evitar a formação de espuma, até todo o pó se dissolver. Depois acrescentar 1mL de Triton-X 100 e verter toda a solução para uma proveta de 100mL. Completar o volume para 100mL com água destilada ou milliQ, lentamente para evitar a formação de espuma. Pode-se aliquotar em falcons de 50mL.

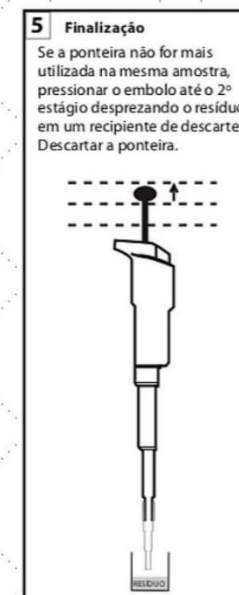
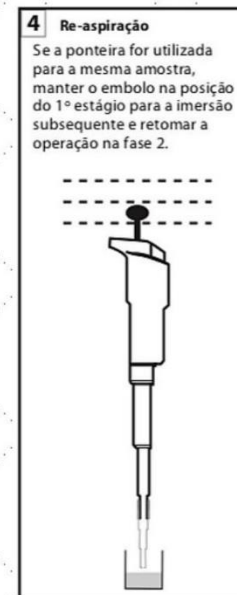
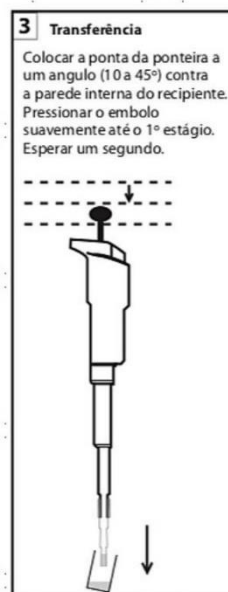
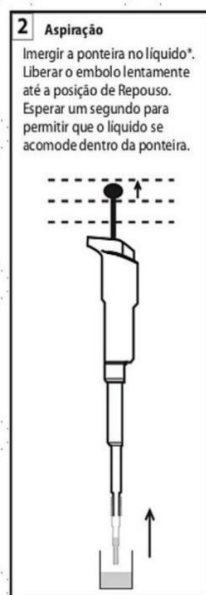
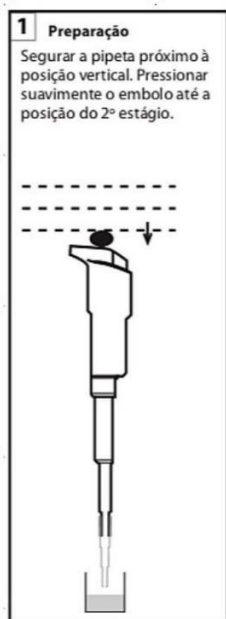
4. Armazenar em geladeira, 4°C.

Obs1: O uso do pHmetro deve ser feito seguindo as instruções que se encontram próxima ao aparelho. Caso exista kit de inibidores de protease e fosfatase, adicionar os mesmos na quantidade indicada **apenas para fazer a quantidade de solução necessária para uso imediato**. Caso não exista kit pronto ver o protocolo a seguir sobre a preparação dos inibidores.

Obs2: Para puxar o detergente (TritonX-100) você deve utilizar pipetagem reversa. Para fazer isso, recomendo para retirar 1mL que deixe a pipeta marcando 500uL. Logo, você irá puxar duas vezes, com muito cuidado. **O que você puxar não pode encostar na ponta da pipeta.** Siga os passos abaixo.

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		Nº: 01
			Edição: 01
	WESTERN BLOT		Western Blot
			Elaborado: 04/2021
			Autor: Ricardo Augusto Leoni De Sousa

PASSO 1 PASSO 2 PASSO 3 PASSO 4 PASSO 5



IMPORTANTE!



1. O volume total (volume selecionado + volume da segunda parada) não pode exceder a capacidade máxima da ponteira, considere sempre 80% da capacidade. Por exemplo, uma ponteira de 1000 µl, na pipetagem reversa pode pipetar no máximo 800 µl.
2. Apenas pipetas de descolamento de ar podem ser utilizadas

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	Nº: 01
		Edição: 01
	WESTERN BLOT	Western Blot
		Elaborado: 04/2021 Autor: Ricardo Augusto Leoni De Sousa

PREPARO DE INIBIDORES PROTEASE E FOSFATASE

Objetivo

Os inibidores protease e fosfatase são utilizados no tampão RIPA a fim de ser evitar a degradação da amostra, evitando assim lise, proteólise e desfosforilação.

1. Materiais
 - Béquer
 - Barquinhas para pesar
 - Proveta de 50 mL
 - Balança analítica
2. Reagentes
 - 250ug de Aprotinina
 - 8,71mg de PMSF (Fluoreto de Fenilmetilsulfonil)
 - 1mg de Leupeptina
 - 94,5mg de Ortovanadato de Sódio
 - 225mg de Pirofosfato de Sódio
 - 210mg de Fluoreto de Sódio
3. Preparo

Para 50 mL de tampão RIPA:

Pesar 250 ug de aprotinina (0,00025g), 8,71 mg de PMSF (0,00871g) e 1 mg de Leupeptina (0,001g). Em um recipiente solubilizar o PMSF em 1 mL de metanol. Em outro recipiente solubilizar a Leupeptina em 1 mL de tampão RIPA. Em seguida adicionar as duas soluções em um béquer com Aprotinina e homogeneizar.

Pesar 94,5mg de Ortovanadato de Sódio (0,0945g), 225mg de Pirofosfato de Sódio (0,225g) e 210mg de Fluoreto de Sódio (0,210g). Colocar em um becker contendo os inibidores acima e homogeneizar. Verter para uma proveta e completar com tampão RIPA até 50 mL.

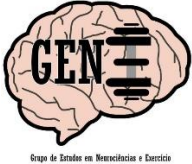
Obs.: Manter em gelo e usar imediatamente. Descartar a sobra.

Uso dos inibidores 1:100

Dica

1 mililitro
1.000 microlitros
1.000.000 nanolitros
1.000.000.000 picolitros

**Mesma coisa para
volumes menores**

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	Nº: 02
		Edição: 01
	WESTERN BLOT	Western Blot
		Elaborado: 04/2021 Autor: Ricardo Augusto Leoni De Sousa

ETAPA 2 – TESTE DE DILUIÇÃO, DOSAGEM DE PROTEÍNAS E PREPARO DA AMOSTRA

Fazer o teste de diluição em placa de 96 poços. Para fazer o teste deve-se preparar uma curva padrão (duplicatas) e as amostras são preparadas em triplicatas. Provinha da pipetagem da curva padrão na placa abaixo:

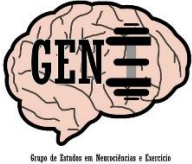
Crescimento da curva	BSA (poços)	BSA 0,2ug/ul	H2O	Bradford
0 (branco)	0	0	40ul	200ul
0,025	1	5ul	35ul	200ul
0,05	2	10ul	30ul	200ul
0,075	3	15ul	25ul	200ul
0,1	4	20ul	20ul	200ul
0,125	5	25ul	15ul	200ul
Amostra diluída	Amostra diluída	Xul	Xul	200ul

Volume final do pocinho: 240ul

Para facilitar a vida, fiz uma tabelinha calculando o preparo de triplicatas, visto que você irá pipetar duplicatas para curva padrão, ou seja, já há sobra calculada. Segue abaixo:

BSA (ug)	BSA 0,2ug/ul	H2O
0	0	120ul
1	15ul	105ul
2	30ul	90ul
3	45ul	75ul
4	60ul	60ul
5	75ul	45ul
Amostra diluída	Xul	Xul

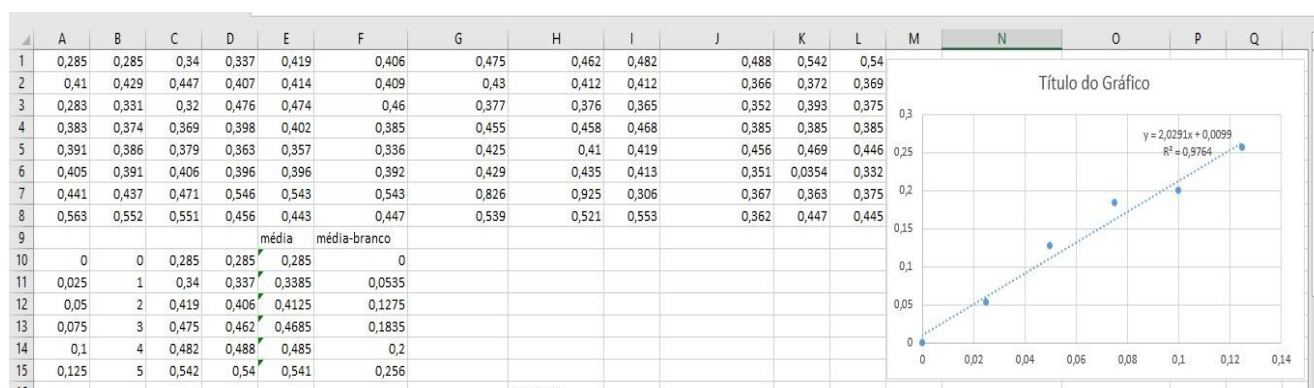
A curva padrão pode ser preparada nas duas primeiras colunas ou na primeira linha. Eu prefiro ter o trabalho de reorganizar a curva pipetando-a na primeira linha, pois todas as linhas caberão triplicatas perfeitas depois. Fica bem mais fácil de arrumar no Excel depois para o cálculo de média, média menos o branco, etc. Mas claro, isso é apenas uma questão de estilo. Pipetar nas duas primeiras colunas ou na primeira linha não irá modificar o resultado da sua leitura.

