



Protocolo Western Blot para oócitos

As amostras devem ser coletados em pools de 100-200 de oócitos sem células do cumulus. Para isso, as células são lavadas em PBS sem cálcio e magnésio contendo 0,01% de BSA. Os oócitos são depositados em tubos de 0,2 ml em volume mínimo de PBS com 0,01% de BSA.

Preparo dos géis 10% e 12%:

10%		
	1 gel	2 geis
H ₂ O	1,9	3,8
30% acrilamida	1,7	3,4
1,5M Tris pH 8,8	1,3	2,6
SDS 10%	0,05	0,1
10% P.A.	0,05	0,1
TEMED	0,002	0,004
Total	5 mL	10ml

12%		
	1 gel	2 geis
H ₂ O	1,6	3,2
30% acrilamida	2,0	4
1,5M Tris pH 8,8	1,3	2,6
SDS 10%	0,05	0,1
10% P.A.	0,05	0,1
TEMED	0,002	0,004
Total	5 mL	10ml

Aplicar o gel ate a parte verde do suporte e completar com isopropanol para ficar reto. Deixar polimerizar durante 40 minutos.

Preparar o gel de cima: (Tris pH 6,8)

	P/ 2 geis	P/ 1 gel
H ₂ O	2,05	1,025
30% acrilamida	0,5	0,25
1,5M Tris pH 6,8	0,375	0,1875
SDS 10%	0,03	0,015
10% P.A.	0,03	0,015
TEMED	0,003	0,0015
Total	3 ml	1,5 ml

- Colocar o pente;
- Deixar polimerizar por 40 minutos no mínimo;

Lise dos oocitos:

Descongelar os inibidores no gelo

Preparar o mix contendo Ripa + inibidores de acordo com a quantidade de amostras:

	1x	2x	3x	4x	5x
NaF [] final 10mM	0,2 ul	0,4 ul	0,6 ul	0,8 ul	1 ul
Orto [] final 10mM	1ul	2ul	3ul	4ul	5ul
Sigma 10x []final 1x	1ul	2ul	3ul	4ul	5ul
Ripa	7,8 ul	15,6 ul	23,4 ul	31,2 ul	39 ul

No tubo contendo a amostra adicionar 7,5ul do mix Ripa + inibidores preparado anteriormente e homogeneizar

Deixar no gelo

Adicionar 2,5ul de tampão de amostra (4x)

Aquecer a 95 graus durante 10 minutos

Aplicar as amostras no gel; Nas canaletas vazias aplicar tampão de corrida.

- Correr o gel a 80 V por 10 min e depois 120V por 80 minutos. (lembrar de preparar o tampão de transferência enquanto o gel corre!)
 - Para anticorpos que precisam de bandas bem separadas: Depois que o marcador cair correr mais 20 minutos.
- Após a corrida marcar com um pequeno corte o gel (para saber o lado do marcador)
- Tampão de transferência para o sistema submerso:

	1000ml	1200ml
Trisbase 25mM	3,03g	3,63g
Glicina 192mM	14,4g	17.28g
Metanol 20%	200 mL	240ml
SDS diluido 10%	2,5 mL	3ml

* Colocar no agitador magnético o trisbase e a glicina. Após a dissolução adicionar o SDS e o metanol. Fazer e usar, **não armazenar**.

Colocar o tampão de transferência na geladeira e no gelo (sempre tampado) para resfriar; Verificar se o gelo reciclável que vai dentro da cuba de transferência esta congelado.

Preparo do gel SDS PAGE e a membrana para transferência:

1. Após a corrida SDS PAGE mergulhar o gel no tampão de transferência por 30 minutos para retirar o tampão de corrida e sais e permitir o ajuste do tamanho final do gel. (nos últimos 10 min fazer os números 4 e 5)
Importante: utilizar recipiente de plástico muito bem limpo para as incubações, pois senão pode aparecer background na revelação.
2. Cortar a membrana de PVDF com cuidado evitando contato com a mão. Marcar e cortar utilizando papel que protege a membrana no rolo.
3. Geralmente o tamanho de membrana deveria ser de 6cm x 9cm.
4. Mergulhar a membrana de PVDF em metanol 100% por 5 minutos. Sem esse processo não haverá ligação das proteínas na membrana de PVDF.
Importante: se estiver usando membrana de nitrocelulose omite esse passo.
5. Após esse tempo transferir a membrana para um recipiente plástico muito bem limpo contendo o tampão de transferência por 5 minutos.
6. A partir desse momento não deixe a membrana de PVDF secar!!!

