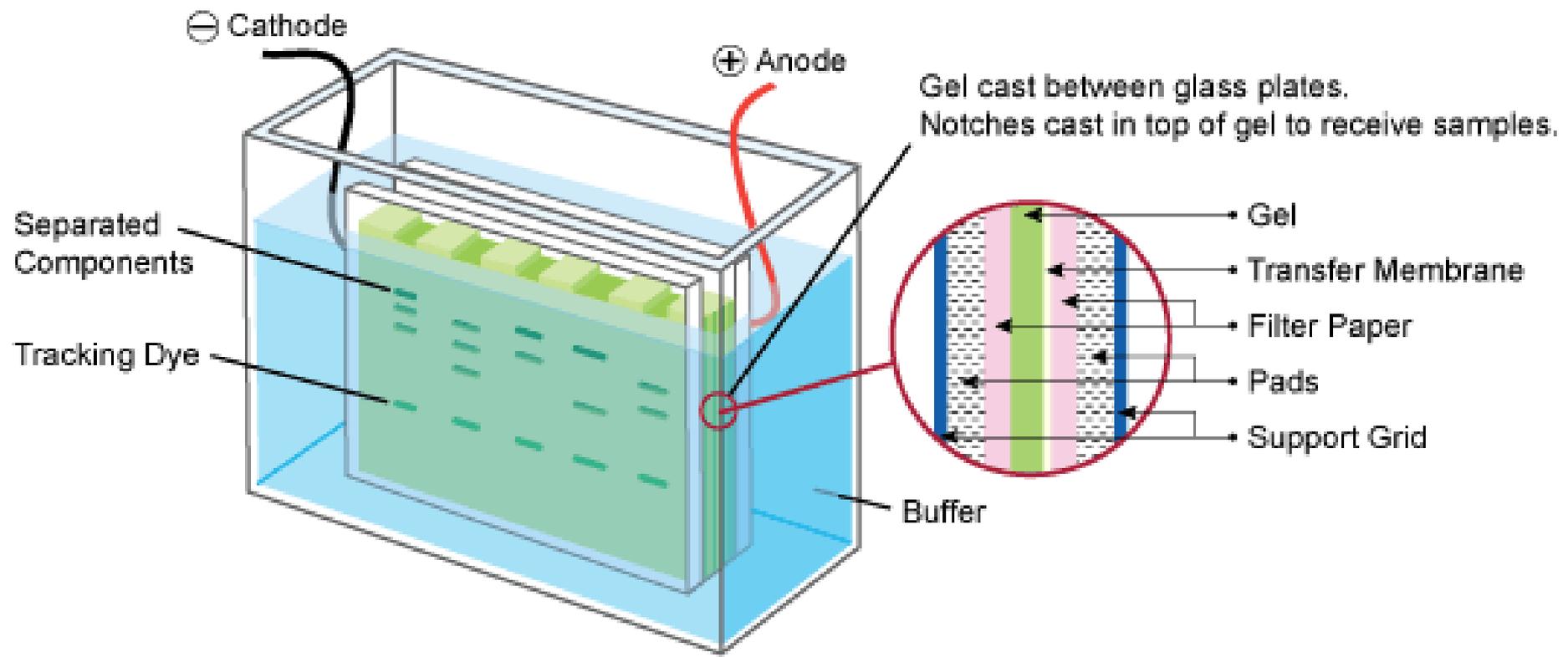


WESTERN BLOT o IMMUNOFISSAZIONE

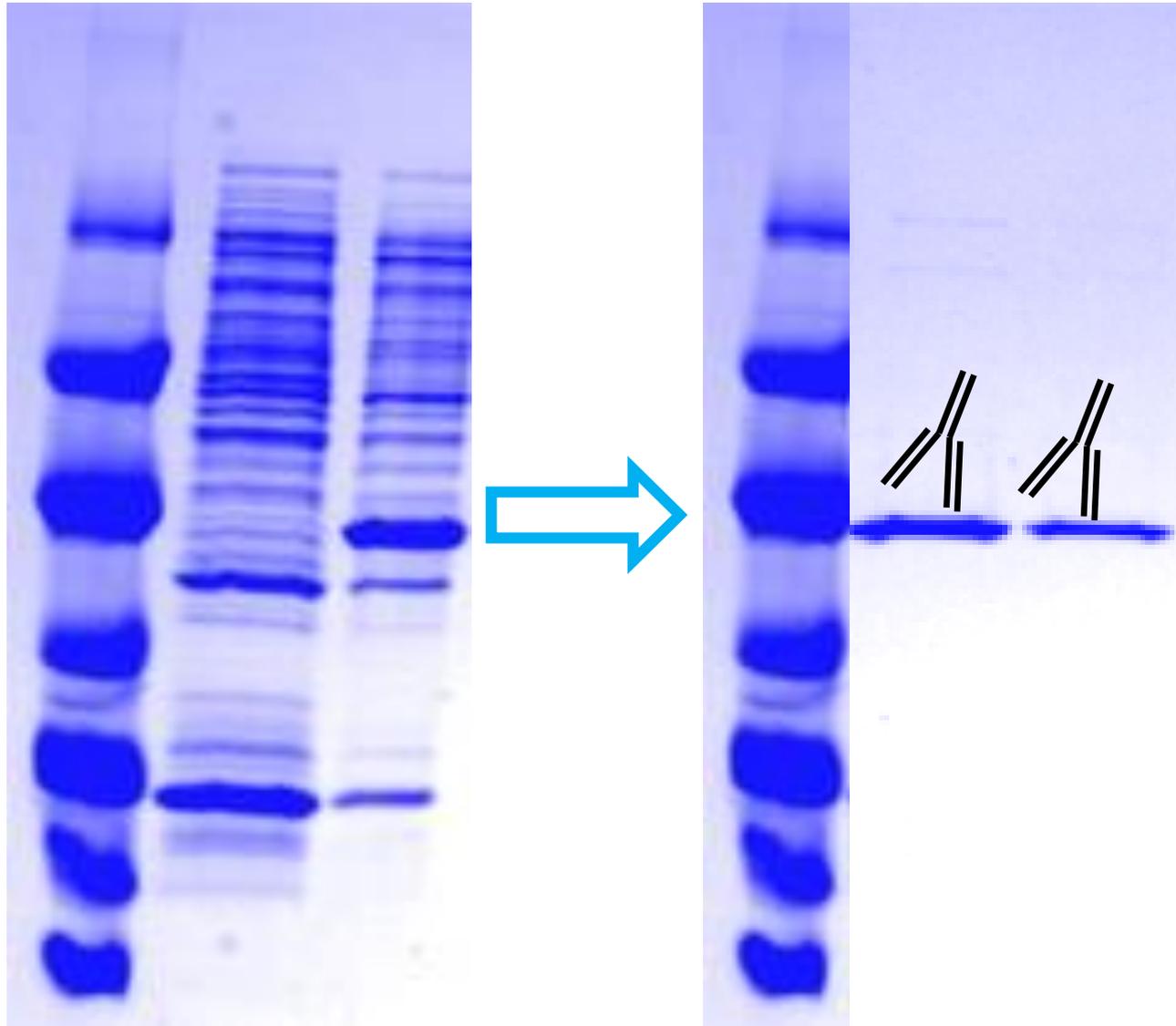


BLOTTING

Trasferimento di macromolecole su una membrana immobilizzante.

- Southern DNA
- da Edward Southern 1970
- Northern RNA
- Western Proteine

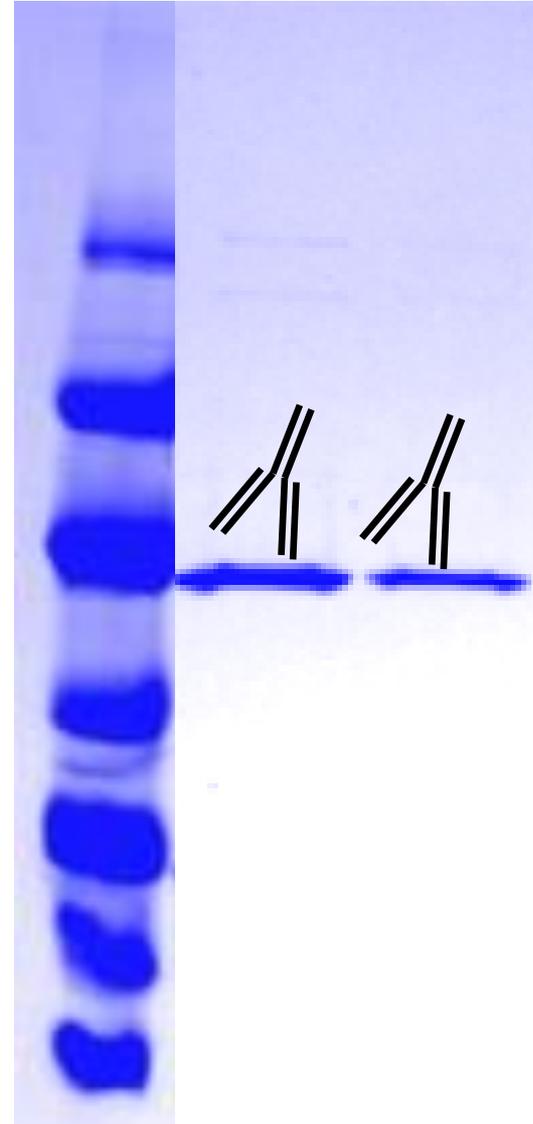
SCOPO DEL WESTERN BLOTTING



Consente la ricerca dell'ago nel pagliaio!

SCOPO DEL WESTERN BLOTTING

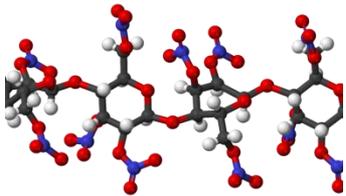
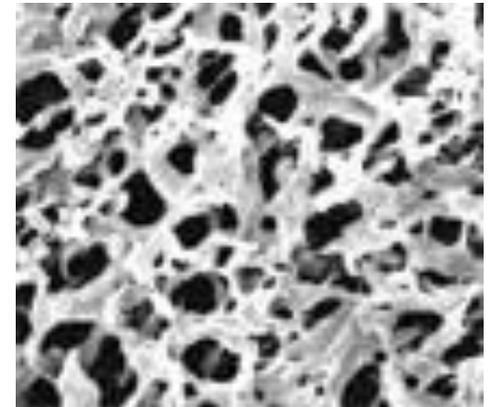
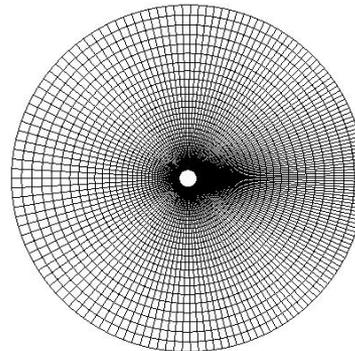
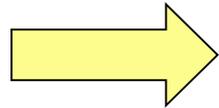
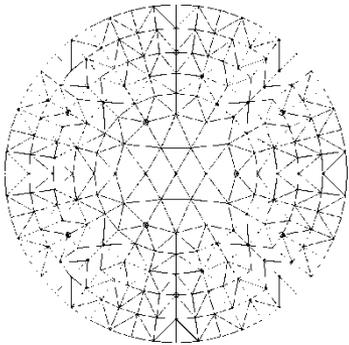
Perché non si
addiziona l'Ab
direttamente al gel?