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	Nº: 02
		Edição: 01
	WESTERN BLOT	Western Blot
		Elaborado: 04/2021
		Autor: Ricardo Augusto Leoni De Sousa

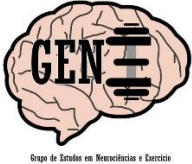


Nesta figura a curva padrão foi pipetada na primeira linha.

Print do preparo do teste de diluição colocando a curva na primeira linha de A1 a L1.



Os poços da curva deste *print* estão de A1 a L1. Foram realocados nas suas devidas duplicatas em C10. O R^2 da curva tem que ser maior que 0,97 (ideal entre 0,99 e 1). De B10 a B15 você tem os poços das duplicatas (0,1,2,3,4,5). De A10 a A15 você tem os valores de crescimento previstos da curva. Ao calcular a média das duplicatas (E10 a E15) você deve, em seguida, calcular a média menos o valor do branco (a média do poço 0 menos a média dele mesmo). Fazer o mesmo para os demais poços (F10 a F15). Será necessário calcular a fórmula e o R^2 da curva. Para isso, selecione de A10 a A15 e de F10 a F15 (de acordo com a tabela da página anterior. No seu caso, estes valores podem estar em outros locais do Excel). Clique em inserir gráfico de dispersão. Sobre um dos pontos clique em adicionar linha de tendência. Depois clique em exibir equação no gráfico e em exibir valor de R^2 no gráfico. No teste de diluição você deve preparar possibilidades diferentes. Por exemplo, para hipocampo de camundongos, normalmente, utilizo no teste as seguintes possibilidades de

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	Nº: 02
		Edição: 01
	WESTERN BLOT	Western Blot
		Elaborado: 04/2021
		Autor: Ricardo Augusto Leoni De Sousa

diluições de amostra: 1:30, 1:50 e 1:100. Mas claro, talvez você precise utilizar uma diluição de 1:250 ou 1:500. A gente só irá descobrir o valor de diluição a ser utilizado em determinado tecido testando. Normalmente, o valor do teste de diluição do hipocampo em camundongos, por exemplo, é 1:50, mas pode variar um pouco (principalmente se sua amostra degradou, se você demorou dissecando, etc.).

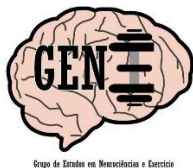
Exemplo de como montar a placa para o teste de diluição:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5
B	1:10	1:10	1:10	1:30	1:30	1:30	1:50	1:50	1:50	1:100	1:100	1:100
C	1:250	1:250	1:250	1:500	1:500	1:500	1:750	1:750	1:750	1:1000	1:1000	1:1000
D												
E												
F												
G												
H												

Em A coloquei a curva padrão. De B1 até C12 são testes de diluição utilizando a mesma amostra em triplicatas. O teste que melhor encaixar entre os resultados da média dos poços 2 e 3 da curva padrão (marcados com fundo em amarelo, logo são 2 poços 2 e 2 poços 3), marcados em amarelo, devem ser utilizados. Logo em seguida, você irá preparar os cálculos da curva padrão e sua respectiva fórmula conforme as instruções abaixo.

1 – Monta-se o gráfico para avaliar o R^2 da curva padrão e sua fórmula. Baseado na fórmula faz-se o cálculo das diluições para verificar qual o valor de x e a melhor diluição a ser utilizada. O cálculo é o mesmo que está mostrado na tabela de preparo das amostras. Monta-se as duplicatas da curva padrão, faz-se a média de cada duplicada e depois diminui o valor da média do valor do branco (poço zero, onde foi pipetada apenas água). Seleccionamos, então, a curva de diluição e o resultado final (média menos o branco) de cada duplicata e pedimos para inserir um gráfico de dispersão no Excel. Após ter montado o gráfico, clicamos com o botão direito do mouse ou touchpad sobre um dos pontos da curva e pedimos para inserir linha de tendência. Irá abrir uma caixa de diálogo no lado direito do seu Excel. Você deverá clicar/marcar as caixas para inserir a fórmula e o R^2 . Abaixo um exemplo do cálculo de diluição das amostras.

Print completo do cálculo da curva padrão



PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

WESTERN BLOT

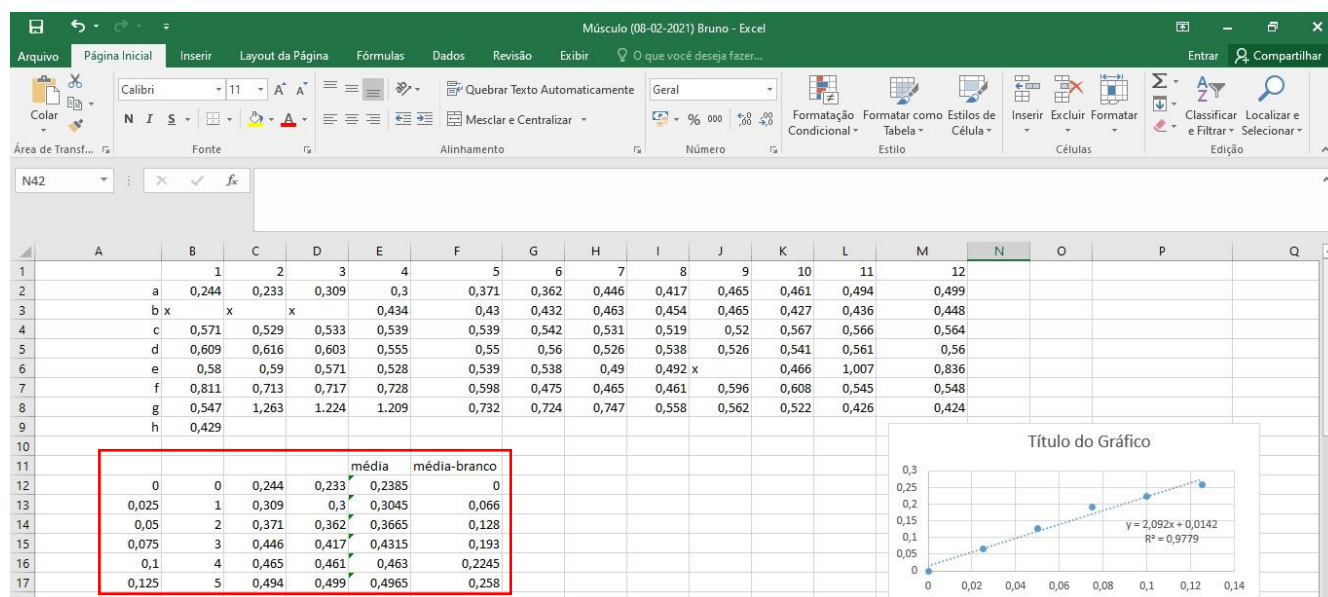
Nº: 02

Edição: 01

Western Blot

Elaborado: 04/2021

Autor: Ricardo Augusto
Leoni De Sousa

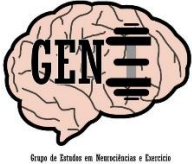


Print do teste de diluição segue abaixo, onde cx = córtex e h = hipocampo.

41	1:50 cx	1,007	0,836	0,811	0,884667	1:100 cx	0,713	0,717	0,728	0,719333
42					#DIV/0!					#DIV/0!
43	1:50 h	1,263	1,224	1,209	811,421	1:100 h	0,732	0,724	0,747	0,734333
44										
45	1:250 cx	0,598	0,596	0,608	0,600667	1:500 cx	0,545	0,548	0,547	0,546667
46					#DIV/0!					#DIV/0!
47	1:250 h	0,558	0,562	0,522	0,547333	1:500 h	0,426	0,424	0,429	0,426333
48										

Observe que o 1:500 foi o único que caiu dentro da curva padrão (olhar *print* anterior). Caiu exatamente entre o poço 2 e poço 3. Procuramos sempre que os valores da curva estejam entre o poço 2 e 3. Em alguns casos, pode-se utilizar o valor entre 1 e 2 ou 3 e 4, se não houver um resultado melhor, mas o ideal é estar entre os poços 2 e 3 da curva padrão.

