



JUN 27, 2023

OPEN ACCESS

DOI:
dx.doi.org/10.17504/protocols.io.kxygx963dg8j/v1

Protocol Citation: Delia Piedad Recalde-Reyes, Juliana Lopez Calderon 2023. Electroforesis de proteínas y Western blot DENV.

protocols.io
<https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.kxygx963dg8j/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: May 03, 2023

Last Modified: Jun 27, 2023

PROTOCOL integer ID:
 81380

🌐 Electroforesis de proteínas y Western blot DENV

Delia Piedad Recalde-Reyes¹,

Juliana Lopez Calderon²

¹Corporación Universitaria Empresarial Alexander von Humboldt;

²Corporacion Universitaria Empresarial Alexander von Humboldt

CUE Alexander von Humboldt



Delia Piedad Recalde-Reyes

Corporación Universitaria Empresarial Alexander von Humboldt

ABSTRACT

Una prueba tipo Western Blot (también conocida como inmunotransferencia) es una técnica utilizada para detectar proteínas específicas en una muestra. El procedimiento consiste en separar las proteínas de la muestra en función de su tamaño mediante la técnica de electroforesis para luego ser transferida a una membrana de polivinilo.

La membrana se somete a una serie de pasos de bloqueo y lavado para eliminar las proteínas no específicas y prevenir la unión no específica de anticuerpos en la muestra. Se añade un primer anticuerpo específico que se unen a la proteína de interés y un anticuerpo secundario que se une al anticuerpo primario.

Finalmente, se utiliza un sustrato químico que reacciona con el anticuerpo secundario para producir una señal visual que indica la presencia de la proteína de interés. La intensidad de la señal visual está relacionada con la cantidad de proteína presente en la muestra.

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 Wester Blot para detección de dengue virus.

Tiempo de duración horas a partir de la realización del gel de electroforesis.

MATERIALS

Acrilamida bis acrilamida 40%.

1.5M Tris HCl pH 8.8.

SDS 10%.

Agua destilada.

TEMED.

Persulfato de amonio 10%.

Metanol absoluto

Glicerol al 50%.

Azul de bromofenol al 1%.

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

Cámara de proteínas.

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.

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 Gel de electroforesis de proteínas (Denaturante) al 10% (Volumenes suficientes para 2 geles)

Preparar gel de resolución empleando

Acrilamida bis acrilamida 40%

2.5 mL

1.5M Tris HCl pH 8.8

2.5 mL

SDS 10%

100 µL

Agua destilada

4.845 mL

TEMED

5 µL

PSA 10%

50 μ L

VOLUMEN TOTAL

10 mL

Después de adicionar los reactivos en la cámara de proteínas puede adicionarse 300 μ L de metanol absoluto para favorecer la polimerización del gel.

Note

- El persulfato de amonio (PSA) debe diluirse en agua destilada y preparar fresco siempre antes de usar. No se recomienda emplear persulfato refrigerado o congelado.
- Adicionar los reactivos en el orden que se muestran, se recomienda adicionar el TEMED Y PSA al 10% al finalizar la mezcla.
- Evitar la formación de burbujas de aire. La reacción se da en ausencia de oxígeno.

Gel de empaquetamiento (staging) al 4% (Volumenes suficientes para 2 geles)

Acrilamida bis acrilamida 40%

0.5 mL

1.5M Tris HCl pH 6.8

1.25 mL

SDS 10%

50 μ L

Agua destilada

3.160 mL

TEMED

5 μ L

PSA 10%

25 μ L

VOLUMEN TOTAL

5 mL

Note

Geles de resolución de acuerdo con el peso de las proteínas

Porcentaje Acrilamida	Rango de separación KDa
5	60 - 210
7.5	35 - 95
10	15 - 70
15	4 - 200

Correr el gel a 80 voltios(8 voltios por cada cm de gel) hasta que termine la corrida en el gel de empaquetamiento.





Posteriormente correr entre 12 a 15 voltios por cm de gel (entre 120 a 150 voltios) durante 60 minutos.

Si esta corriendo un gel a 30mAmp y para 2 geles 60mAmp.

2 Preparación de la muestra

15m

Preparación buffer carga 2X




SDS al 10%	 6 mL
Glicerol al 50%	 15 mL
Azul de bromofenol al 1%	 0.3 mL
0.5 M Tris HCl pH 6.8	 3.75 mL
Agua destilada ajustar a	30mL

Adicionar B mercaptoetanol a  950 µL de muestra antes de usar.

Protocolo tomado y adaptado de BioRad.


Adicion buffer carga a la muestra

Para  10 µL de muestra añadir:

 5 µL de muestra (entre  5 µg a  10 µg de proteína total para un minigel o determinar concentración de proteínas por BCA.


 4.75 µL de buffer carga

 0.25 µL de betamercaptoetanol





Total muestra  10 µL

Calentar muestra  90 °C  100 °C durante  00:05:00 5 minutos ó a  70 °C

durante  00:10:00 10 minutos

Cargar muestra a cada pozo  10 μL

Note

Se puede cargar entre 40  40 μg a  60 μg de muestras con proteína total no pura (antígeno total) y entre  0.5 μg a  4 μg de proteínas puras.

En caso de necesitar diluir las muestras de proteína total puede hacerse empleando PBS 1X.


3 Transferencia semi seca de proteínas


40m

Buffer de transferencia 1L


 3.029 g de Tris Base

 14.263 g de glicina

Diluir empleando agua destilada, ajustar volumen hasta  700 mL


Verificar pH a 8.3 o ajustar hasta alcanzar un volumen de  800 mL


Llevar a  1000 mL empleando  200 mL de metanol absoluto.

Para realizar la transferencia del gel de proteínas a la membrana se debe hidratar previamente la membrana sumergiendola durante  00:05:00 5 minutos en metanol absoluto, posterior a esto poner en contacto la membrana de polivinilo con el gel de electroforesis.

Eliminar las burbujas restantes entre gel membrana

Tanto gel como membrana deben ponerse sobre papel filtro BioRad Cat. 1703960

El papel filtro debe sumergirse previamente en buffer de transferencia a  4 °C durante

 00:05:00 5 minutos

El orden de los elementos debe ser el siguiente desde la parte superior hasta la inferior

Papel filtro
Gel
Membrana de polivinilo 0.45um
Papel filtro

La transferencia se realiza en equipo trans tubo blot de BioRad empleando el protocolo estándar preestablecido para 2 mini geles

25 voltios - 1.0A -  00:30:00 30 minutos

Note

Para verificar la transferencia del gel a la membrana, puede realizarse coloración de la misma empleando rojo Ponceau. La coloración de rojo de ponceau se prepara empleando 0.25g de rojo de ponceau, 15 mL de ácido acético llevar a 60mL de volumen disuelto en agua destilada, emplear 40mL de metanol (0,25% P/V *rojo Ponceau* en 15% V/V ácido acético y 40% V/V metanol)

Esta coloración es rápida, no es permanente, no afecta ensayos posteriores y se elimina fácilmente lavando la membrana al emplear agua destilada.

4 Bloqueo membrana de PVDF

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 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 (NaN₃) 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 Para revelar la reacción se empleó sustrato (BCIP/NBT) Thermo Scientific Ref: 34042, la

10m

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 Lectura de los resultados