Consente la ricerca dell'ago nel pagliaio!

WESTERN BLOTTING (WB) MEMBRANE

Trasferimento su **membrana** immobilizzanti per rendere più accessibile la proteina (Ag) all'anticorpo (Ab).

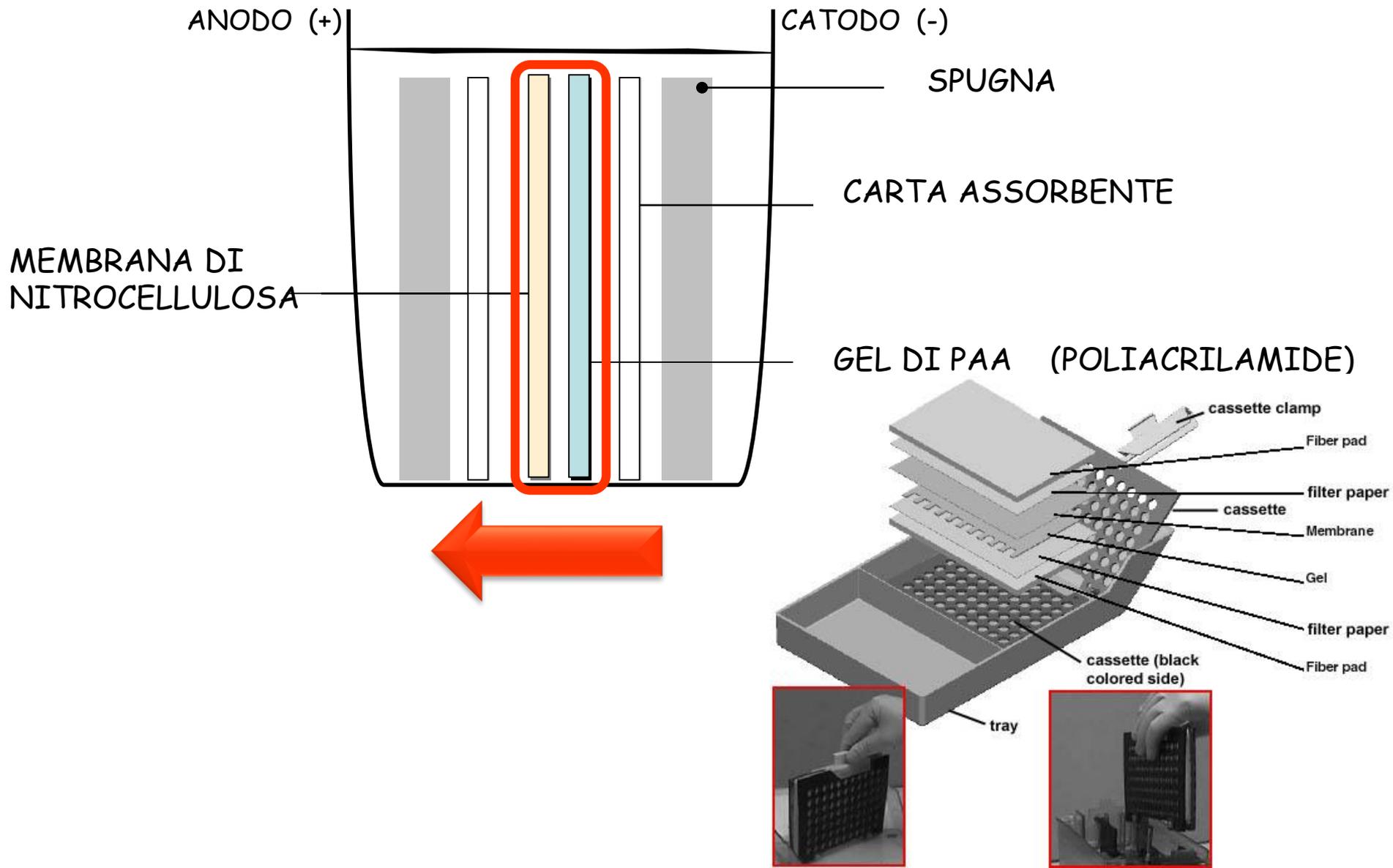


Nitrocellulosa

PVDF

Nylon

FASE DI TRASFERIMENTO (BLOTTING) ELETTROBLOTTING



STRUMENTI PER L'ELETTROBLOTTING

Generatore di DDP



Perché una vaschetta di ghiaccio?



Sistema elettroforetico



Esempio di separazione elettroforetica di proteine per SDS-PAGE (Western Blotting)

Ordine campioni:

- 1) Marker,
- 2) BSA 0.78 μM ,
- 3) 1.56 μM ,
- 4) 3.12 μM ,
- 5) 6.25 μM ,
- 6) 12.5 μM ,
- 7) 25 μM ,
- 8) 0,
- 9) 50 μM (33 μg in 10 μL)
- 10) 0.

Colorazione con **Ponceau S**.



Volume di caricamento: 10 - 25 μL .

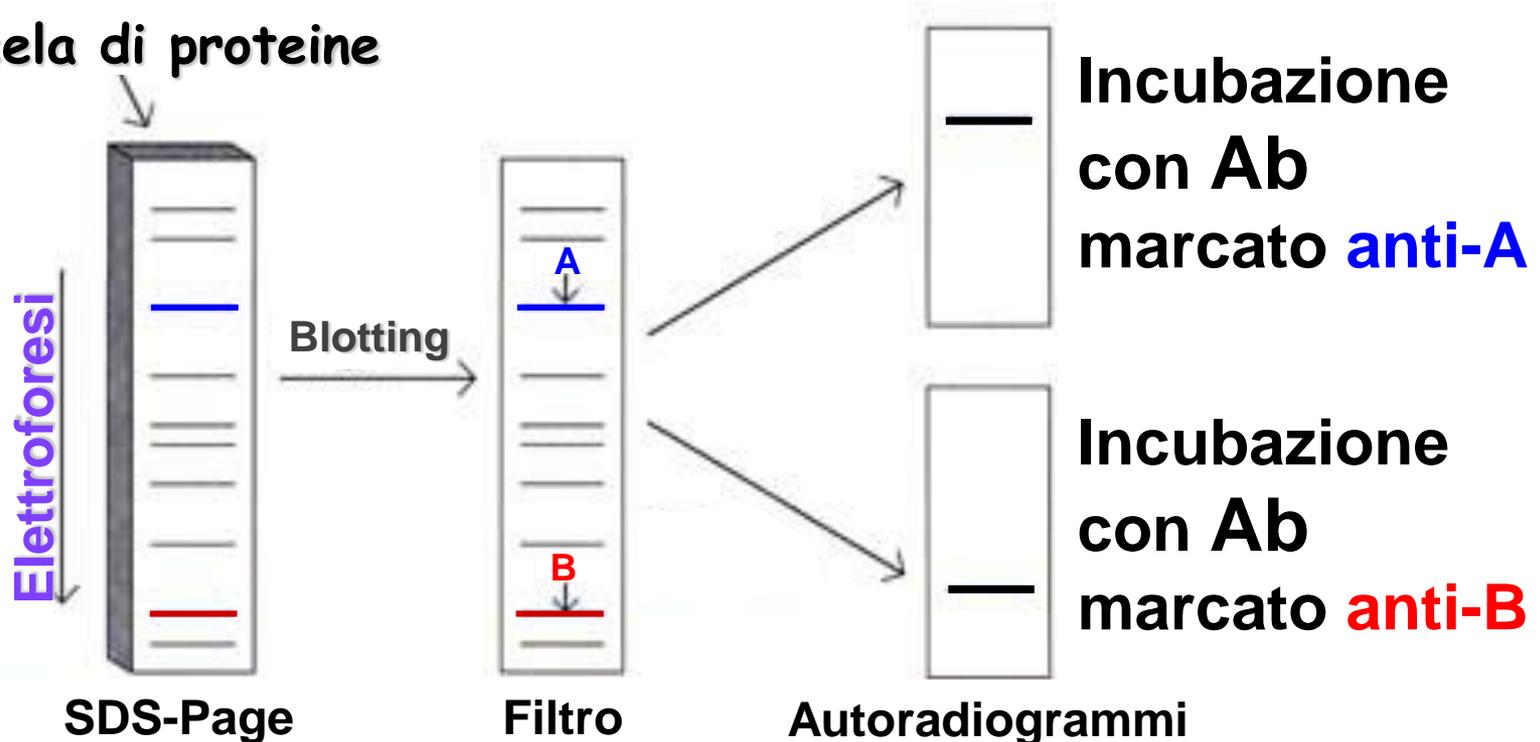
- Corsa: 0.1 A fino a max 200 Volt, 120 min.
- Trasferimento: 0.45 A, 100 Volt 120 min.

WESTERN BLOTTING (WB)

Questo sistema unisce:

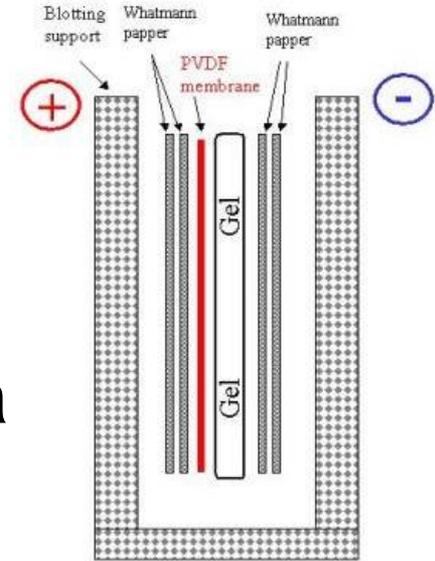
- La **risoluzione** delle separazioni elettroforetiche
- La **sensibilità** delle rivelazioni immunochimiche

Miscela di proteine



STEP SPERIMENTALI

- Preparazione del campione
- Separazione elettroforetica
- **Trasferimento** delle proteine dal gel alla membrana immobilizzante, tramite un campo elettrico perpendicolare.