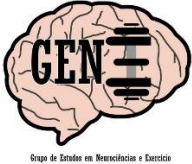
Neste mesmo exemplo acima, você pode ver amostras que caíram dentro da curva padrão e que, em teoria, poderiam ser utilizadas, mas na verdade esses tecidos foram expostos a temperatura ambiente devido ao menos 80 ter queimado e parado de funcionar. O preparo das amostras com homogeneização em tampão RIPA foi feita para testar a viabilidade destas amostras. O exemplo acima, foi, na verdade, a terceira tentativa de dosagem do hipocampo, onde as duas primeiras vezes não deram certo. Fazendo uma retrospectiva para que entendam a importância da dissecação, preparo e dosagem de amostras...o menos 80 foi encontrado em temperatura ambiente e a demora de, aproximadamente, 6 horas para

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	Nº: 02
		Edição: 01
	WESTERN BLOT	Western Blot
		Elaborado: 04/2021
		Autor: Ricardo Augusto Leoni De Sousa

removerem as amostras do freezer, após a identificação da sua queima, deve ter comprometido as amostras. Logo, apesar de termos encontrado valores que caíram entre o poço 2 e 3 da curva padrão, possivelmente, muitas amostras ao serem dosadas não cairão dentro da curva e as que caírem podem apresentar resultados absurdos que favoreçam ou não o resultado de nosso interesse, nas etapas finais do *blot*. Concluindo o pensamento, você deve garantir que a dissecação seja feita de modo rápido e eficaz, tal qual deve ser a homogeneização dos tecidos e montagem da placa para que ao ter um resultado você não tenha viés, como illustrei com o caso do menos 80 que queimou. No caso mostrado acima, os valores normais de diluição do hipocampo de camundongos deveriam ser 1:50 e do córtex 1:100. Quando há uma variação pra cima ou pra baixo costuma ser pequena. Logo, provavelmente todas as amostras foram comprometidas. Seguir no experimento, neste caso, é tentar a sorte, pois mesmo que tenhas resultados que lhe favoreça, que seja do seu interesse, não há como afirmar que são resultados verdadeiros e não fruto da exposição dos tecidos, sem qualquer inibidor, à temperatura ambiente por horas ou de uma lenta dissecação.

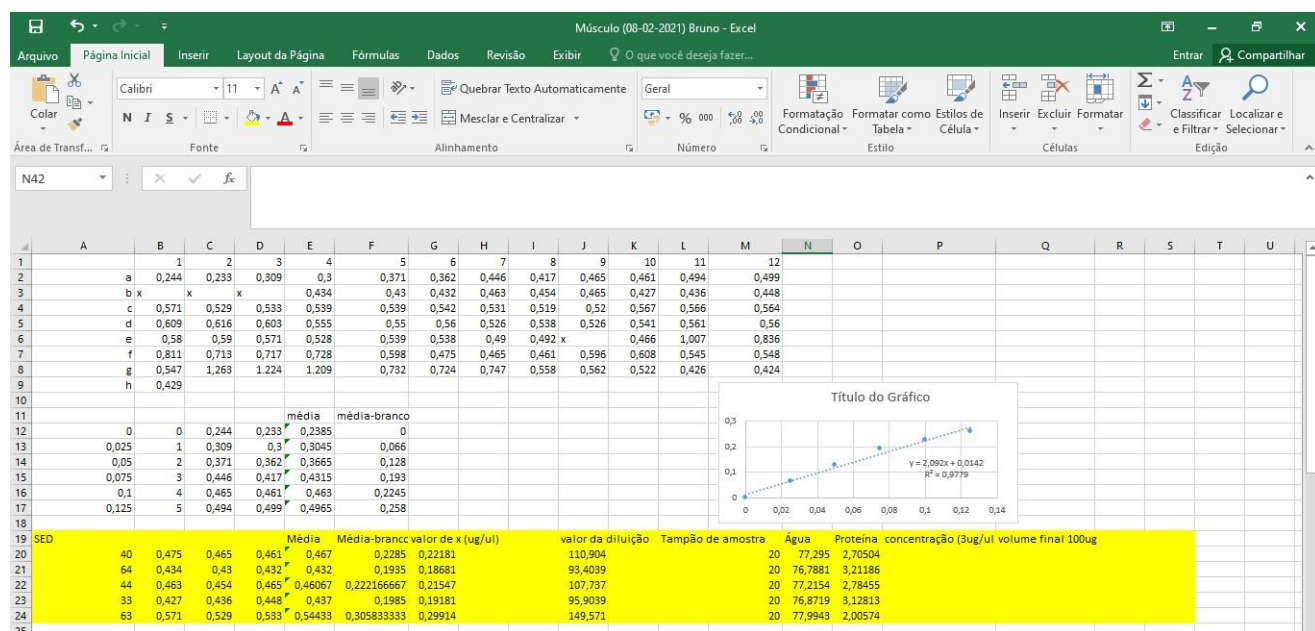
2 – Para a dosagem de proteínas fazemos o mesmo procedimento do teste de diluição: preparamos a curva padrão e agora preparamos as amostras em triplicatas de acordo à diluição encontrada. Em seguida, pipetar em triplicata as amostras colocando 40 microlitros da amostra diluída mais 200 microlitros de Bradford. Primeiro pipeta-se todas as triplicatas. Depois adiciona-se os 200 microlitros a cada pocinho. A ordem pode ser invertida, porém eu prefiro pipetar a mostra diluída primeiro. Colocando o Bradford depois de colocar a amostra diluída diminui o tempo de exposição dele a luz, visto que ele é fotossensível. Após pipetar todas as amostras, pipetar a curva padrão (tem gente que pipeta a curva padrão primeiro, mas eu prefiro deixar para o final porque é nela que todos os cálculos para o preparo de amostra serão baseados e tento deixar ela em incubação pelos exatos 30 minutos que a placa fica isolada, conforme escrito abaixo). Enrolar a placa em papel laminado ou colocar ela em ambiente com ausência total de luz por 30 minutos. Após 30 minutos retirar o papel laminado e colocar a placa no espectrofotômetro para aferir os valores de cada poço da placa. Fazer a leitura a 595nm.

3 - Calcula-se o valor das médias das triplicatas, diminui-se do branco, calcula-se o valor de x, multiplica-se pelo valor de diluição utilizado na dosagem, determina-se a concentração e

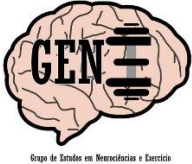
	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		Nº: 02
			Edição: 01
	WESTERN BLOT		Western Blot
			Elaborado: 04/2021
			Autor: Ricardo Augusto Leoni De Sousa

volume finais que se deseja e faz-se o cálculo da quantidade de proteína. A quantidade de tampão de amostra é a quinta parte do volume final. A quantidade de água será o valor do volume final menos o valor de proteína menos o valor do tampão de amostra. Fazer o cálculo do preparo de amostras conforme o *print* abaixo, lembrando que:

- A concentração é você quem determina. O padrão é 2ug/ul. Eu gosto de trabalhar com 3ug/ul. Lembre-se que se você usar um espaçador de 1,5mm com um pente de 15 poços no preparo do gel você irá pipetar 20ul por poço, logo, se você utilizar uma concentração final de 3ug/ul você terá um total final de proteína no poço de 60ug (3 x 20 = 60). Aumentar muito o valor da concentração não é aconselhável por motivos óbvios.
- O volume final é você quem determina. O padrão é utilizar 100ul. Tem gente que prepara logo 200ul. Eu prefiro preparar apenas 100ul, pois esta amostra pronta fica estocada no menos 20. Ao fazer uma quantidade maior que a padrão você irá ficar descongelando e congelando a amostra pronta um número maior de vezes, o que pode contribuir para degradação de proteína.



Após as amostras estarem preparadas, fervê-las por 5 minutos em banho maria.

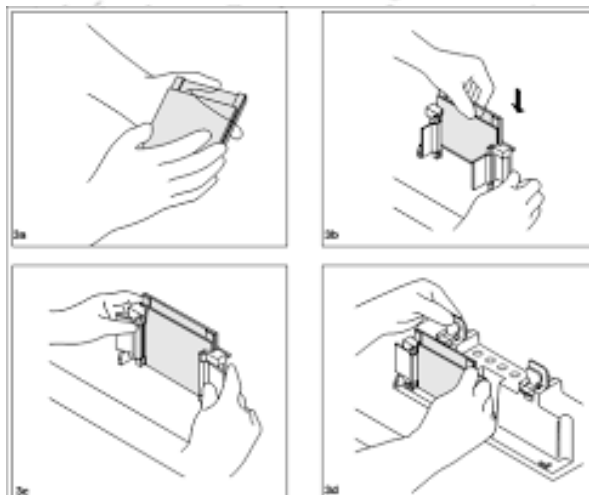
	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	Nº: 03
		Edição: 01
	WESTERN BLOT	Western Blot
		Elaborado: 04/2021 Autor: Ricardo Augusto Leoni De Sousa

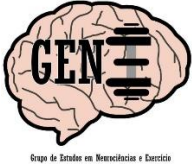
ETAPA 3 – PREPARO DO GEL

Preparar o gel de acordo ao percentual que você precisa. Para proteínas de alto peso molecular preparamos gel com baixa porcentagem e vice-versa. A regrinha abaixo já se encontra multiplicada para a confecção de 2 géis, com sobra de 1 gel, em espaçadores de 1,5mm. Não é necessário fazer qualquer cálculo para preparar 2 géis. Basta seguir a regrinha abaixo. A sobra alta é necessária, pois sempre escorre uma quantidade por fora dos espaçadores. Para descobrir o valor de 1 gel sem sobra basta dividir os valores abaixo por 3.