Procedimento para a transferência utilizando o sistema submerso (Sistema Mini Protean BioRad)



1. Após o SDS PAGE equilibrar o gel no tampão de transferência por 30 minutos, como indicado acima montar o “sanduiche” de acordo com o protocolo para o equipamento da BioRad:

Montagem do sanduiche

Colocar todos os componentes no tampão de transferência.

- a. Prensa (apoiar no lado preto do suporte)
- b. Esponja (equilibrada no tampão de transferência) (“fiber pad”)
- c. Papel de transferência (“filter paper”)
- d. GEL
- e. Membrana PVDF
- f. Papel de transferência (tirar as possíveis bolhas pressionando sobre o papel com a espátula ou tubo de 15 ml)
- g. Esponja (equilibrada no tampão de transferência)
- h. Prensa (lado transparente do suporte)

Colocar a transferência dentro da geladeira com gelo em volta e o gelo reciclável dentro da cuba.

Obs marcar com um pequeno corte a membrana para saber o lado do marcador (o mesmo do gel)

2. Faça a transferência por 1 hora e meia utilizando na fonte voltagem constante de 120V. (A mA estará entre 283mA e 385mA)
3. Após a transferência lavar a membrana por 2 minutos em água e depois mais 2 minutos em metanol.

- Corar a membrana com Ponceau;
 - Marcar com caneta o padrão e anotar a data no canto da membrana.
 - Cortar partes vazias da membrana.
 - Lavar com tampão de transferência para tirar o ponceau;
 - Preparar a solução de bloqueio (solução de BSA 5%);
 - Incubar por 1 a 3 horas com agitação a temperatura ambiente;
 - Lavar a membrana 3x com TTBS por 3 minutos;
 - Incubar o anticorpo primário em TTBS + 2,5% BSA *overnight* na geladeira com agitação;
 - ✓ Verificar a concentração do anticorpo se este não estiver diluído;
 - Lavar 3x de 15 minutos com agitação em TTBS;
- No dia seguinte:
- ✓ Guardar o anticorpo primário na geladeira;

- Incubar com o secundário por 1 hora (geralmente 1:3000 em TTBS sem BSA) agitando em temperatura ambiente;
 - Lavar em 3x de 15 minutos com agitação em TTBS;
 - Fazer a revelação (Kit Ge Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent **select**);
 - - ✓ Preparar 300 µL da solução 1 e 300 µL da solução 2 em um ependorf; (Verificar o tamanho da membrana e ajustar a quantidade de reagente).
 - ✓ Colocar a membrana sobre um plástico e pipetar a solução sobre a membrana. Dobrar o plástico para que todo o liquido espalhe;
 - ✓ Analisar no ChemiDoc;
 - ✓ Software:
 - New protocol →Blot →Hy resolution
 - Manual set exposure time

{	1a: 1s
	ultima: 100s
	n de fotos: 100
- (Esses parâmetros podem mudar dependendo do experimento).
- Após fazer o colorimétrico SEM posicionar de novo o gel. Apenas RUN e salvar na pasta.

Reagentes de estoque

Tampão de transferência – semi-seco

- 5,82g Tris (48mM)
- 2,93g Glicina (39mM)
- 0,375g SDS (1,3mM)
- 200 mL Metanol (20%)
- Completar para 1L H₂O destilada.

- Preparar TTBS:
 - ✓ Preparar TBS 10X (para 100mL)

{	8,76g NaCl
	6,05g trisbase
	Acertar em pH 8,0
 - ✓ TTBS (para 1L):

{	100 mL TBS 10x
	500 µL Tween 20
	Ajustar volume

Tampão de corrida 10x:

Reagente	Quantidade
Tris	30g
Glicina	144g
SDS	10g

Tris 1M pH 6,8:



Pesar 30,285g de tris;
Diluir em 200ml de H₂O destilada;
Ajustar o pH para 6,8.

Tris 1,5M pH 8,8:

Pesar 45,42g de tris;
Diluir em 200ml de H₂O destilada;
Ajustar o pH para 8,8.