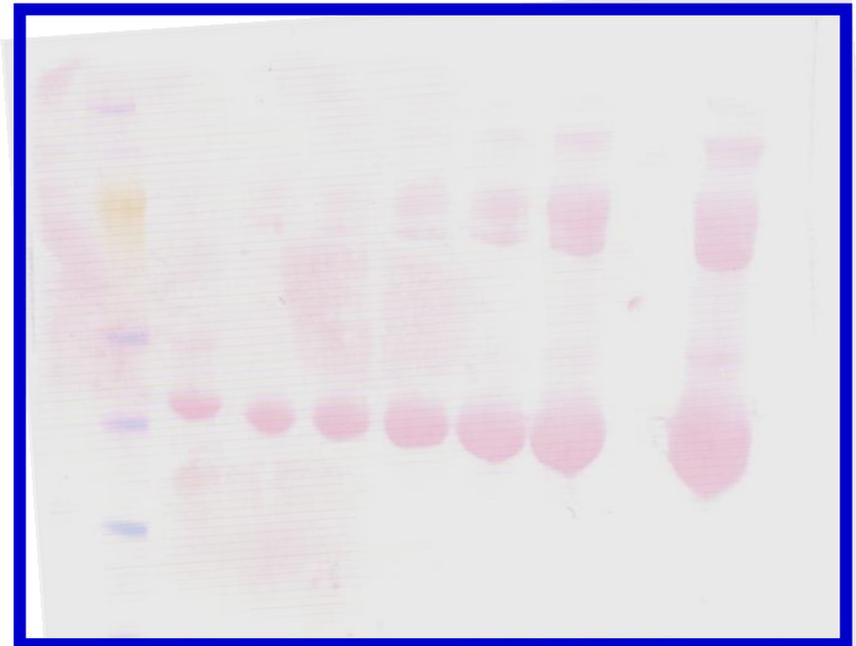
Tampone di trasferimento:

Tris 25 mM

Glicina 190 mM

SDS 1%

Metanolo 20%



STEP SPERIMENTALI

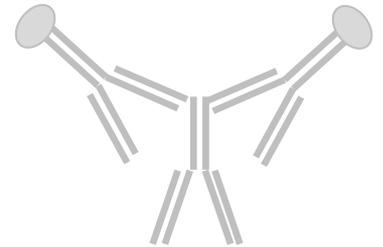
- **Saturazione** della membrana con una soluzione proteica (BSA o caseina del latte)



- Aggiunta dell' **anticorpo 1^{ario}** specifico e lavaggio dell'eccesso



- Aggiunta dell' **anticorpo 2^{ario} marcato** (meno specifico) e lavaggio dell'eccesso



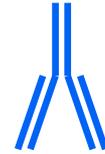
- **Rivelazione** (dipende dal tipo di marcatura)

STEP SPERIMENTALI

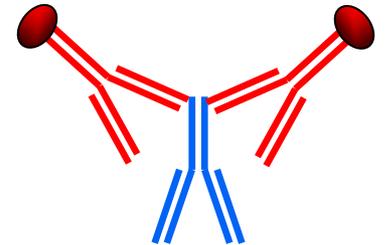
- **Saturazione** della membrana con una soluzione proteica (BSA o caseina del latte)



- Aggiunta dell' **anticorpo 1^{ario}** specifico e lavaggio dell'eccesso



- Aggiunta dell' **anticorpo 2^{ario} marcato** (meno specifico) e lavaggio dell'eccesso

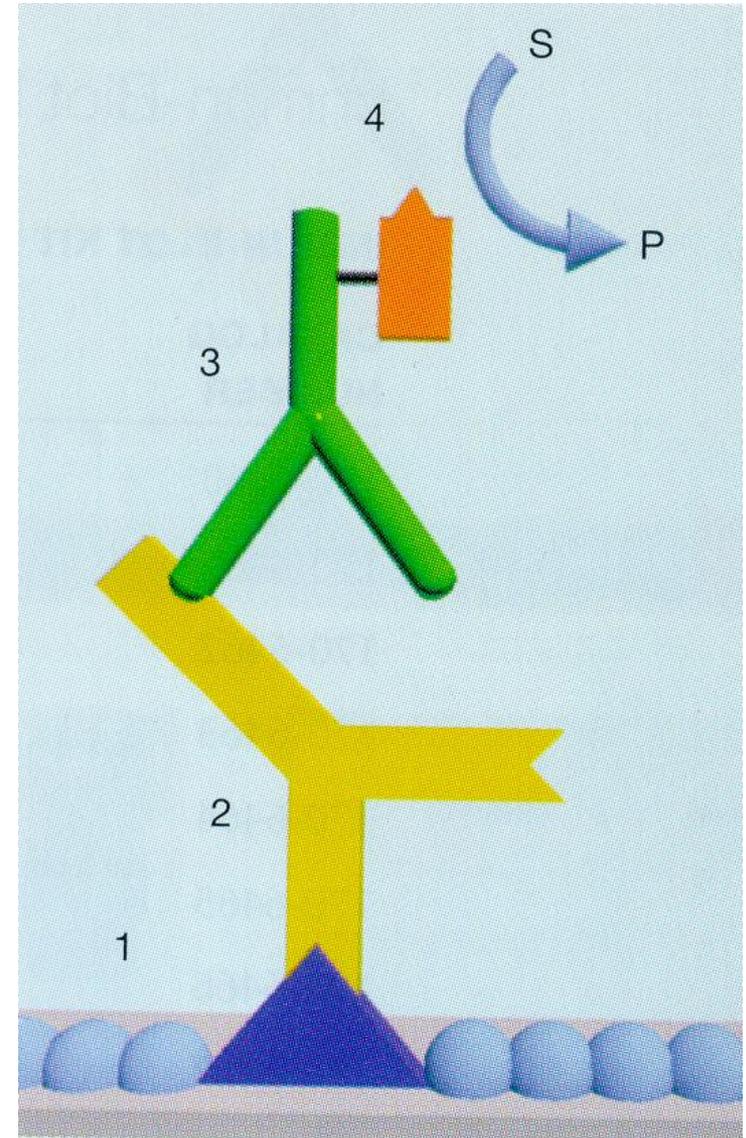


- **Rivelazione** (dipende dal tipo di marcatura)

AZIONE DEGLI ANTICORPI NEL WB

1. Antigene proteico.
2. Anticorpo **1^{ario}** (specifico).
3. Anticorpo **2^{ario} marcato**.
4. **Enzima** marcatore.

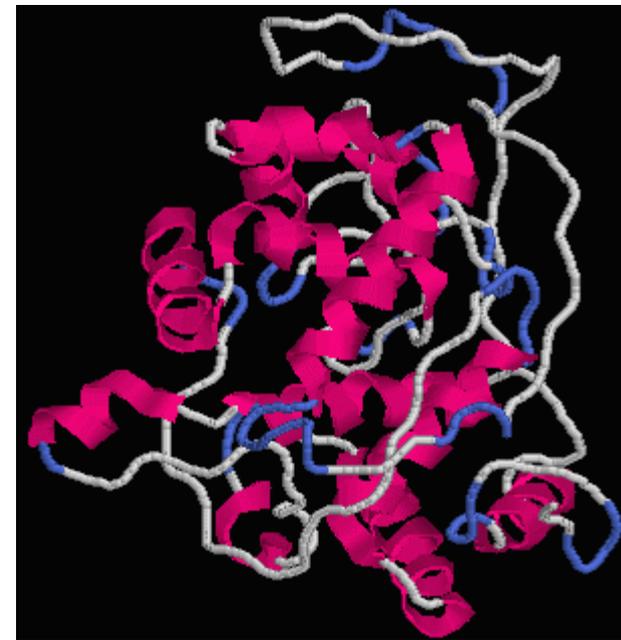
$S \longrightarrow P$: substrato per l'enzima, convertito in un prodotto **rilevabile**.



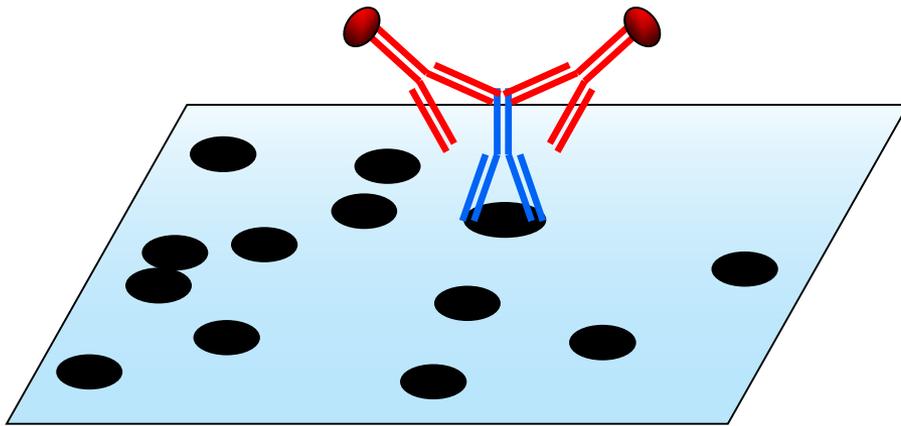


Perossidasi di rafano

(Horseradish- HRP)



RIVELAZIONE NEL WESTERN BLOTTING



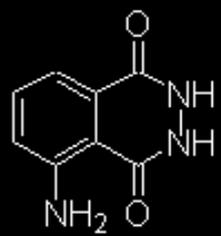
● **Perossidasi** = usando H_2O_2 come substrato, **ossida** il

3-N-9-etilcarbazo

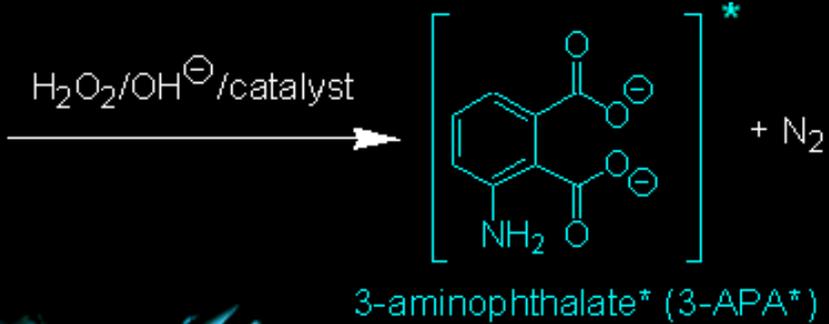
a prodotto insolubile e **marrone**.