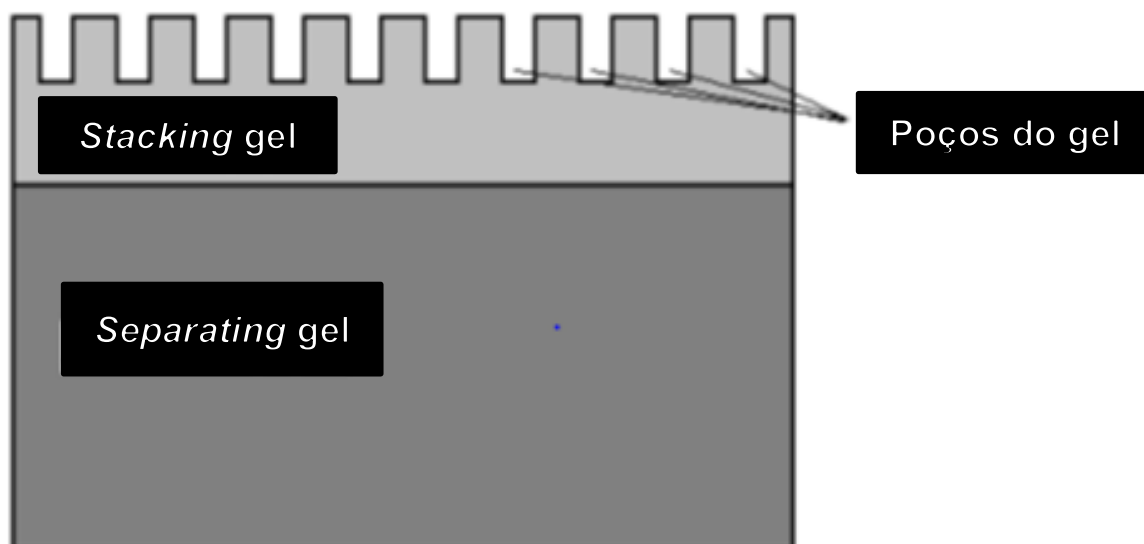
% Gel (Separating)	H2O (µl)	Acrilamida 30% (µl)	Tris-HCl1,5M (pH 8,8) (µl)	SDS 10% (µl)	Persulfato de Amônio 10% (µl)	TEMED (µl)
6%	12482	4800	6240	240	240	60
8%	11040	6240	6240	240	240	60
10%	9120	8160	6240	240	240	60
12%	7680	9600	6240	240	240	60
15%	5280	12000	6240	240	240	60
Stacking	H2O	Acrilamida 30% (µl)	Tris-HCl-0,5M (pH 6,8)	SDS 10%	Persulfato de Amônio 10%	TEMED
5%	8400	1980	1500	120	120	30

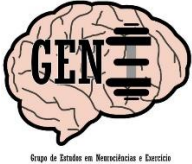
Lembrando que esses cálculos acima foram feitos para 2 géis, com sobra, em espaçadores 1,5mm. Para outros géis, como 0.75mm por exemplo, o cálculo é diferente. Mas este é um protocolo básico e vista orientar a realização do blot mais comum, o qual será realizado sempre no gel de 1.5mm, utilizando pentes de 10 ou 15 poços, pois estes géis são mais difíceis de quebrar. Montar os espaçadores no cassete verde conforme mostra a figura.



	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		Nº: 03
			Edição: 01
	WESTERN BLOT		Western Blot
			Elaborado: 04/2021
			Autor: Ricardo Augusto Leoni De Sousa

Pipetar um pouco de água para ver se está vazando. Caso não esteja, descartar a água virando o cassete. Caso esteja vazando, deve ser remontado. O espaçador deve estar alinhado ao seu prato pequeno (vidro mais fino ou *short plate*). Depois que os espaçadores estão montados e encaixados no seu respectivo suporte você irá começar a pipetar o gel. Primeiro pipeta-se apenas a água, acrilamida, o tris e o SDS do *separating* e do *stacking* gel em 2 tubos falcons de 50 mL. O persulfato de amônio e o TEMED só colocamos no último momento, pois eles irão polimerizar imediatamente o seu gel. Ao colocar persulfato de amônio e o TEMED deve-se rapidamente homogeneizar o líquido no tubo falcon e derramar seu conteúdo entre os espaçadores até chegar a marca verde. Se tiver pipeta de 5mL use-a. Caso contrário, as opções são pipetar de 1 em 1 mL ou despejar o conteúdo diretamente entre os espaçadores. Usar isopropanol (álcool isopropílico) para alinhar o gel e tirar bolhas. Esperar a polimerização do *separating* gel. Logo em seguida, deve-se colocar persulfato e TEMED no *stacking* gel, homogeneizar o conteúdo e derramar sobre o *separating* gel até que ele ultrapasse o limite do espaçador e extravaze. Delicadamente e **imediatamente** colocar o pente (cuidado para não jogar todo gel para fora do espaçador). Gosto de usar o pente de 1.5mm com 15 poços, mas você pode usar o pente com 10 poços. Na próxima página seguem os protocolos de cada ingrediente. O TEMED compra-se pronto.



	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	Nº: 03
		Edição: 01
	WESTERN BLOT	Western Blot
		Elaborado: 04/2021
		Autor: Ricardo Augusto Leoni De Sousa

Solução de Bis-Acrilamida 30% (Volume = 100mL)

Objetivo:

A solução de Bis-acrilamida 30% é utilizada como reagente no preparo do gel de corrida (gel de poliacrilamida). Sua concentração determina o tamanho dos poros do gel, sendo que quanto maior a quantidade (%) menor é o tamanho do poro, e quanto menor a quantidade na solução maior é o tamanho do poro do gel.

1. Materiais

- Balança analítica
- Béquer de vidro
- Barquinhas para pesar
- Proveta de 100 mL

2. Reagentes

- 29,2g de Acrilamida
- 0,8g Bis-acrilamida
- Água destilada

3. Procedimento

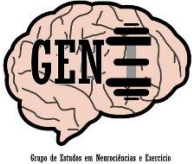
Todo o procedimento deve ser realizado com uso de luvas e máscara.

Pesar 29,2g de Acrilamida e 0,8g de Bis-acrilamida, dissolver em água destilada e homogeneizar. Em uma proveta, avolumar para 100 mL.

4. Armazenamento

A solução deve ser armazenada em **vidro âmbar**, a 4°C.

Obs.: A solução e o pó de acrilamida são altamente tóxicos quando não polimerizados. E **NUNCA** devem ser jogados na pia. A solução torna-se menos tóxica quando polimerizada (ao colocar persulfato de amônio e TEMED para fazer o gel), porém não deve ser jogada na pia também, deve ser jogada no lixo biológico.

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	Nº: 03
		Edição: 01
	WESTERN BLOT	Western Blot
		Elaborado: 04/2021
		Autor: Ricardo Augusto Leoni De Sousa

Solução Tris-HCl 1,5M pH 8,8 (Volume = 100mL)

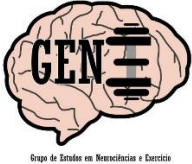
Objetivo

Solução utilizada no preparo do gel SDS-PAGE.

1. Materiais
 - Proveta de 100 mL
 - Balança analítica
 - Béquer
 - Barquinhas para pesar
 - pHmetro
2. Reagentes
 - Água destilada
 - Trizma base ou Tris
3. Procedimento

Pesar 18,16g de Trizma Base ou Tris, dissolver em água destilada e homogeneizar. Ajustar o pH para 8,8, com HCl ou NaOH. Após o ajuste de pH, verter a solução para uma proveta e avolumar para 100 mL.
4. Armazenamento

Sob refrigeração, 4°C.

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	Nº: 03
		Edição: 01
	WESTERN BLOT	<i>Western Blot</i>
		Elaborado: 04/2021
		Autor: Ricardo Augusto Leoni De Sousa

Solução Tris-HCl 0,5M pH 6,8 (Volume = 100mL)

Objetivo

Solução utilizada no preparo do gel SDS-PAGE.

1. Materiais

- Proveta de 100 mL
- Balança analítica
- Béquer
- Barquinha
- pHmetro

2. Reagentes

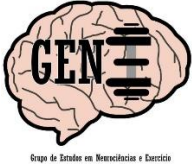
- Água destilada
- Trizma base ou Tris

3. Procedimento

Pesar 6,05g de Trizma Base ou Tris, dissolver em água destilada e homogeneizar. Ajustar o pH para 6,8, com HCl ou NaOH. Após o ajuste de pH, verter a solução para uma proveta e avolumar para 100 mL.

4. Armazenamento

Sob refrigeração, 4°C.

