

Sep 03, 2023

DOT BLOT - DENGUE VIRUS

DOI

dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bp2l696jdlqe/v1



Delia Piedad Recalde-Reyes¹, Juliana Lopez Calderon²

¹Corporación Universitaria Empresarial Alexander von Humboldt;

²Corporacion Universitaria Empresarial Alexander von Humboldt

CUE Alexander von Hum...



Juliana Lopez Calderon

Corporacion Universitaria Empresarial Alexander von Humboldt

Create & collaborate more with a free account

Edit and publish protocols, collaborate in communities, share insights through comments, and track progress with run records.

Create free account

OPEN  ACCESS



DOI: <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: April 17, 2023

Last Modified: September 03, 2023

Protocol Integer ID: 80600

Keywords: de dengue serotipo, la que se deposita antígeno total, dot blot, detectado con anticuerpo igg anti, dengue, desarrollo de una prueba tipo western blot, western blot

Funders Acknowledgements:

Minciencias Convocatoria 917 de 2022

Grant ID: convocatoria 917 de 2022 Minciencias

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.



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

Troubleshooting

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

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 (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 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

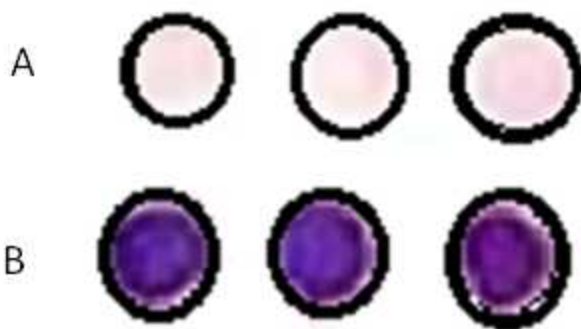


Figura 1. Resultados visuales Dot blot. A. Resultado negativo B. Resultado positivo

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.