Consente la visualizzazione dell'ago nel pagliaio!





luminol



3-APA + LIGHT

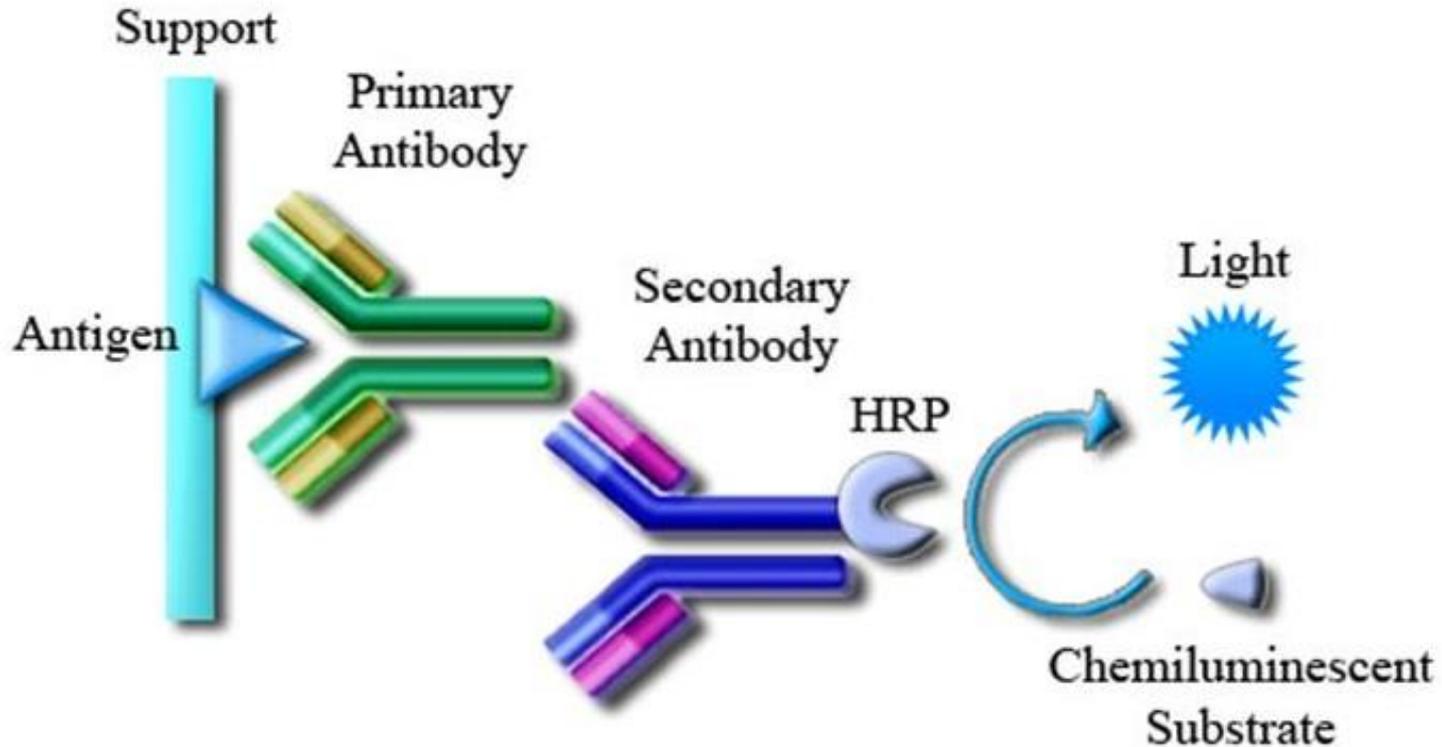
Luminolo



ECL (Enhanced ChemiLuminescence)

Enzima marcatore = Perossidasi (HRP)

Substrato = **Luminolo**

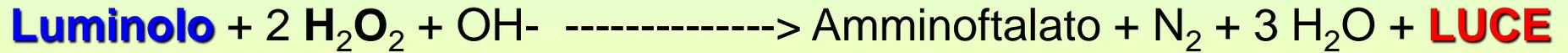


In presenza di perossidasi e H_2O_2 il luminolo viene **ossidato**: si produce **luce**, la cui intensità può esser aumentata di 1000 volte con un intensificatore chimico.

REAZIONE DEL LUMINOLO

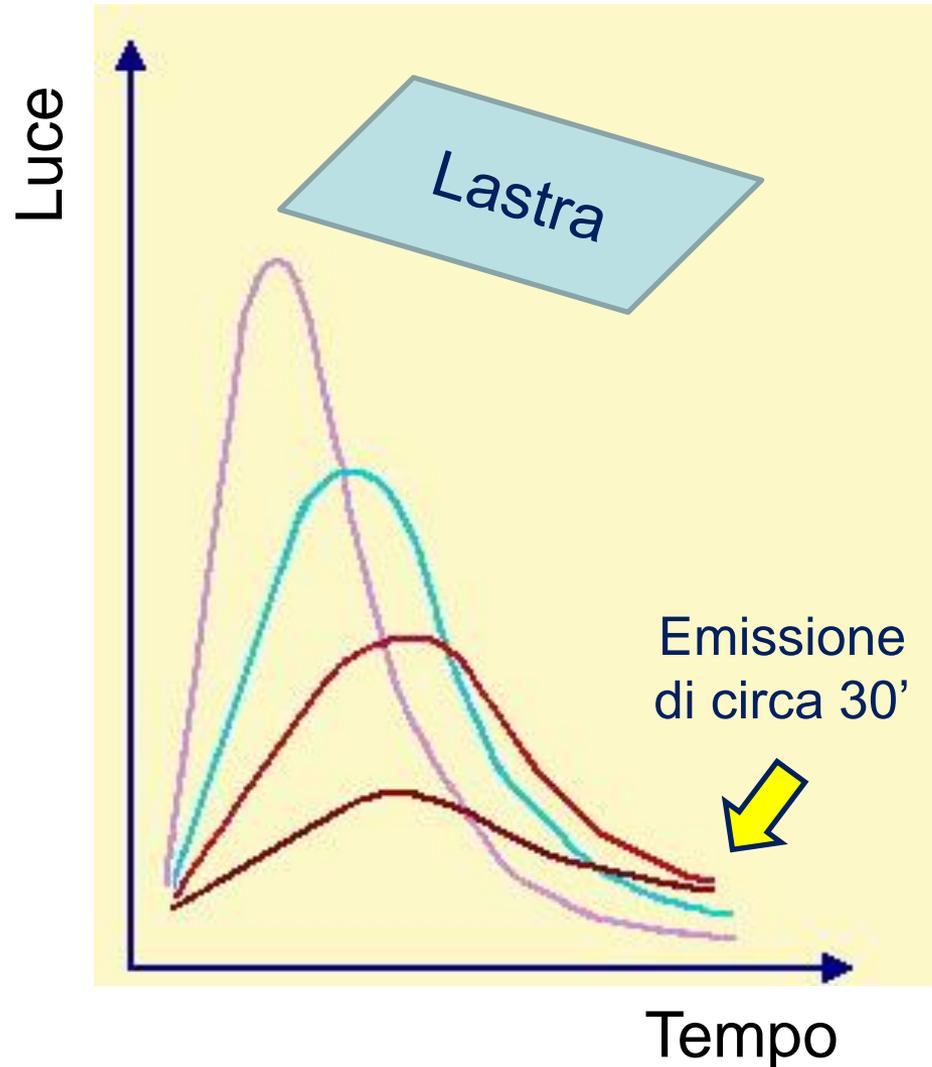
Il luminolo può dar reazioni chemiluminescenti ad alta efficienza.

Perossidasi

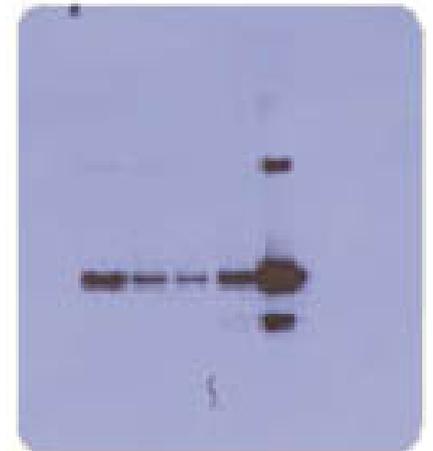


Il meccanismo esatto della reazione non è ancora stato completamente chiarito; il luminolo reagisce con un ossidante in presenza di un catalizzatore (**perossidasi**, microperossidasi Fe(CN)) per formare un intermedio (idroperossido o ciclo perossido). Questo si decompone nello **ione amminoftalato**, in uno stato elettronicamente eccitato, che decade allo stato fondamentale con emissione di luce bluastra (425 nm).

RIVELAZIONE NEL WESTERN BLOTTING



Il substrato metabolizzato dalla perossidasi **emette luce** che impressiona una **lastra**.



ESPOSIZIONE DELLE LASTRE



Dark room



Sviluppo e
fissaggio

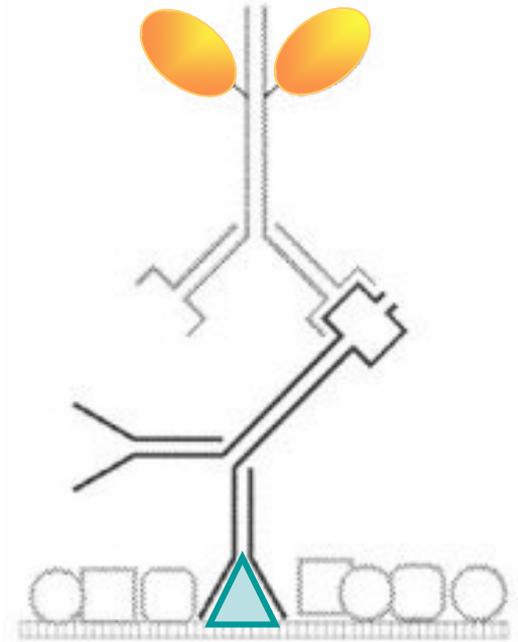
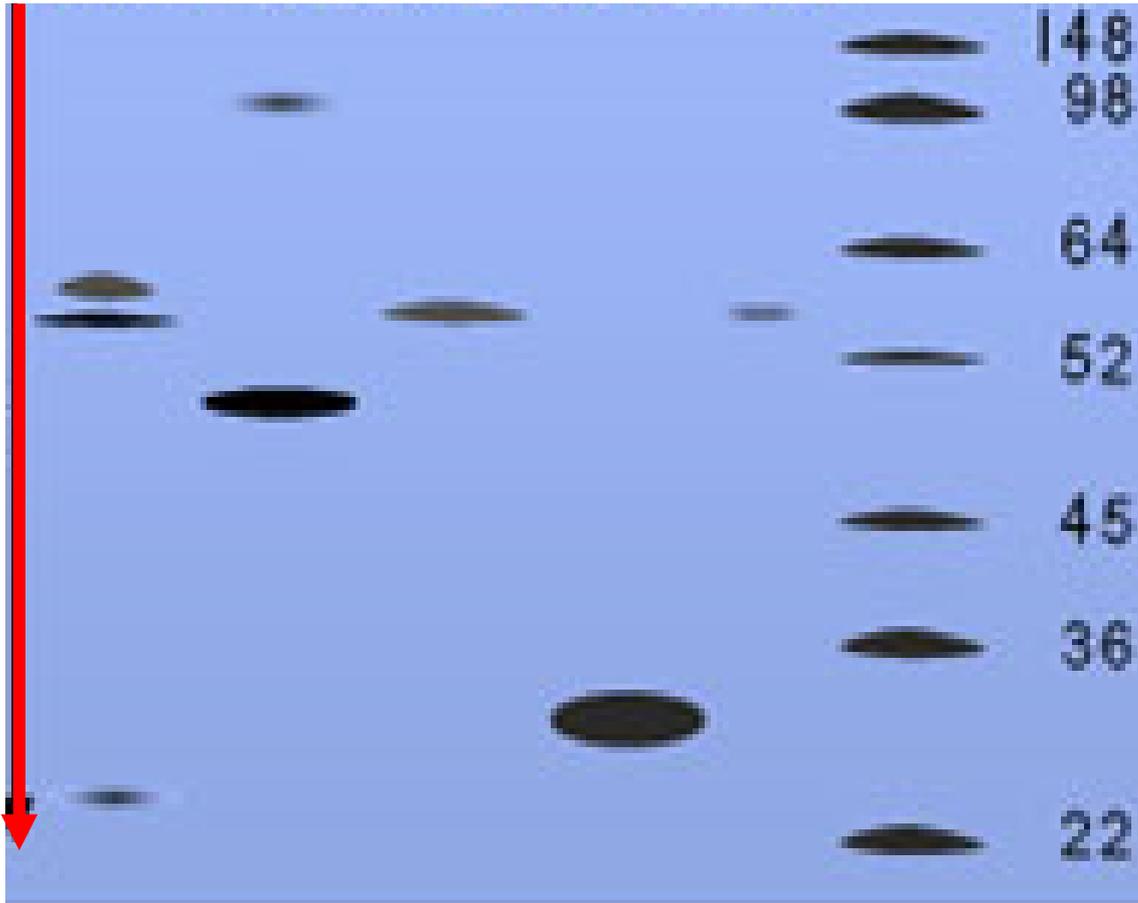
Esposizione manuale



