



SEP 02, 2023

OPEN ACCESS



**DOI:**  
[dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bp2l696jdlqe/v1](https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bp2l696jdlqe/v1)

**Protocol Citation:** Delia Piedad Recalde-Reyes, Juliana Lopez Calderon 2023. DOT BLOT - DENGUE VIRUS. **protocols.io**  
<https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bp2l696jdlqe/v1>

**License:** This is an open access protocol distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](#), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited

**Protocol status:** Working  
 We use this protocol and it's working

**Created:** Apr 17, 2023

## DOT BLOT - DENGUE VIRUS

Delia Piedad Recalde-Reyes<sup>1</sup>,

Juliana Lopez Calderon<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Corporación Universitaria Empresarial Alexander von Humboldt;

<sup>2</sup>Corporacion Universitaria Empresarial Alexander von Humboldt

CUE Alexander von Humboldt



Juliana Lopez Calderon

Corporacion Universitaria Empresarial Alexander von Humboldt

### ABSTRACT

Es un inmunoensayo simple y rápido. Requiere la aplicación de una pequeña cantidad de muestra directamente sobre una membrana polivinilo PVDF, en la que se deposita antígeno total de DENV y posteriormente se expone a suero humano diluido en TBS-T 1:200, para posteriormente, ser detectado con anticuerpo IgG anti human marcado con fosfatasa alcalina diluido en TBS-T (1:5000).

La reacción se visualiza a simple vista al visualizar la presencia de un punto de color violeta (reactivo o positivo) o la ausencia de este (no reactivo o negativo).

Este protocolo fue desarrollado gracias al apoyo administrativo de la CUE Alexander von Humboldt de Armenia y desarrollado dentro de la convocatoria de Minciencia 917 de estancia en investigación: Desarrollo de una prueba tipo Western blot, Dot blot e Inmunofluorescencia para detección de antígenos virales de dengue serotipos 1 – 4.

### GUIDELINES

El siguiente protocolo describe el paso a paso para la realización de una prueba tipo Dot Blot para detección de dengue virus.

Tiempo de duración 24 horas a partir de la activación de las membranas de polivinilo.

**Last Modified:** Sep 02, 2023

**PROTOCOL integer ID:** 80600

## MATERIALS

Membrana de polivinilo , 0,45 µm, 30 cm x 3 m Santa Cruz Polivinilo Cat. SC-3723

Micropipetas 0,1-10; 10-100ul

Balanza analítica.

TBS- T (Buffer tris salino) con tween al 0,05%

PBS (Buffer fosfato salino) con tween al 0,05%

Agua destilada

Leche descremada en polvo disuelta en TBS-T al 5%

Sueros humanos diluidos 1:200 en TBS-T

Antihuman IgG marcado con fosfatasa alcalina Sigma Aldrich Ref: A8542

Sustrato fosfatasa alcalina (BCIP/NBT) Thermo Scientific Ref: 34042

## SAFETY WARNINGS

❗ Implementar todas las medidas de bioseguridad para trabajo en el laboratorio. Utilizar guantes, bata y cabina de bioseguridad tipo II, manejar todos los reactivos y suplementos de forma aséptica para garantizar cultivos axénicos libres de microorganismos. Utilizar alkazime para inactivar los desechos que se generen en el procedimiento tales como virus, células cancerígenas, aislados clínicos o cualquier otro biológico que cause daño a la salud.

## BEFORE START INSTRUCTIONS


Preparar todos los medios y reactivos necesarios para usar en el inmunoensayo. Asegúrese de contar con la cantidad suficientes para cada uno de los pasos.

### 1 Preparación del antígeno

En este ensayo se trabajó con antígeno total de DENV2; el virus esta previamente titulado a 17.000.000 UFP/mL y almacenado a  -80 °C .

Previo al uso del antígeno total, este se llevó a temperatura ambiente de manera espontánea.

Estos virus fueron empleados como antígeno total para los ensayos de Dot Blot.


Después de su descongelación, estas alícuotas fueron almacenadas a  -20 °C .

#### Note

Estos antígenos no pueden ser utilizados para ensayos como plaqueros o infecciones (únicamente como antígeno total).

## 2 Activación membrana de polivinilo

5m

Para realizar este paso es necesario sumergir la membrana de polivinilo poro 0,45µm en metanol absoluto durante  00:05:00 5 Minutos .