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	Nº: 03
		Edição: 01
		<i>Western Blot</i>
	WESTERN BLOT	Elaborado: 04/2021
		Autor: Ricardo Augusto Leoni De Sousa

SDS 10% - Volume 100mL

Objetivo

Solução utilizada no preparo do gel para SDS-PAGE.

1. Materiais

- Proveta de 100 mL
- Balança analítica
- Béquer
- Barquinhas para pesar

2. Reagentes

- Água destilada
- 10g de SDS (Dodecil sulfato de sódio)

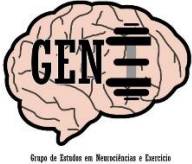
3. Procedimento

Pesar 10g de SDS. Acrescentar o pó aos poucos, sob agitação lenta (placa agitadora, em um béquer com 50 mL água destilada. Após todo o SDS ter dissolvido, verter a solução em uma proveta e completar com água até 100 mL.

Obs.: A agitação deve ser feita lentamente para evitar a formação de espuma.

4. Armazenamento

Deve ser armazenado a temperatura ambiente. A solução fica levemente amarelada. Utilizar brevemente.

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	Nº: 03
		Edição: 01
	WESTERN BLOT	<i>Western Blot</i>
		Elaborado: 04/2021 Autor: Ricardo Augusto Leoni De Sousa

PERSULFATO DE AMÔNIO 10% – Volume 100mL

Objetivo

A solução de Persulfato de Amônio é usado no preparo de gel SDS-PAGE e deve ser adicionado só no final juntamente com o TEMED, pois promove a polimerização da solução.

1. Materiais

- Proveta de 100 mL
- Balança analítica
- Béquer
- Barquinha para pesar

2. Reagentes

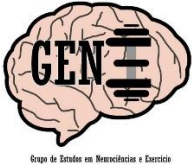
- Água destilada
- Persulfato de amônio

3. Procedimento

Pesar 10g de persulfato de amônio. Acrescentar o pó, sob agitação (placa magnética), em um béquer com 50mL de água destilada. Após todo o persulfato ter dissolvido, verter a solução em uma proveta e completar com água até 100 mL. Aliquotar em eppendorfs de 1,5 mL.

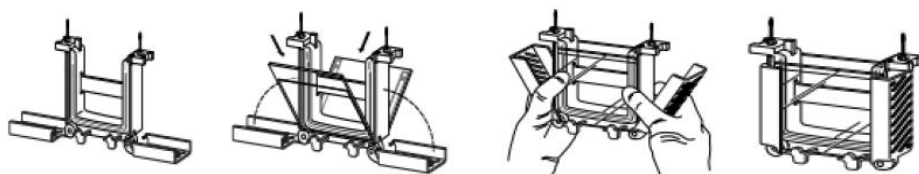
4. Armazenamento

Deve ser armazenado a -20°C.

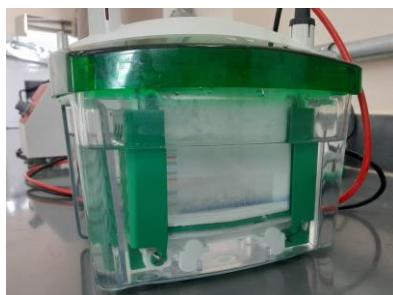
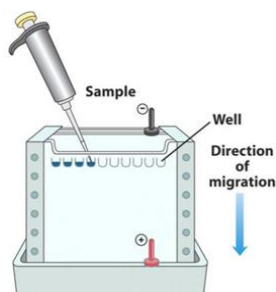
	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	Nº: 04
		Edição: 01
	WESTERN BLOT	Western Blot
		Elaborado: 04/2021 Autor: Ricardo Augusto Leoni De Sousa

ETAPA 4 – CORRIDA DO GEL

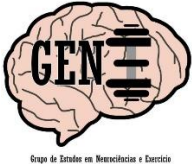
Para realizar a corrida será necessário preparar o tampão de corrida. Pode-se fazer o tampão concentrado 10x e guardar na geladeira e ir utilizando. Pode-se, também, fazer o tampão de corrida 1x na hora. Quando preparamos os géis no dia anterior a realizar a corrida eles devem ficar submersos em tampão de corrida no *overnight* em recipiente vedado. Para dar início à corrida, retirar os pentes dos espaçadores e colocá-los no cassete de corrida conforme a figura abaixo.



O tampão de corrida deve ser colocado na cuba de corrida até a marca indicada na cuba. Após isso, pipetar o *protein ladder* (5uL) no primeiro pocinho e as amostras na quantidade de 20uL por poço para pente de 15 poços e 1.5mm. As amostras devem ser pipetadas alternadamente (exemplo: GEL 1 – *protein ladder*, grupo A, B, C, D, A, B, C, D, A, B, C, D, A, B; GEL 2 *protein ladder*, grupo A, B, C, D, A, B, C, D, A, B, C, D, C, D). Ao começar a corrida usar 100V. Após passar a marca do *stacking gel* passar para 120V. Se for gel pronto da empresa Biorad usar constantes 200V.



Ao final, deve-se separar do gel, com a espátula verde do *blot*, a parte com corante azul e as bordas picadas (tipo as pontas de uma folha de caderno). Caso tenha problemas com esse protocolo pode ser usado amperagem de 350mA. A corrida, se possível, deve ser feita sobre um agitador magnético com um magneto (peixinho ou bailarina) girando lentamente para garantir a homogeneidade do tampão, em especial do SDS que atua com o *stacking gel* fazendo as proteínas correrem juntas e em rede. Abaixo os dois protocolos, tampão de corrida 1x e tampão de corrida 10x.

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	Nº: 04
		Edição: 01
	WESTERN BLOT	Western Blot
		Elaborado: 04/2021
		Autor: Ricardo Augusto Leoni De Sousa

TAMPÃO DE CORRIDA 1X

Tampão utilizado para promover a corrida das proteínas no gel SDS-PAGE durante o procedimento de *Western blotting*.

1. Materiais

- Proveta de 1000 mL

2. Reagentes

- Água destilada
- SDS 10%
- Tampão corrida 10X concentrado

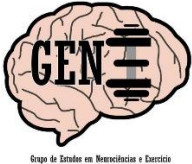
3. Procedimento

Em uma proveta, adicionar 100 mL de tampão de corrida 10X concentrado, 800 mL de água destilada e adicionar lentamente 10 mL de SDS 10%. Depois completar com água até 1000 mL.

4. Armazenamento

Deve ser armazenada à temperatura ambiente.



	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	Nº: 04
		Edição: 01
	WESTERN BLOT	Western Blot
		Elaborado: 04/2021
		Autor: Ricardo Augusto Leoni De Sousa

TAMPÃO DE CORRIDA 10x

Tampão concentrado (10x) utilizado para permitir a corrida das proteínas no gel SDS-PAGE durante o procedimento de *Western blot*.

1. Materiais

- Proveta de 1000 mL
- Balança analítica
- Béquer
- Barquinha para pesar
- pHmetro

2. Reagentes

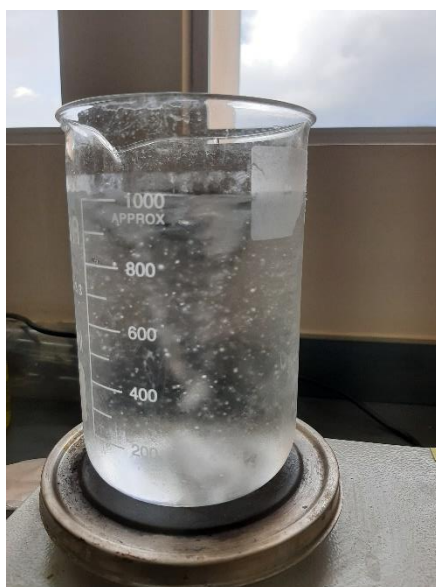
- Água destilada
- Glicina
- Tris

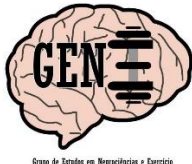
3. Procedimento

Pesar 30,3g de Tris e 144g de glicina. Juntar os sólidos e dissolver em 800 mL de água destilada, sob agitação. Aferir o pH que deve estar próximo a 8,3, porém **não deve ser ajustado**. Transferir a solução para uma proveta e completar com água até 1000 mL.