Sviluppatrice



RISULTATO DI UN WB



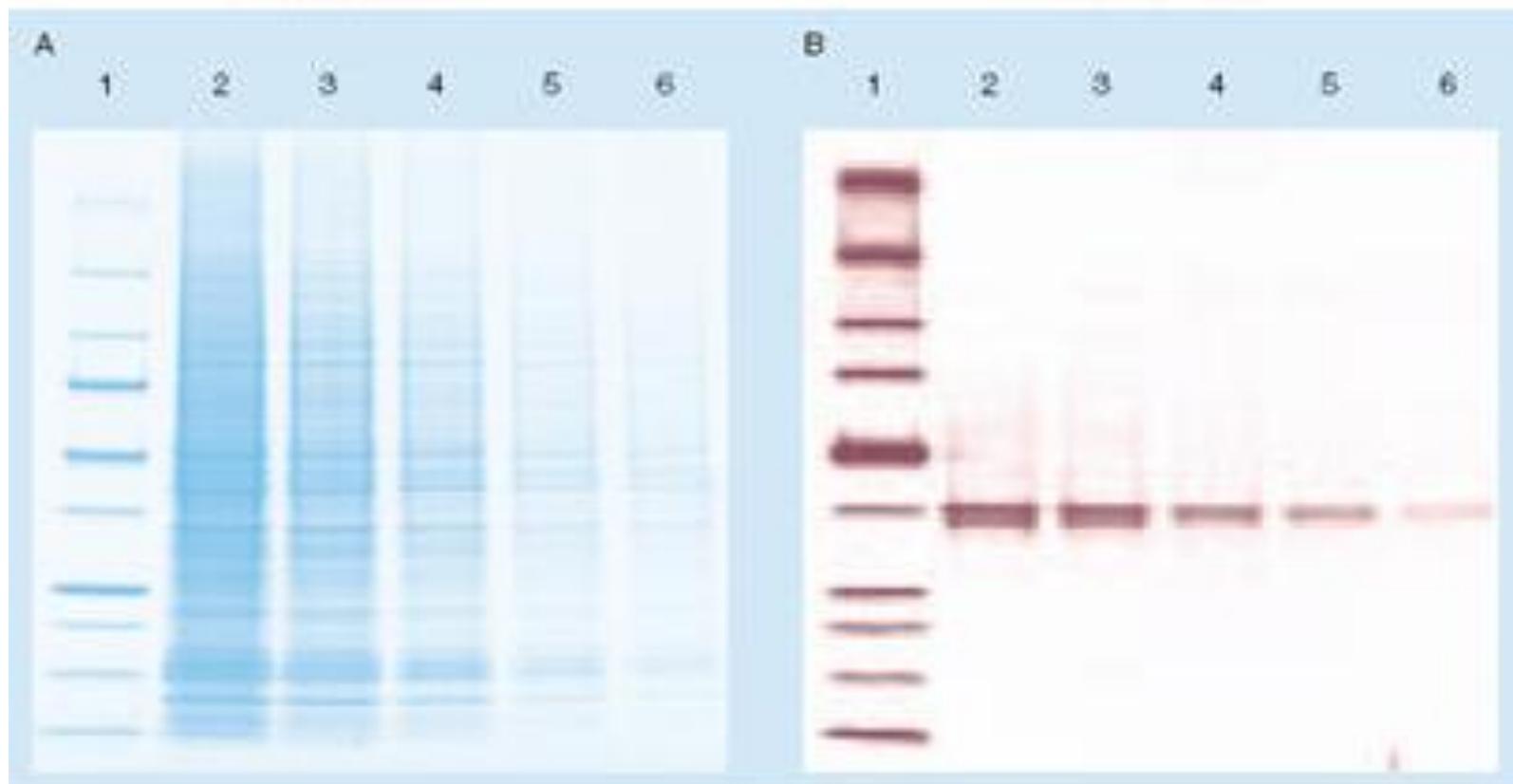
Da cosa dipende l'intensità delle bande?

Cosa c'è di troppo?

CONFRONTO SDS-PAGE E WESTERN BLOT

SDS-PAGE

Western Blot



OTTIMIZZAZIONE

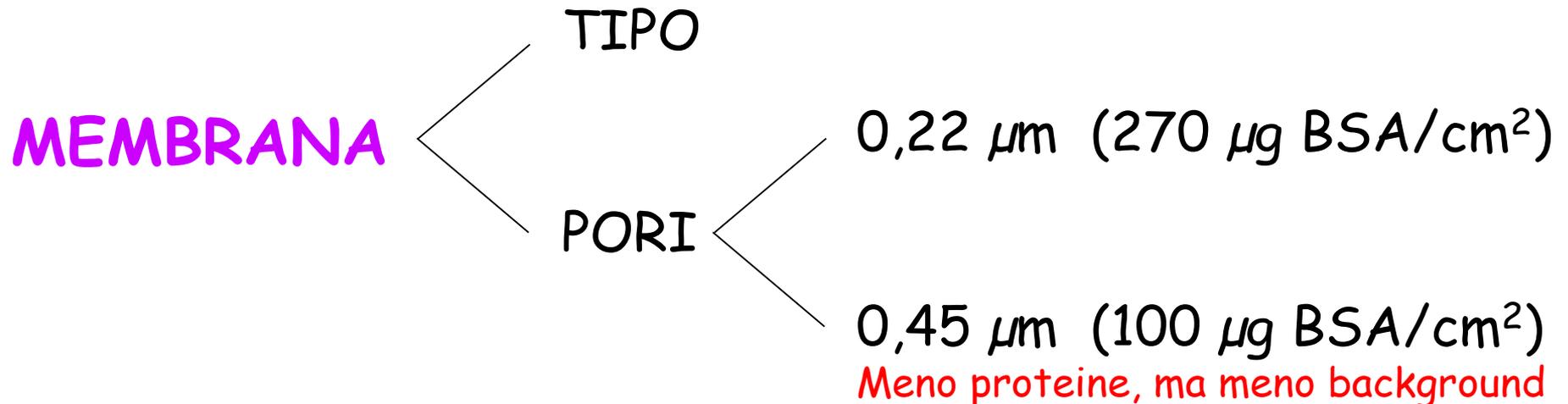
OTTIMIZZARE UN WESTERN BLOT

- TRASFERIMENTO -

SDS = agisce sulla proteina

METANOLO = agisce sulla membrana

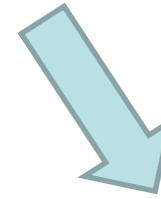
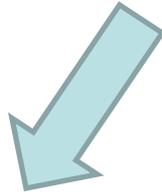
DURATA DEL BLOT



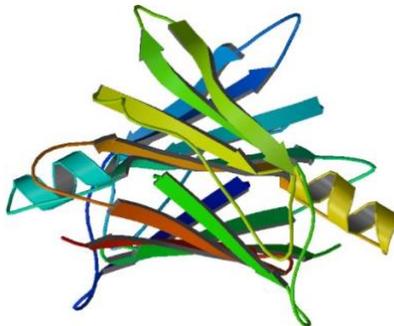
COLLI DI BOTTIGLIA DI UN WB

Cosa limita
un WB?

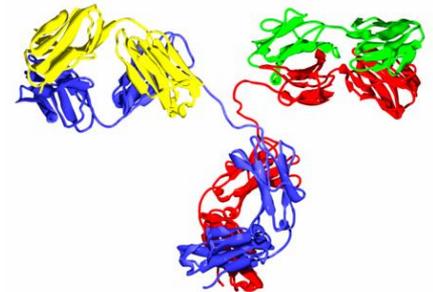
- Concentrazione delle proteine
- Rimozione contaminanti



