ANEXO I - SOLUÇÕES

A – Para expansão dos hibridomas

Meio de cultura (solução-estoque)

Meio RPMI - Roswell Park Memorial Institute (Gibco, Invitrogen)	10,4 g
$NaHCO_3$	2 g
HEPES	4,68 g
Antibiótico/antimicótico (Gibco -100x)	10 mL
H_2O	1000 mL

Ajustar o pH para 7,4. Filtrar o meio em 0,22 µm no fluxo e depois acrescentar o antibiótico/antimicótico. Armazenar de 2ºC a 8ºC.

Meio de cultura para uso

Meio de cultura (solução-estoque)	90 mL
Soro fetal bovino (Gibco)	10 mL
L-glutamina (Gibco - 100x)	0,5 mL

Armazenar de 2ºC a 8ºC por no máximo 1 semana.

B - Para eletroforese em gel de poliacrilamida

30% acrilamida / 0,8% bisacrilamida (Solução A)

Acrilamida	30 g
N,N-metileno-bisacrilamida	0,8 g
H_2O	100 mL

Adicionar a água sobre a acrilamida e manter a solução a 56ºC coberta com filme de PVC transparente até dissolução completa. Filtrar a solução em 0,45 µm e guardar em frasco escuro. Armazenar de 2ºC a 8ºC por no máximo 4 meses.

Tris-HCl 1,5M, pH 8,8 / SDS (Solução B)

Tris(hidroximetil)aminometano	18,17 g
SDS 20%	2 mL
H_2O	100 mL

Adicionar 50 mL de água ao trizma e ajustar o pH para 8,8. Acrescentar o SDS, completar o volume e filtrar a solução em 0,45 µm. Armazenar de 2ºC a 8ºC.

Tris-HCl 0,5M, pH 6,8 / SDS (Solução C)

Tris(hidroximetil)aminometano	6,06 g
SDS 20%	2 mL
H_2O destilada	100 mL

Adicionar 50 mL de água ao trizma e ajustar o pH para 6,8. Acrescentar o SDS, completar o volume e filtrar a solução. Armazenar de 2ºC a 8ºC.

Cálculo para concentração em % do gel de separação

Solução A	x / 3 mL
Solução B	2,5 mL
H_2O destilada	(7,5 - x / 3) mL
Persulfato de amônia 10%	50 µL
TEMED	5 µL (10 µL se x menor que 8)

Onde x é a porcentagem de poliacrilamida

Persulfato de amônio 10% e TEMED devem ser colocados por último.

Gel de empilhamento

H_2O destilada	6,1 mL
Solução A	1,3 mL
Solução C	2,52 mL
Persulfato de amônia 10%	50 µL
TEMED	10 µL

Persulfato de amônio 10% e TEMED devem ser colocados por último.

Tampão de corrida 4X

Tris(hidroximetil)aminometano	12 g
Glicina	57 g
SDS	4 g
H_2O q.s.p.	1000 mL

Ajustar o pH para 8,8. Diluir 1:4 para uso.

Tampão de amostra 5X

Tris 1M pH 6,8	3,1 mL
Glicerol	5,0 mL
Azul de bromofenol 1%	0,5 mL
H_2O destilada	1,4 mL

Adicionar 10% de ß-mercaptoetanol no momento do uso.

Em condição desnaturante adicionar 1 mL de SDS 2%.

C – Para corar géis de eletroforese

Corante para gel de poliacrilamida com Comassie Blue

Metanol	30%
Ácido acético	10%
Comassie Blue G-250	0,5%
H_2O	59,5%

Deixar o gel 20 minutos submerso, sob homogeneização.

Descorante para gel corado com Comassie Blue

Metanol	30%
Ácido acético	10%
H_2O	60%

Descorar o gel até visualização das bandas

Coloração para gel de poliacrilamida por nitrato de prata

1ª solução:

40 mL de metanol

9,6 mL de ácido acético

30,4 mL de água destilada

40 µL de formol (colocar só na hora do uso)

tempo: 10 minutos ou overnight

lavar 3x com água destilada

2ª solução:

100 mL de etanol

100 mL de água destilada

dividir está solução em 3, para lavar 3 x de 10 minutos cada

lavar 3x com água destilada

3ª solução:

100 mL de água destilada

0,03g de tissulfito de sódio

tempo: 10 minutos

lavar 3x com água destilada

4ª solução:

100 mL de água destilada

0,2 g de nitrato de prata (AgNO3 – colocar só na hora do uso)

70 µL de formol (colocar só na hora do uso)

tempo: 10 minutos

lavar 3x com água destilada

5ª solução:

100 mL de água destilada

6 g de carbonato de sódio (NO_2CO_3)

50 µL de formol

tempo: revelação, assim que aparecerem as bandas, lavar o gel 3x com água destilada

6ª solução:

40 mL de metanol

9,6 mL de ácido acético

30,4 mL de água destilada

tempo: 5 minutos

lavar 3x com água destilada

Esta solução serve para bloquear a reação

7ª solução:

50 mL de metanol

50 mL de água destilada

tempo: 5 minutos para fixar e corar

Colocar água destilada e agitar para reidratar o gel por 5 a 10 minutos

Corante para gel de agarose

Ácido acético	5%
Corante negro de amido	0,1%

Corar o gel por aproximadamente 10 minutos e descorar com ácido acético 5% até visualização das bandas.