4. Armazenamento

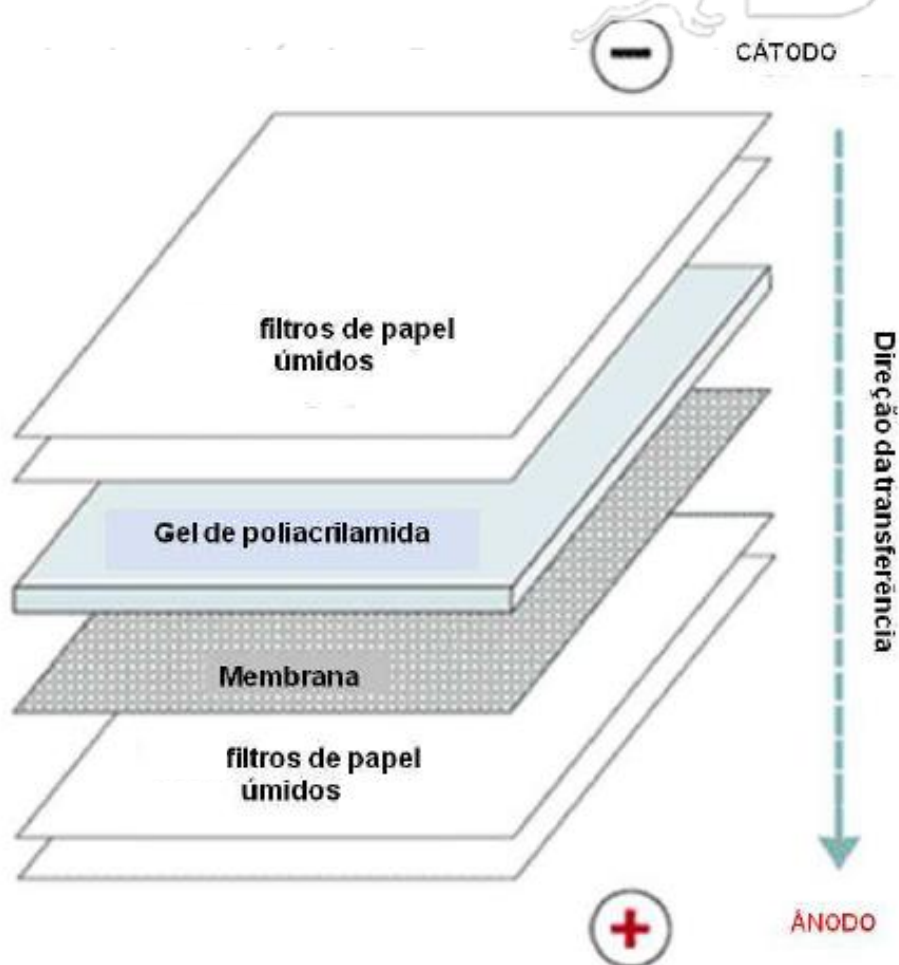
Deve ser armazenada à 4°C.

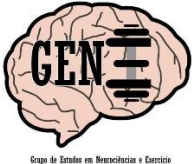


 Grupo de Estudos em Neurociências e Exercício	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		Nº: 05
			Edição: 01
			<i>Western Blot</i>
	<i>WESTERN BLOT</i>		Elaborado: 04/2021
			Autor: Ricardo Augusto Leoni De Sousa

ETAPA 5 – TRANSFERÊNCIA DO GEL

Separar as membranas a serem utilizadas. Em caso de ser membrana de PVDF mergulhar ela no metanol por 1 minuto para ativar a membrana. Em seguida, colocar numa bandeja o tampão de transferência gelado sobre os cassetes, papéis filtros, esponjas e membranas, independente se forem de nitrocelulose ou de PVDF, que irão compor o “sanduíche” por 30 minutos. Ordem do sanduíche a ser montado sobre a parte preta: esponja (1), papel filtro (8). Sobre a parte branca ou vermelha, a depender da empresa onde você comprou o material, colocar na seguinte ordem: esponja (1), papel filtro (8), membrana. Aguardar o final da corrida para então colocar o gel sobre a membrana e fechar o sanduíche. Cátodo é o polo negativo e a parte preta do cassete. Ânodo é o polo positivo e a parte incolor ou vermelha do cassete, a depender do seu equipamento.



	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	Nº: 05
		Edição: 01
	WESTERN BLOT	Western Blot
		Elaborado: 04/2021
		Autor: Ricardo Augusto Leoni De Sousa

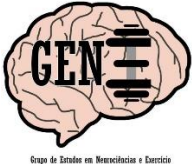
Fecha o sanduíche, que deve estar bem justo/apertado, com o gel por sobre a membrana e esta sobre o papel filtro e este sobre a esponja que estará sobre a parte branca do sanduíche. **É necessário que o sanduíche esteja bem justo, apertado.** Coloca-se o sanduíche com a parte branca/vermelha virado para a parte vermelha do cassete. O sanduíche deve então ser colocado na cuba de transferência.



Usar voltagem constante a 100V. Marcar o tempo para 90 minutos. Lembrar de colocar muito gelo em volta da cuba, quase que cobrindo esta, e colocar um *gelox* (obviamente gelado!) dentro da cuba. Você deve verificar se a corrente está passando. Na parte de trás da cuba você poderá observar bolhas subindo por ambos os lados, pelos cabos do cassete de transferência.



Caso a transferência semi-seca volte a funcionar use 25V, 1.0A por 27 minutos. O preparo da ordem do sanduíche é o mesmo, só não usa a esponja.

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	Nº: 05
		Edição: 01
	WESTERN BLOT	Western Blot
		Elaborado: 04/2021
		Autor: Ricardo Augusto Leoni De Sousa

TAMPÃO DE TRANSFERÊNCIA

Objetivo

Tampão utilizado com a finalidade de promover a transferência das proteínas que correram no gel SDS-PAGE para uma membrana de nitrocelulose.

1. Materiais

- Proveta de 1000 mL
- Balança analítica
- Béquer
- Barquinha para pesar

2. Reagentes

- Água destilada
- Glicina
- Metanol
- Trizma base ou Tris

3. Procedimento

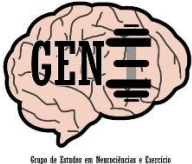
Pesar 5,8g de Tris e 2,93 de glicina. Juntar os sólidos e dissolver em 500 mL de água destilada, sob agitação. Verter a solução em uma proveta e acrescentar 200 mL de metanol, na capela. Depois completar qsp para 1000 mL.

4. Armazenamento

Deve ser armazenada à 4°C.

Obs1: Deve ser preparado no dia em que for utilizar. Deve estar gelado no momento do uso.

Obs2: Após finalizar a transferência, deve-se cortar o excesso de membrana e marcar com um lápis (**levemente para não furar a membrana!**) no local onde ficou a marcação das bandas (*protein ladder*).

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	Nº: 06
		Edição: 01
	WESTERN BLOT	Western Blot
		Elaborado: 04/2021
		Autor: Ricardo Augusto Leoni De Sousa

ETAPA 6 – CORAR E BLOQUEAR MEMBRANAS

Após finalizar a transferência, deve-se cortar o excesso de membrana e **marcar com um lápis no local onde ficou a marcação das bandas** (*protein ladder*). Como são duas membranas, é recomendado cortar a ponta de uma das membranas para que você saiba quem é a membrana 1 (intacta) e a membrana 2 (cortada na ponta).

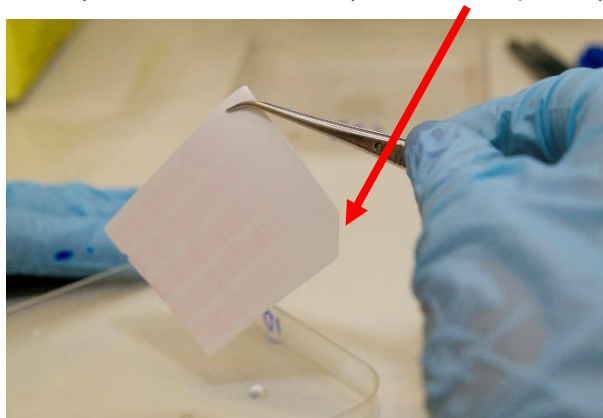
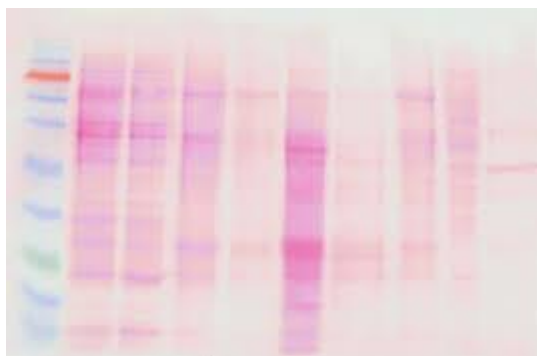
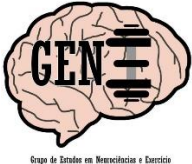


Foto meramente ilustrativa da membrana 2 cortada na ponta após corar com *Ponceau* e realizar 1 lavagem em TBS para retirada do *Ponceau*.

Em seguida, corar com solução *Ponceau*, por 1 minuto, sob agitação, a membrana para avaliar se existe proteína. Deveria ver a membrana marcada como fosse uma camisa listrada. Devolver a solução para o frasco. Lavar as membranas com TBS 1x até não existir mais *Ponceau*. Fazer uma solução bloqueio e bloquear a membrana por 1 hora. A solução bloqueio é feita com BSA 3% em TBS-T 1x. Abaixo o protocolo da solução de *Ponceau*, do preparo do TBS 1x, TBS 10X, TBS-T 1x.



Membrana corada com *Ponceau*

 Grupo de Estudos em Neurociências e Exercício	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	Nº: 06
		Edição: 01
	WESTERN BLOT	Western Blot
		Elaborado: 04/2021
		Autor: Ricardo Augusto Leoni De Sousa

SOLUÇÃO DE PONCEAU

Objetivo:

A solução de *Ponceau* é utilizada no fim da etapa de transferência (*Western blotting*) e serve para verificar se a transferência das proteínas foi realizada de maneira efetiva.