Quantità e
qualità del
campione



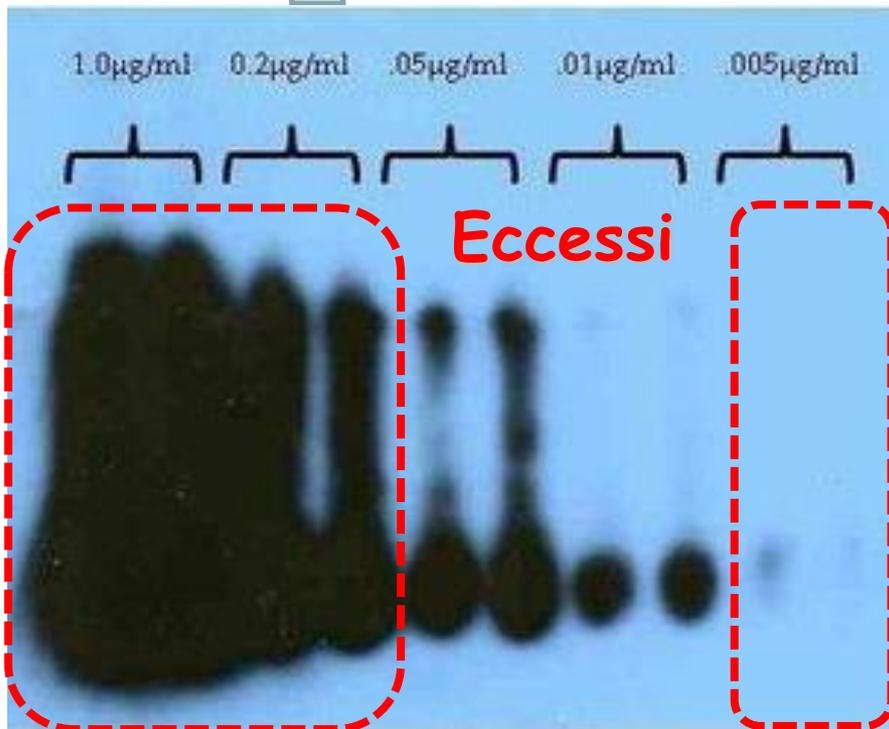
Qualità e
quantità
dell'anticorpo



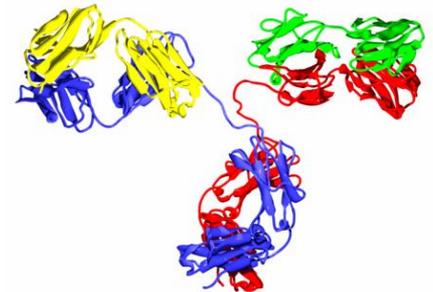
COLLI DI BOTTIGLIA DI UN WB

- Concentrazione delle proteine
- Rimozione contaminanti

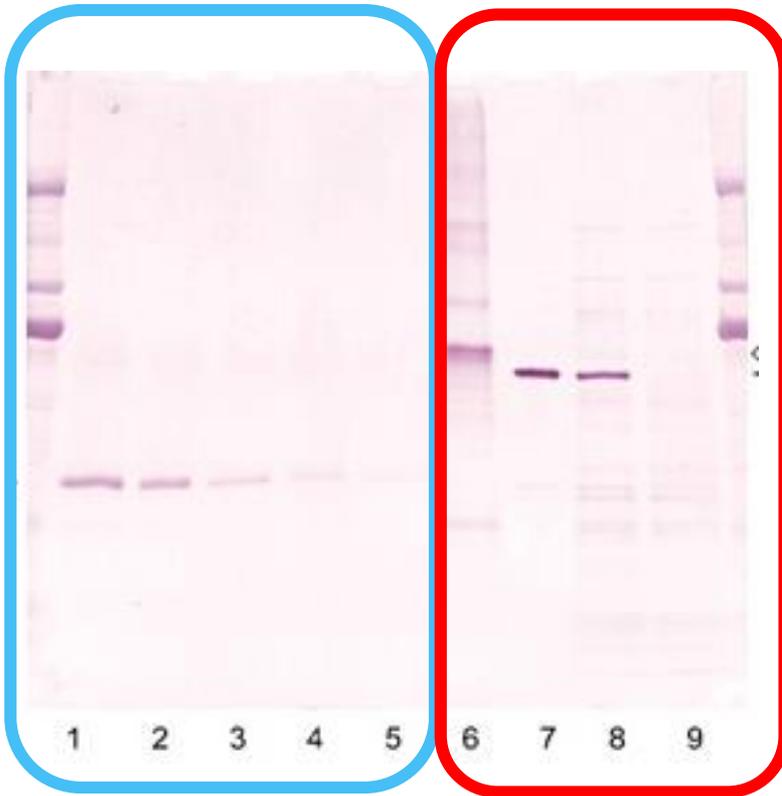
Cosa limita un WB?



Qualità e quantità dell'anticorpo

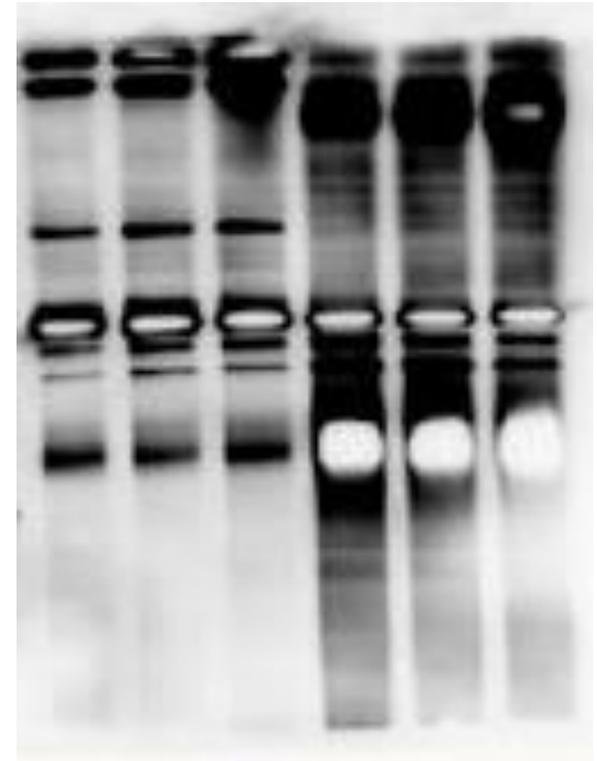


OTTIMIZZAZIONE DEGLI ANTICORPI



Buono

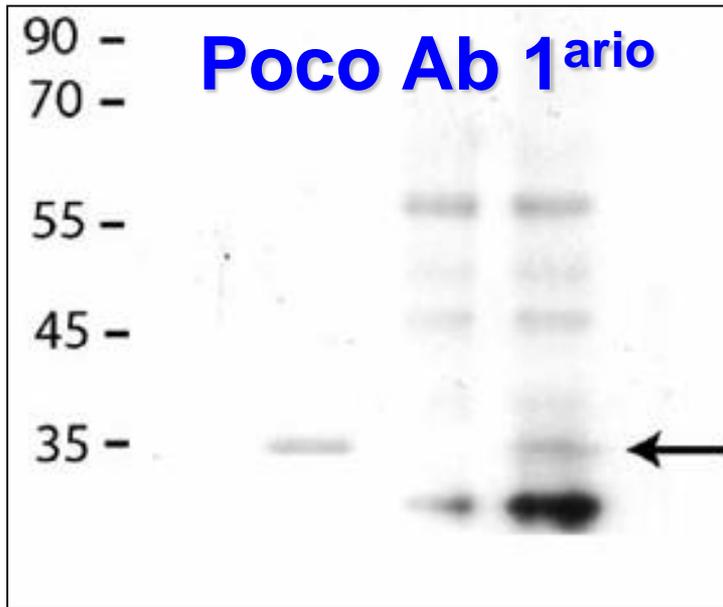
Migliorabile



Tutto da rifare!

OTTIMIZZAZIONE DEGLI ANTICORPI

Cross reazione



Ag frammentato

Ab 2^{ario} 1/100



Ab 2^{ario} 1/300



Ab 2^{ario} 1/1000



ECCESSO DI Ab 2^{ario}

OTTIMIZZAZIONE DELLA RILEVAZIONE

TEMPI DI ESPOSIZIONE

300 60 20 10 0s



SOSTITUIRE L'ENZIMA CONIUGATO ALL' Ab

SUBSTRATI CON SENSIBILITA' DIVERSA

1 minute exposure

50 ng → 3 pg

Thermo Scientific
SuperSignal West Pico
Substrate



5 minute exposure

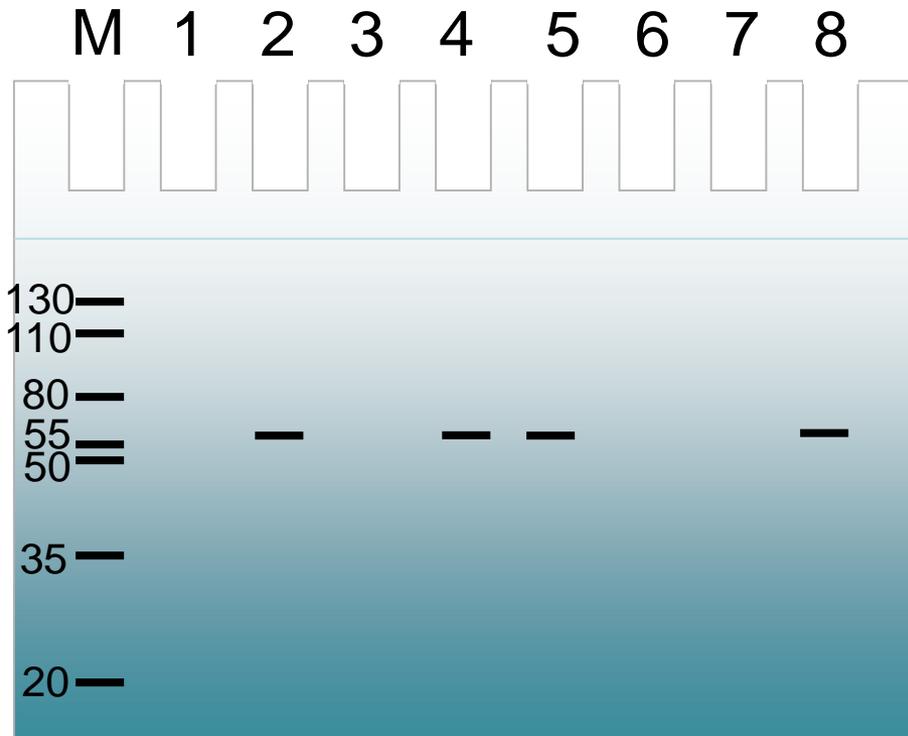
50 ng → 3 pg

GE Healthcare
Amersham ECL
Substrate



ESEMPI DI WB

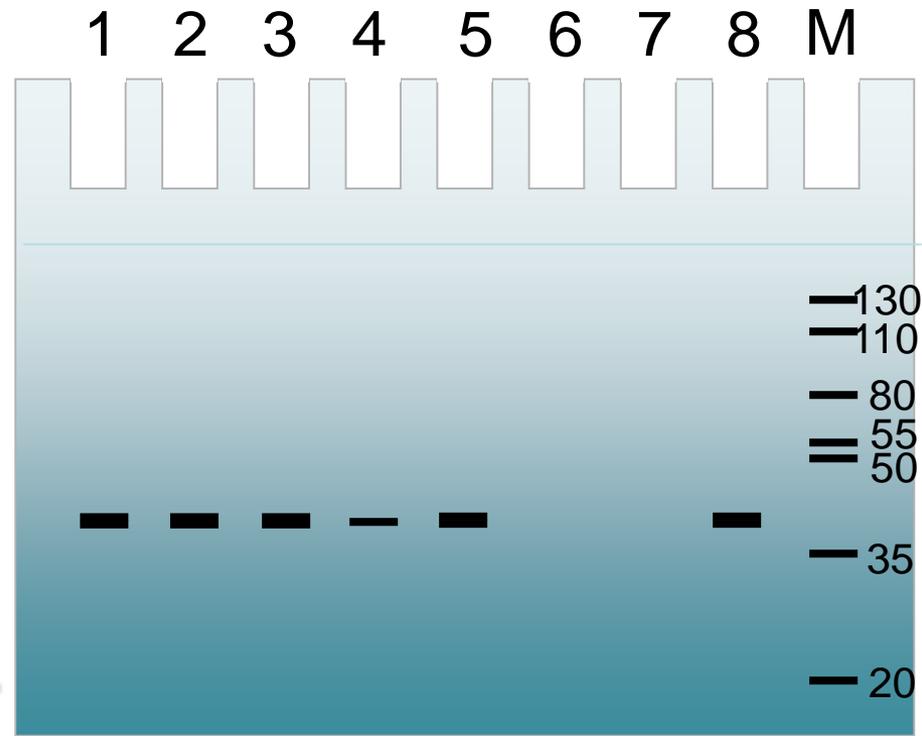
Dove si trovano le bande attese per i campioni?



