

### Técnica – Western Blotting – Aula prática

Em seu laboratório, Dra. Juliana pesquisa sobre a importância da proteína ZZ em atletas, uma proteína importante para a hipertrofia muscular. Dessa forma, ela quer saber qual o tipo de exercício ajudaria a expressar melhor essa proteína, para isso, ela coletou um fragmento de tecido muscular em três pacientes diferentes: indivíduo A (inativo), B (treinamento de força) e C (maratonista).



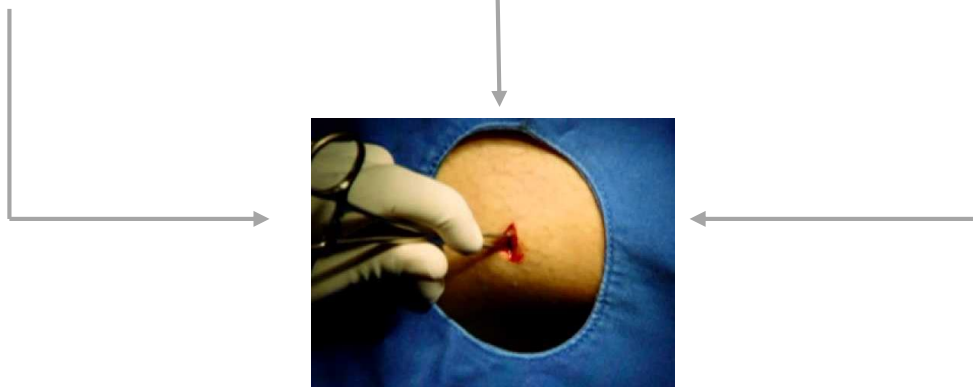
**A** – Atleta de treinamento de força



**B** – Inativo



**C** – Maratonista



A proteína ZZ é mais expressa em qual indivíduo? Para respondermos essa pergunta utilizamos a técnica de *Western Blotting*.

#### **O que é Western Blotting (WB)?**

O WB é uma técnica de biologia molecular na qual detectamos proteínas específicas em amostra de quaisquer tecidos biológicos, tais como tecidos de humanos, animais, células.

Na realização do *Western Blotting* seguimos as seguintes etapas:

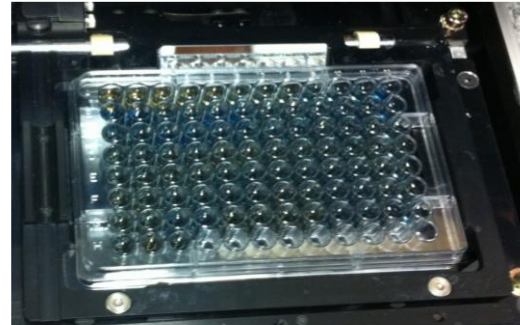
- Preparação das amostras
- Eletroforese em gel
- Transferência das proteínas do gel para membrana
- Coloração com *Ponceau*
- Bloqueio da membrana
- Incubação com anticorpo primário
- Incubação com anticorpo secundário
- Revelação (Análise do resultado)

A seguir, explicaremos o que fazemos em cada etapa:

✚ Preparação das amostras dos pacientes



**Figura 1**



**Figura 2**

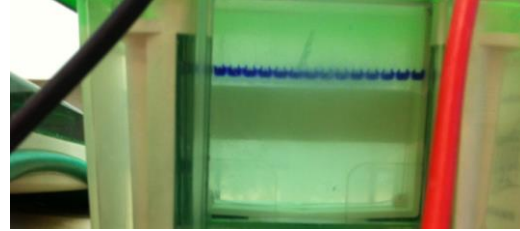
Nessa etapa as amostras são maceradas com um tampão específico para a extração de proteínas totais da amostra (**figura 1**). Em seguida, as amostras maceradas irão passar pelo espectromotometro (**figura 2**) que indicará a quantidade de proteínas que cada amostra tem.