Posteriormente se retira y se deja secar a temperatura ambiente.


#### Note


Las membranas de PVDF de Santa Cruz, tienen un lado poroso y uno lado liso, de acuerdo con las indicaciones del fabricante se debe trabajar sobre el lado liso.

## 3 Adición del antígeno total sobre la membrana (transferencia directa)

10m

En la membrana de polivinilo se aplica  1 µL de metanol absoluto, empleando una micropipeta de 10µm.

Sobre este punto se añaden  3 µL de antígeno total (DENV).

Esta muestra se deja secar a temperatura ambiente durante  00:10:00 10 minutos .

## 4 Bloqueo de la membrana

Cada membrana sensibilizada fue bloqueada  Overnight empleando leche descremada al 5%, disuelta en TBS-T.

### Note



La membrana debe quedar sumergida en su totalidad en solución de bloqueo, el lado liso debe ir hacia abajo preferiblemente.

## 5 Adición de Anticuerpo Primario

2h



Se emplearon sueros de origen humano previamente determinados por kit comerciales como Positivos para DENV y Negativos para DENV.

Estos anticuerpos fueron diluidos 1:200 empleando solución de bloqueo.

La reacción fue incubada durante  02:00:00 2 horas a temperatura ambiente  20 °C en agitación constante 120rpm.

## 6 Lavados

5m

Se realiza lavado de la membrana con  5 mL de TBS-*Tween*-0,05% (TBS-T) por  00:05:00 5 minutos, este proceso se repite tres veces.

## 7 Anticuerpo secundario

El anticuerpo secundario (Anti human Sigma Cat. A8542) fue diluido 1:5000 en TBS-T con azida de sodio ( $\text{NaN}_3$ ) al 0,03%.

### Note

El anticuerpo secundario debe ser desechado posterior a su utilización.

Para asegurarse de la eliminación de residuos de leche descremada la membrana puede lavarse empleando agua destilada.

## 8 Lavados

5m

Se realiza lavado de la membrana con  5 mL de TBS-*Tween*-0,05% (TBS-T) por

⌚ 00:05:00 5 minutos, este proceso se repite tres veces.

## 9 Revalado.

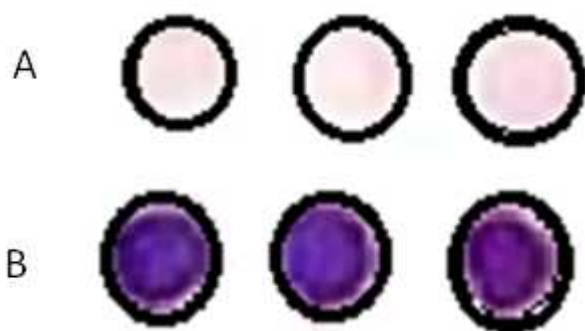
10m

Para revelar la reacción se empleó sustrato (BCIP/NBT) Thermo Scientific Ref: 34042, la reacción se incubó a 🌡 37 °C durante ⌚ 00:05:00 5 minutos .

La reacción se detuvo empleando agua destilada.

Las membranas se secaron a temperatura ambiente por ⌚ 00:05:00 5 minutos .

## 10



**Figura 1. Resultados visuales Dot blot.** A. Resultado negativo B. Resultado positivo

## 11 Determinación punto de corte

La interpretación de los datos debe realizarse tomando de la siguiente manera.

Obtener el promedio y desviación estandar de la intensidad de señal de los controles negativos (PBS, o sueros/plasmas) negativos.

$$\text{Cut off} = \bar{X} + 3 * DS$$

$\bar{X}$ : Promedio

DS: Desviación estandar

### Interpretación

Los valores iguales e inferiores al promedio se consideran NEGATIVOS, valores iguales al promedio + 3 desviaciones estandar se consideran resultados INDETERMINADOS (zona gris de la prueba).

Valores por encima del punto de corte se consideran POSITIVOS.

#### Note

**Nota:** La intensidad de señal fue cuantificada empleando el software Fiji <https://imagej.net/software/fiji/downloads>; siguiendo las indicaciones del fabricante.

Cada determinación se realizó considerando el mismo numero de pixeles y área de medida.