Banda attesa 60 kDa

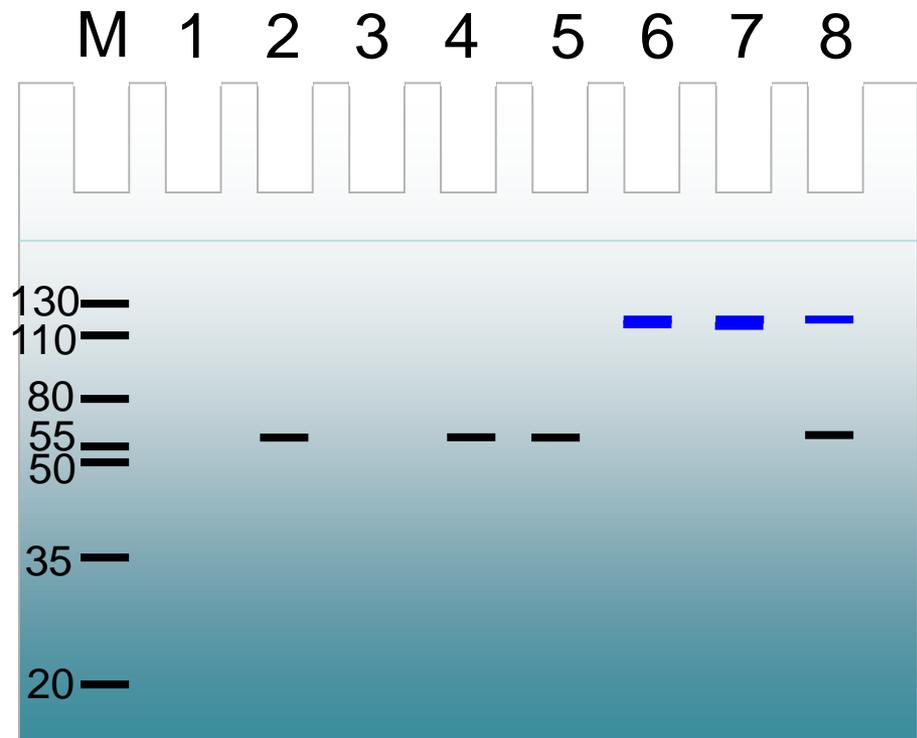
-

+



Banda attesa 40 kDa

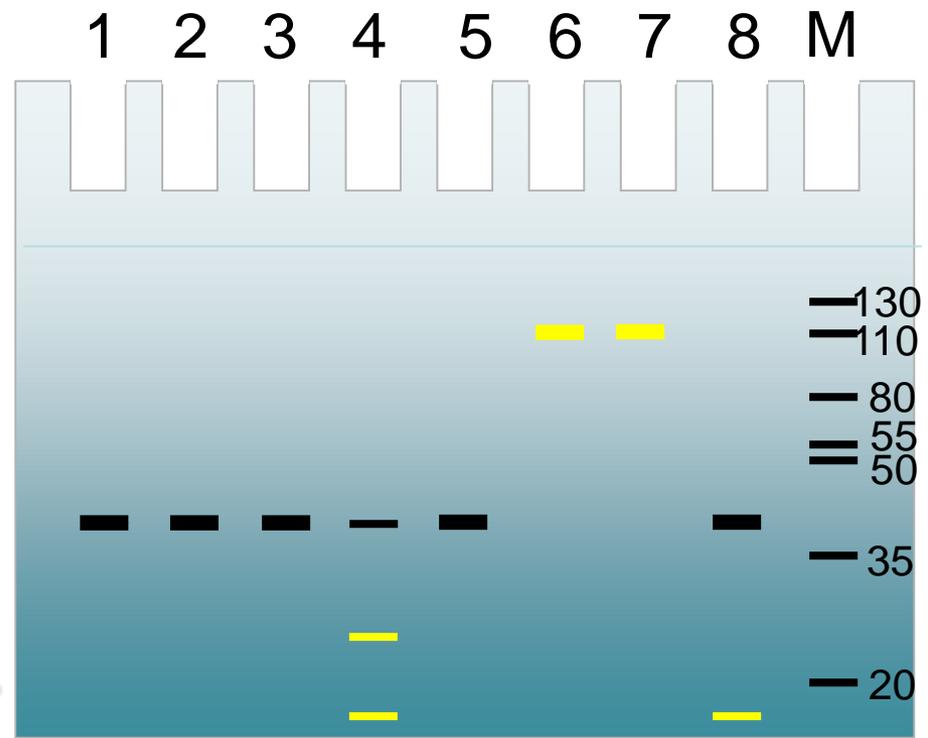
ESEMPI DI WB



Banda attesa 60 kDa

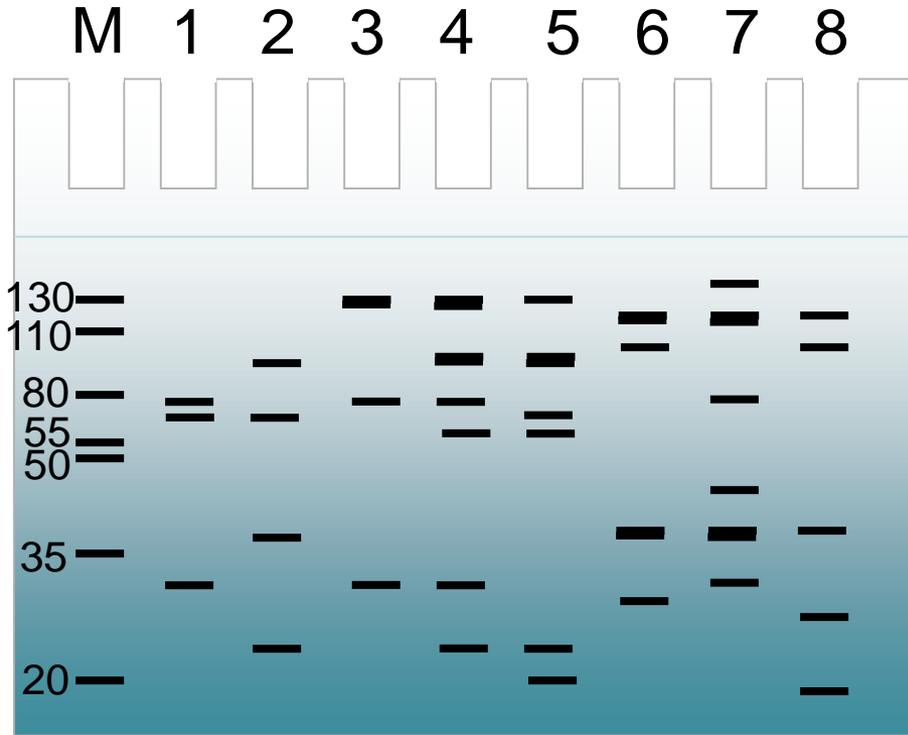
-

+



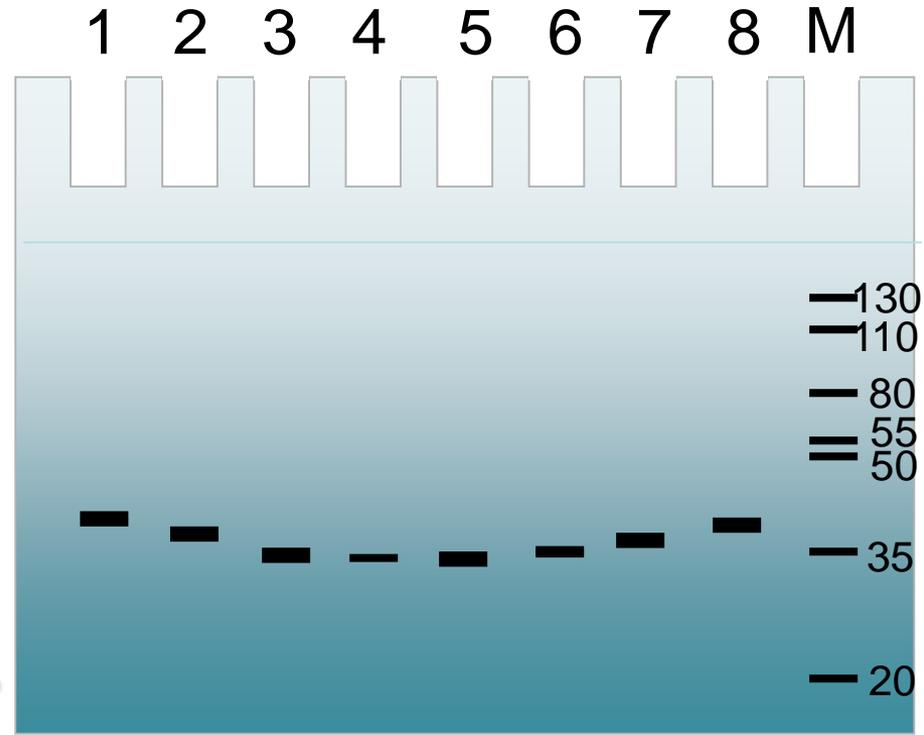
Banda attesa 40 kDa

ESEMPI DI WB



Banda attesa 50 kDa

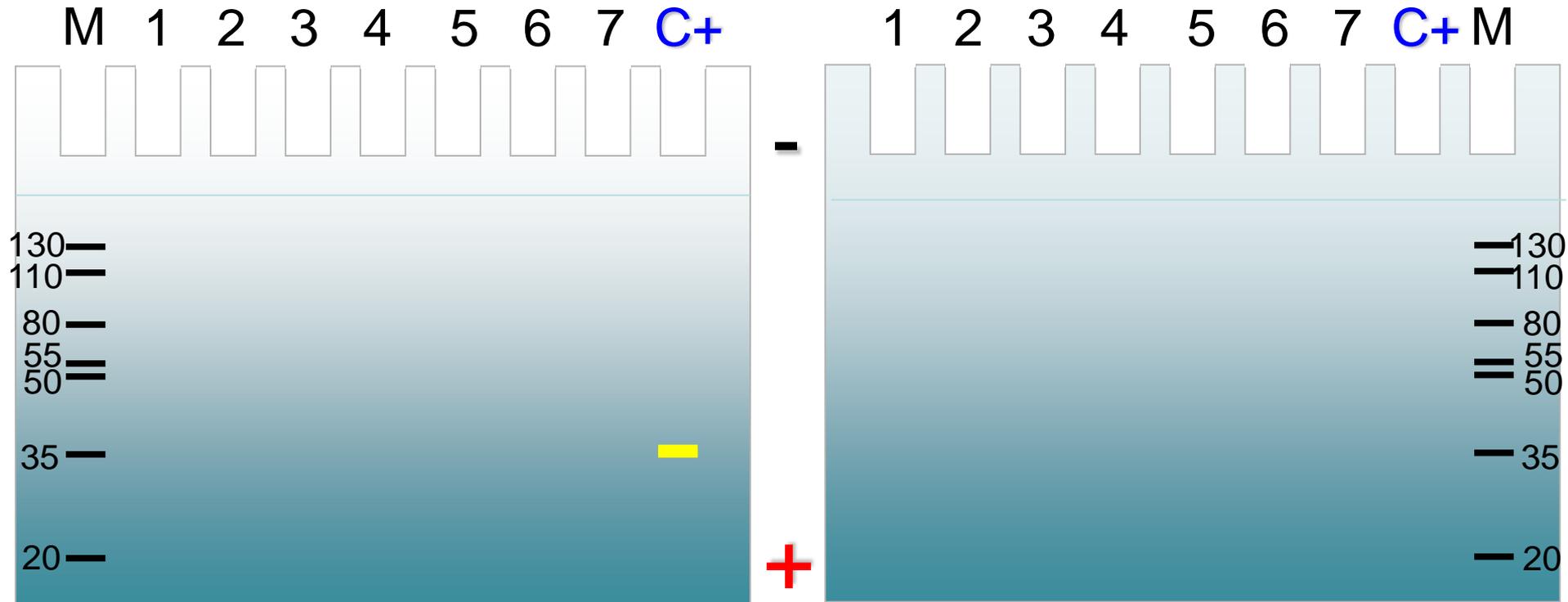
-



Banda attesa 40 kDa

+

NECESSITA' DI UN CONTROLLO POSITIVO

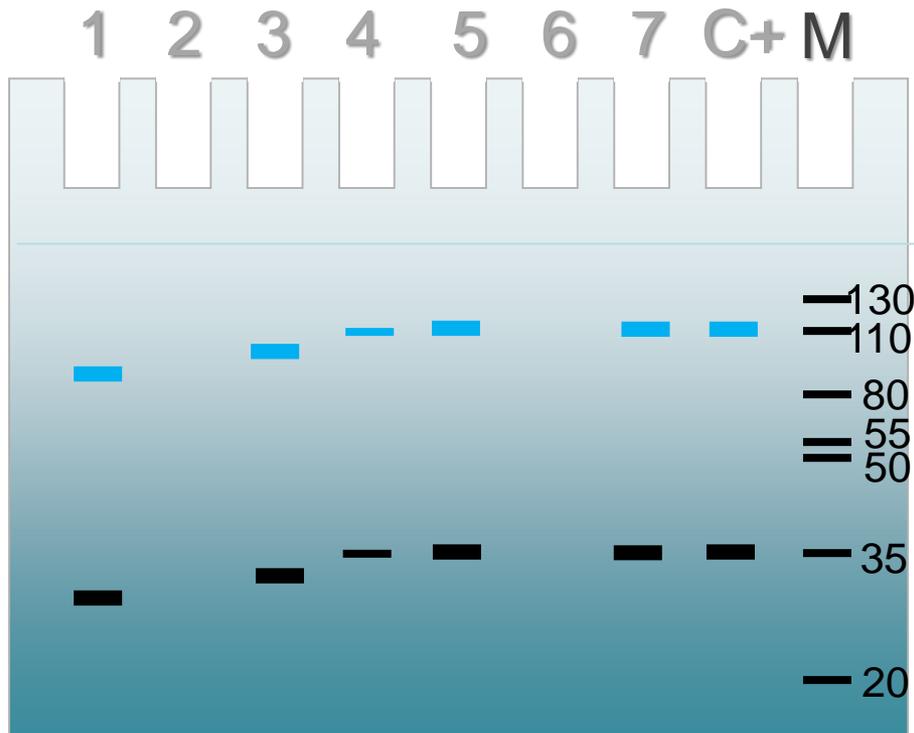


Banda attesa 35 kDa

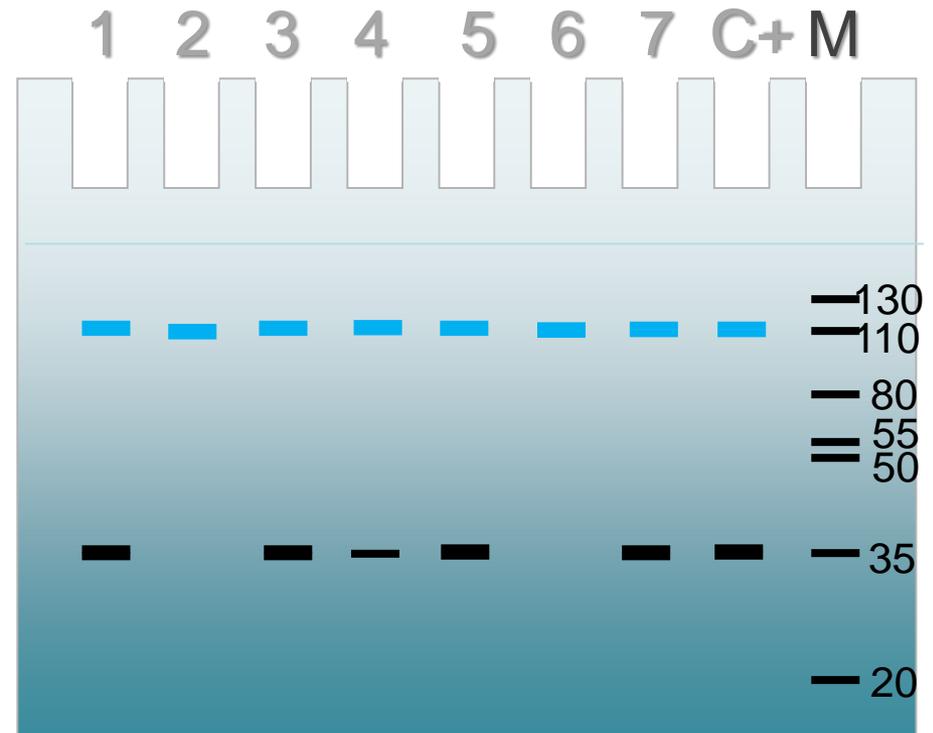
Banda attesa 35 kDa

Se non viene **nemmeno il controllo positivo**, non è detto che i vostri campioni non abbiano l'antigene.

PROTEINA INDIPENDENTE



Banda attesa 35 kDa