1. Materiais

- Proveta de 100 mL
- Balança analítica
- Béquer
- Barquinha para pesar
- Pipeta

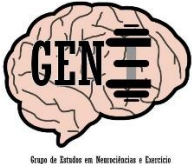
2. Reagentes

- Água destilada
- 1g *Ponceau S* (1%)
- 3g de ácido tricloroacético (3%)

3. Procedimento

Pesar 1g de *Ponceau S* e 3g de ácido tricloroacético. Adicionar o ácido em um béquer, colocar a quantidade suficiente de água para solubilizar e em seguida adicionar o *Ponceau S* e homogeneizar. Verter a solução em uma proveta e completar com água até 100 mL.

4. Armazenamento ambiente

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	Nº: 06
		Edição: 01
	WESTERN BLOT	<i>Western Blot</i>
		Elaborado: 04/2021
		Autor: Ricardo Augusto Leoni De Sousa

TBS 1x (Volume=1000 mL)

Objetivo

A solução de TBS 1X é utilizada para realizar a lavagem de membranas de nitrocelulose entre os passos de *Western blotting* e também nos passos da reação de imunohistoquímica. Esta ajuda a manter o pH constante entre 7,4 – 7,6 (pH fisiológico) durante a reação, facilitando assim ligação antígeno-anticorpo.

1. Materiais

- Proveta de 1000 mL
- Balança analítica
- Béquer
- Barquinha
- pHmetro

2. Reagentes

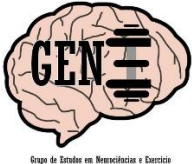
- Água destilada
- 2,42g Tris
- 8g de NaCl

3. Procedimento

Pesar 2,42 de Tris e 8g de NaCl. Juntar os sólidos e dissolver em 800 mL de água destilada, sob agitação (agitador magnético). Ajustar a solução para pH 7,6. Verter a solução em uma proveta e completar com água até 1000 mL.

4. Armazenamento

Temperatura ambiente. Armazenar em frasco transparente e observar se ocorre o crescimento de fungos.

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	Nº: 06
		Edição: 01
	WESTERN BLOT	Western Blot
		Elaborado: 04/2021
		Autor: Ricardo Augusto Leoni De Sousa

TBS 10x (Volume=1000 mL)

Objetivo:

A solução de TBS 10x é uma solução concentrada de TBS1X. É utilizada como estoque e deve ser diluída antes do uso. Tem a mesma função da TBS 1X.

1. Materiais

- Proveta de 1000 mL
- Balança analítica
- Béquer
- Barquinha para pesar

1. Reagentes

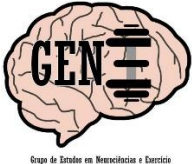
- Água destilada
- 80g de NaCl
- 24,2 de Tris

2. Procedimento

Pesar 24,2 de Tris e 80g de NaCl. Juntar os sólidos e dissolver em 800 mL de água destilada, sob agitação. Verter a solução em uma proveta e completar com água até 1000 mL.

3. Armazenamento

Sob refrigeração, 4°C.

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	Nº: 06
		Edição: 01
	WESTERN BLOT	<i>Western Blot</i>
		Elaborado: 04/2021
		Autor: Ricardo Augusto Leoni De Sousa

TBS-T 1x (Volume=1000 mL)

1. Materiais

- Proveta de 1000 mL
- Pipeta

2. Reagentes

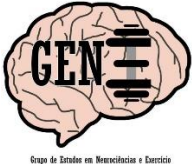
- Água destilada
- Tween-20
- TBS-1X ou TBS-10X

3. Procedimento

Em uma proveta, diluir 100 mL de TBS-10X em 900 mL de água e em seguida adicionar 1 mL de Tween-20, homogeneizar.

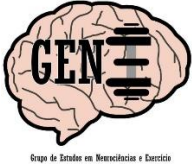
4. Armazenamento

Temperatura ambiente. Colocar em frasco transparente para chacagem constante do possível crescimento de fungos.

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	Nº: 07
		Edição: 01
	WESTERN BLOT	Western Blot
		Elaborado: 04/2021
		Autor: Ricardo Augusto Leoni De Sousa

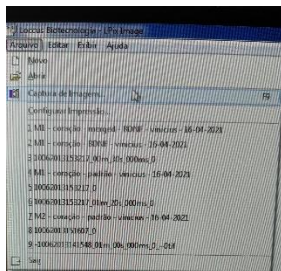
ETAPA 7 – INCUBAÇÃO DO PRIMÁRIO E SECUNDÁRIO

1. Primários são preparados em TBS-T utilizando BSA 3%. A Azida sódica inativa a enzima *horseradish peroxidase* (HRP) e a maioria dos reagentes primários do *western blot* são feitos em HRP. Contudo, o uso da Azida 2% leva a preservação do seu anticorpo primário por muitos anos. Se seu primário não foi feito em HRP, ainda assim, verifique qual revelador irá usar (Pico, Luminol, ECL, Fentom, etc), pois a maioria são feitos em HRP. Não recomendo utilizar a solução bloqueio e o preparo dos primários e secundários em leite. Sempre os faça em BSA 3%. Por quê? O tempo de conservação é maior. Apenas no BSA 3% seu primário funcionará por muitos anos, se bem utilizado e cuidado.
2. Seguir a diluição do primário indicada no *datasheet* no seu menor range para proteínas fosforiladas e/ou consideradas difíceis de sair e no maior range para as proteínas consideradas fáceis. É recomendado um mínimo de 7mL do primário para cobrir toda a membrana. O ideal seria 10mL do primário para garantir cobertura total da membrana.
3. Incubar o primário no *overnight* sobre um oscilador, garantindo que estará molhando toda a membrana, **dentro da geladeira e com a porta fechada**. No dia seguinte, retirar o primário devolvendo-o para seu respectivo tubo falcon. Em seguida, colocar o secundário em temperatura ambiente sob leve agitação por 2 horas. Caso a membrana fique muito marcada ao ponto de estourar suas bandas ou até mesmo de queimar a membrana ao fazer a revelação (última etapa do *blot*), recomendo reavaliar o range e/ou adaptar o tempo de incubação do secundário para 1 hora e 30 minutos. Ao finalizar a incubação do secundário deve-se devolver o conteúdo do pote onde está a membrana para seu respectivo tubo falcon. **Nunca jogar fora o primário ou o secundário**. Em laboratórios com muitos recursos financeiros o normal seria jogar fora após ter usado uma vez, mas este não é nosso caso. Sempre devolva o primário e secundário para seus respectivos falcons após o uso. Em seguida, lavar as membranas na seguinte ordem:
 - a) 4 lavagens com TBS-T. Tempo de cada lavagem = 10 minutos. Descartar o TBS-T na pia.
 - b) 2 lavagens de TBS. Tempo de cada lavagem = 5 minutos. Ao finalizar a lavagem descartar o TBS na pia. Colocar um novo TBS e levar a membrana para revelar.

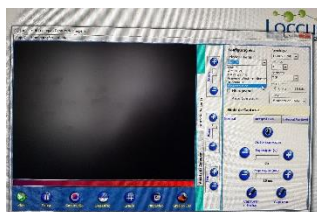
	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	Nº: 08
		Edição: 01
	WESTERN BLOT	Western Blot
		Elaborado: 04/2021 Autor: Ricardo Augusto Leoni De Sousa

ETAPA 8 – REVELAÇÃO

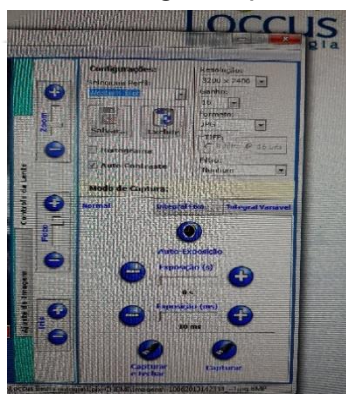
1. Ligar o estabilizador na rede elétrica;
2. Ligar o computador;
3. Ligar o Fotodocumentador ChemiDoc MP (botão ON/OFF) e ligar a luz branca. Aguardar 30 minutos até que o sistema seja aquecido corretamente;
4. Abrir o programa “Lpix Image” localizado na área de trabalho e clicar em arquivo > captura de imagem;



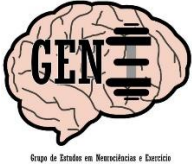
5. Selecionar o perfil *Western Blot*;



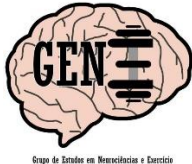
6. Posicionar a membrana sobre a transparência e colocar esta sobre a bandeja que fica dentro do Chemidoc (você precisará abaixar a bandeja para a posição reta, claro);
7. Fechar o Chemidoc. Em modo de captura, deixar em normal, ajustar a membrana para o tamanho e posição que deseja. Clicar para capturar a imagem da membrana (neste caso ele vai capturar a primeira imagem que consiste apenas na membrana com a marcação do padrão);