D - Para Western Blot

Tampão de transferência

Tris	3 g
Glicina	14,4 g
Metanol	200 mL
H_2O	1000 mL

Corante para membrana de nitrocelulose

Ponceau S	0,5 g
Ácido acético	0,1 mL
H2O	100 mL

E – Para purificação de LDL(-) e LDL(n)

Solução antioxidante e inibidora de proteases

BHT	44,06 mg
PMSF	1,742 g
Benzamidina	3,132 g
Aprotinina	20 mg
Metanol	50 mL

Armazenar a -20ºC protegida da luz.

Salinas para ultracentrifugação das lipoproteínas

Densidade	NaCl
1,006	11,45 g/L
1,020	31,56 g/L
1,065	101,83 g/L
1,216	75,82 g de NaBr (ou KBr) em q.s.p. 250 mL de salina de densidade 1,006

Ajustar o pH para 7,4

F – Para determinação de proteínas pelo método de Lowry

Tartarato alcalino

Na_2CO_3	20 g
tartarato de Na e K	1 g
NaOH 0,1N	4 g
H_2O	1000 mL

Sulfato de Cobre

$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	5 g
H_2O	1000 mL

Solução de uso: 1 parte de CuSO4 + 9 partes de tartarato alcalino (1:10)

Procedimento:

500 µL da solução de uso

25 µL de SDS a 4%

10 µL da amostra

Homogeneizar e deixar em repouso por 15 minutos

Adicionar 100 µL de Folin-Ciocalteau (diluído em água destilada 1:3), homogeneizar suavemente e deixar em repouso por 30 minutos, protegido da luz. Leitura em espectrofotômetro a 620 nm.

G – Para ELISA

PBS 10x

NaCl	81,82 g
KCl	1,89 g
KH_2PO_4	1,91g
$Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$	28,62 g
H_2O	q.s.p. 1000 mL

Ajustar o pH para 7,4

PBS tween 0,05%

PBS 1x	1000 mL
Tween 20	0,5 mL

PBS tween 0,01%, leite 2%

PBS 1x	100 mL
Tween 20	0,01 mL
Leite desnatado	2 g

Aquecer até 100℃, esfriar e filtrar em gaze 11 fios.

PBS tween 0,01%, leite 5%

PBS 1x	100 mL
Tween 20	0,01 mL
Leite desnatado	5 g

Aquecer até 100℃, esfriar e filtrar em gaze 11 fios

Tampão carbonato-bicarbonato

Na_2CO_3	0,795 g
$NaHCO_3$	1,465 g
H_2O	500 mL

Ajustar o pH para 9,6

Tampão citrato-fosfato

$Na_2HPO_4 . 12H_2O$	3,68 g
Ácido cítrico	1,16 g
H_2O	200 mL

Ajustar o pH para 5,3

Solução para OPD

Tampão citrato-fosfato	5 mL
H_2O_2 30%	5 µL
OPD	5 mg

Usar imediatamente após o preparo.

Solução de parada para OPD (H_2SO_4 2 M)

H_2SO_4	53,3 mL
H_2O	446,7 mL

Solução de parada para TMB (H_2SO_4 0,5 M)

Solução de parada para OPD	125 mL
H_2O	375 mL

H – Para clonagem molecular, expressão e purificação da proteína recombinante

Meio LB (Luria-Bertani)

NaCl	10 g
Triptona/peptona	10 g
Extrato de levedura	5 g
H_2O q.s.p.	1000 mL

Ajustar o pH para 7,0 e autoclavar.

LB ágar

Meio LB	300 mL
ágar	4,5 g

Autoclavar

TFB (*Transformation buffer*)

KCl	0,745 g
$CaCl_2 . 2H_2O$	0,730 g
Glicerol	10 g
Acetato de potássio	0,098 g
H_2O	100 mL

Autoclavar

Tampão para lise bacteriana

NaH_2PO_4	2,4 g
NaCl	11,69 g
H_2O q.s.p.	1000 mL

Ajustar o pH para 7,4 e no momento do uso adicionar 1 mM PMSF, 5 mM EDTA e 150 µg/mL lisozima.

Tampão para solubilização de corpos de inclusão

NaH_2PO_4	0,24 g
NaCl	1,17 g
Uréia	42,04 g
Imidazol	0,2 g
H_2O q.s.p.	100 mL

Ajustar o pH para 7,4.