Essas amostras são então preparadas para terem a mesma quantidade de proteínas para que sejam carregadas no gel do WB. Além das amostras carregadas no gel, um marcador de peso molecular também é carregado no gel, ele que irá nos indicar ‘a altura’ onde nossa proteína de interesse tem que sair na revelação (etapa final).

### Eletroforese em gel



**Figura 1**

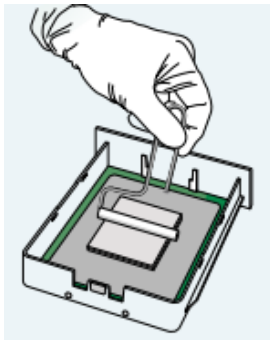


**Figura2**

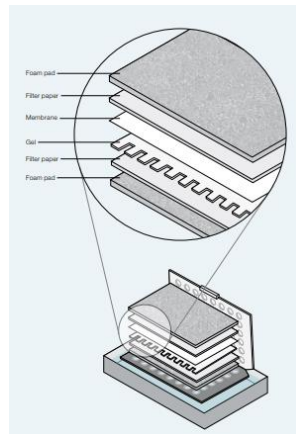
Após carregamento das amostras e do marcador de peso molecular no gel, é aplicado uma corrente elétrica nesse gel, a partir disso, as proteínas começam a ‘correr no gel’ do polo negativo para o polo positivo (**figura 2**).

Essa etapa dura aproximadamente 2h.

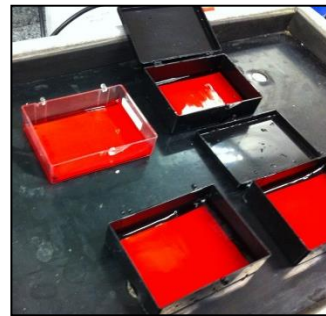
### Transferência das proteínas do gel para membrana



**Figura 1**



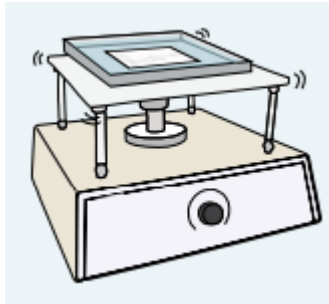
**Figura 2**



**Figura 3**

A transferência consiste na passagem das proteínas para uma membrana (**figuras 1 e 2**), nessa etapa também aplicamos uma corrente elétrica para que aja essa transferência. Para que possamos verificar se a transferência foi eficaz, coramos a membrana com o cornte *Ponceau* (**figura 3**).

### **+** Bloqueio da membrana



**Figura 1**

Essa etapa consiste em bloquear as ligações inespecíficas com uma solução de BSA (**figura 1**), antes de incubarmos com o anticorpo específico para a proteína que queremos detectar nas amostras.

### **+** Incubação com anticorpo primário e secundário



**Figura 1**

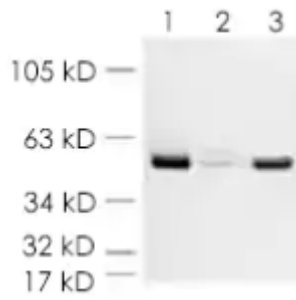


**Figura 2**

Primeiro incubamos com o anticorpo primário (anticorpo da proteína que queremos investigar) (**figura 1**) a proteína será identificada por meio de sua ligação com o anticorpo específico, em seguida, lavamos a membrana e incubamos com o anticorpo secundário (**figura 2**). O anticorpo secundário é marcado com um fluoróforo, quando o anticorpo secundário se liga ao anticorpo primário emite uma fluorescência, o qual é visualizado no aparelho e quantificado.

### **+** Revelação (análise dos resultados)

A análise dos resultados é a quantificação visualizada pelo aparelho (**figura 1**), que mostra qual dos pacientes tem a proteína ZZ mais expressa (a banda visualizada fica mais forte)



**Figura 1**

De acordo com nossa técnica utilizada, o indivíduo A – atleta de força tem a proteína ZZ mais expressa.