8. Após isso, abrir o Chemidoc, **desligar a luz branca** e jogar o luminata ou pico ou fentom ou ECL sobre a membrana e feche o Chemidoc. Sem mexer na posição da membrana ou no zoom (tamanho) que você a colocou para a primeira foto, clicar em Integral Fixa;

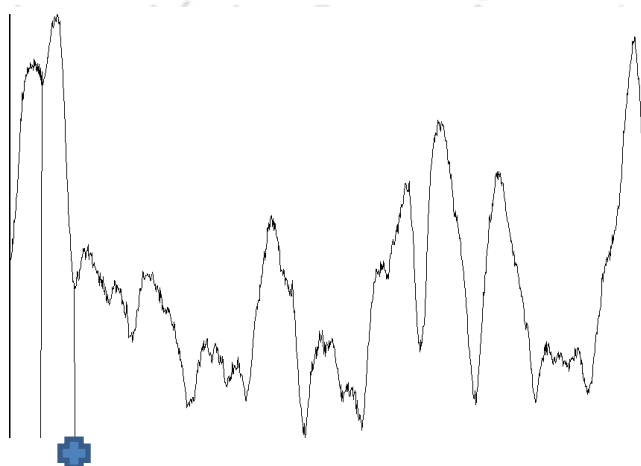
	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	Nº: 08
		Edição: 01
	WESTERN BLOT	Western Blot
		Elaborado: 04/2021
		Autor: Ricardo Augusto Leoni De Sousa

9. Clicar em Iniciar no canto inferior direito da tela;
10. Selecionar a imagem que você quer salvar. Clicar com o botão direito do mouse na imagem desejada. Clicar em “Save” para salvar a imagem selecionada;
11. Abrir a foto das 2 membranas: a que contém a marcação do padrão e a membrana com a revelação das amostras. Você pode diminuir o *zoom* de cada imagem, após abrir. Isso não afetará o que fará a seguir;
12. Clicar em imagem > combinar imagens. Vai abrir uma janela. Clicar em Operação > Blend > OK. O programa irá mesclar as imagens. Sua membrana está *merged* e você pode agora salvar seu resultado na sua pasta.
13. Para salvar as imagens trazer um CD para gravação.
14. Ao salvar uma imagem **sempre colocar, no mínimo**: seu nome, nome do laboratório, nome do experimento, número da membrana (M1, M2, M3, etc.), tecido, data da revelação. Exemplo: Ricardo-Letfis-Diabetes-M1-Hipocampo-02-04-2021. Isso facilitará seu controle e uma posterior verificação das revelações e dados pelo seu orientador/supervisor.
15. Para desligar o equipamento siga a ordem inversa. Desligue o Chemidoc primeiro. Depois desligue o computador. Desligue o *Nobreak*. Retire o cabo da tomada.
Para reiniciar todo o processo será necessário estripar a membrana. Para isso, utilizo glicina ácida por 30 segundos. A solução de Glicina ácida 0,2M é utilizada para realizar *stripping* de membranas de *western blot*, que é a retirada de anticorpos primários e secundários ligados à membrana. Deve-se ter cuidado ao utilizar, para que não ocorra a remoção das proteínas de interesse da membrana. Materiais: béquer, barqueta para pesar, proveta de 500 mL, balança analítica, pHmetro, reagentes, glicina, água miliQ.
Procedimento. Pesar 7,506g de glicina. Dissolver em 250mL de água destilada. Em seguida, ajustar o pH para 2,5, com HCl ou NaOH. Transferir a solução para uma proveta e completar com água até 500 mL. Armazenamento. Sob refrigeração, 4°C.
Após a confirmação do stripping através da revelação da membrana no fotodocumentador, deve-se lavar a membrana com TBS e colocar esta para bloquear por 1 hora. Após o bloqueio a membrana estará pronta para reiniciar o processo de incubação de anticorpos.
A membrana deve ser guardada imersa em tampão de TBS1x sob refrigeração a 4°C.

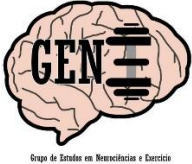
 Grupo de Estudos em Neurociências e Exercício	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		Nº: 09
			Edição: 01
			<i>Western Blot</i>
	WESTERN BLOT		Elaborado: 04/2021
			Autor: Ricardo Augusto Leoni De Sousa

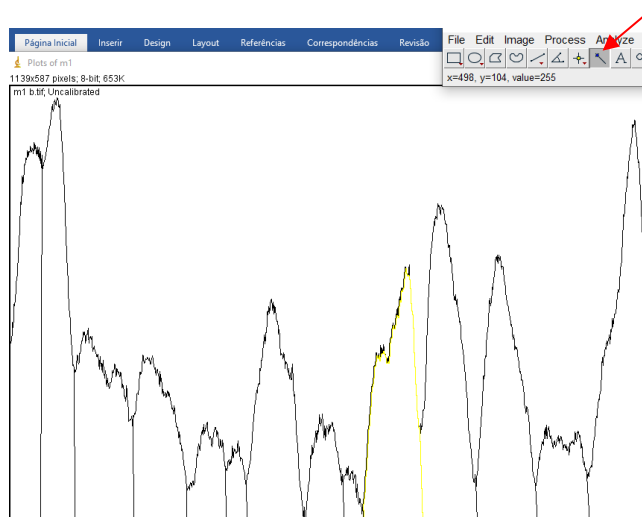
ETAPA 9 – QUANTIFICAÇÃO DOS RESULTADOS

1. Abrir o programa Image J
2. Abrir e colocar a foto dentro do Image J (basta arrastar a foto para o programa)
3. Clicar em type
4. Clicar em 8 bit
5. Clicar no retângulo
6. Selecionar a linha toda com as bandas
7. Clicar em analyze
8. Clicar em gels
9. Clicar em select first lane
10. Clicar em analyze
11. Clicar em Gel
12. Clicar em Plot lanes
13. Pode-se usar o invert, se necessário
14. No gráfico gerado irá clicar com a cruz na ponta extrema inferior de cada parábola. Em seguida, traçar uma e separar a parábola (banda) atual da próxima. Para isso traçar uma reta do extremo inferior até o final (até onde não existir mais para onde arrastar a reta). Fazer isso para todas as bandas (vértices).

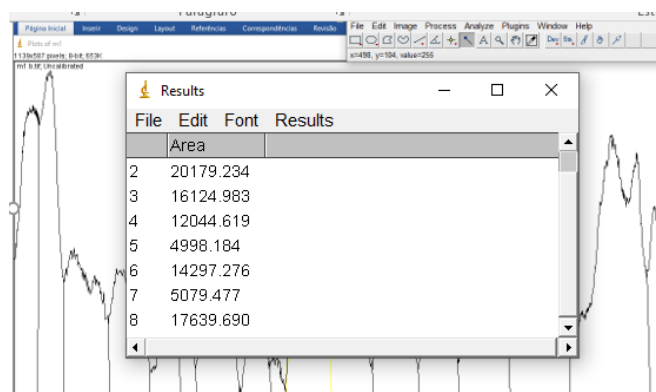


15. Clicar na varinha mágica e sair clicando em cada área separada

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		Nº: 09
			Edição: 01
	WESTERN BLOT		Western Blot
			Elaborado: 04/2021
			Autor: Ricardo Augusto Leoni De Sousa



16. Copiar o resultado e cola no excel



17. Separar o valor de cada banda dentro do seu respectivo grupo

18. Colocar os resultados dentro do programa estatístico (prisma, spss, etc) e fazer a análise pertinente (teste t, anova de uma via, anova de duas vias, anova de três vias, etc). A análise estatística deve atender ao número de grupos e variáveis que você tiver para serem analisadas.

19. Montar o gráfico e comemorar o sucesso do experimento!

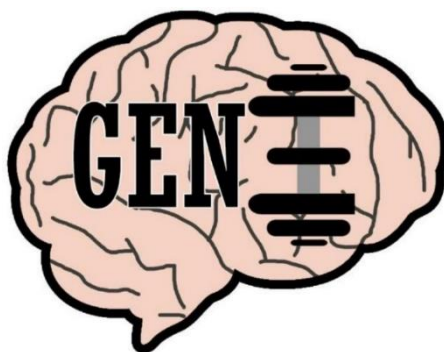
3. REFERÊNCIAS

DE SOUSA, R. A. L. et al. High-intensity resistance training induces changes in cognitive function, but not in locomotor activity or anxious behavior in rats induced to type 2 diabetes. **Physiology & Behavior**, v. 223, n. June, p. 1-7, 2020a.

DE SOUSA, R. A. L. et al. Neurological consequences of exercise during prenatal Zika virus exposure to mice pups. **International Journal of Neuroscience**, p. 1, 2020b.

RENART, J.; REISER, J.; STARK, G. R. Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: A method for studying antibody specificity and antigen structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 7, p. 3116–3120, 1979.

TOWBIN, H.; STAHELINT, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. **Biochemistry**, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.



Grupo de Estudos em Neurociências e Exercício