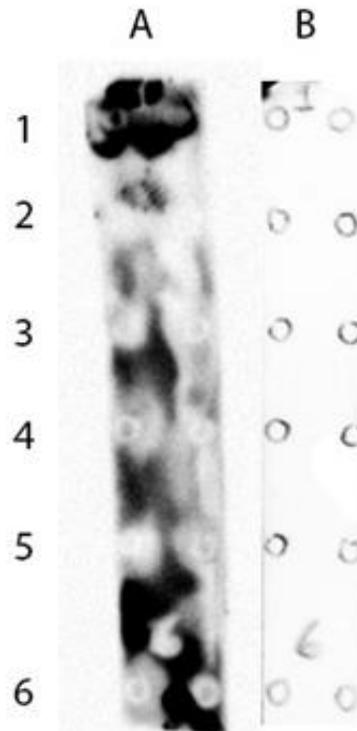
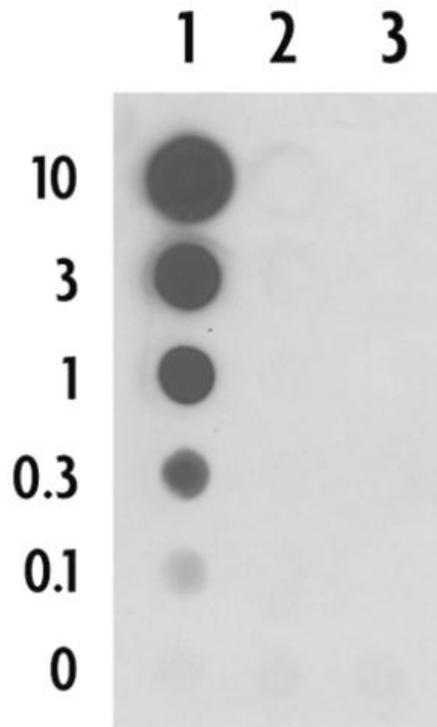
Banda attesa 35 kDa

Necessaria per evidenziare errori di:

caricamento,
corsa,
trasferimento,
legame anticorpale,
ecc.

DOT BLOT

Tecnica in cui si affida il riconoscimento dell'**Ag** alla sola selettività dell'**Ab**, in assenza di una separazione elettroforetica preventiva.



1 A) 60 ng ApoCIII

2 A) 30 ng ApoCIII

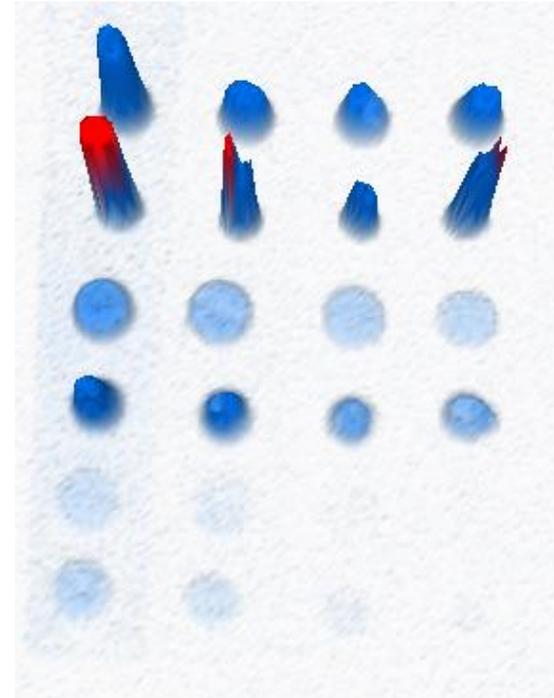
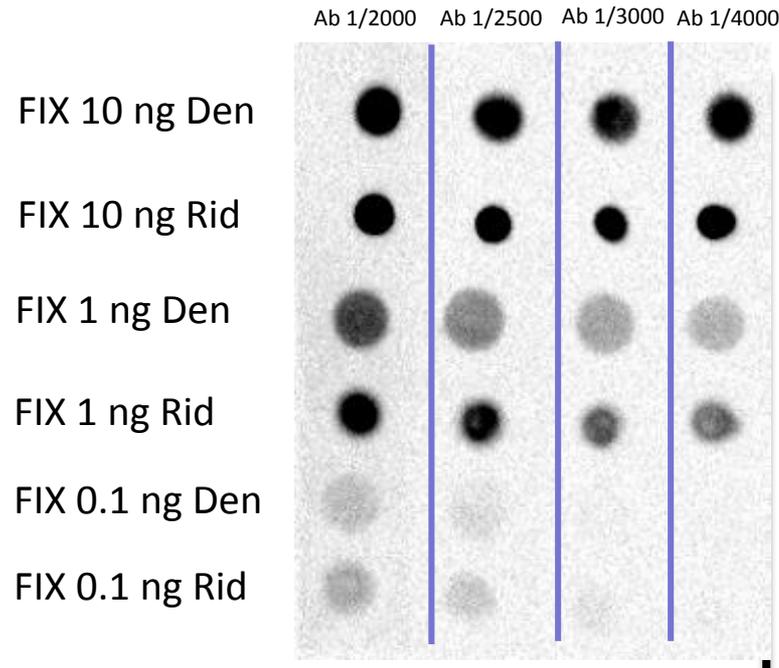
3 A) 10 ng ApoCIII

4 A) 1 ng ApoCIII

5 A) 0.1 ng ApoCIII

6 A) 60 ng BSA

DOT BLOT



SVANTAGGI

Riconoscimento e legame più difficili.

VANTAGGI

- Rapidità e semplicità di esecuzione.
- Non c'è perdita di campione.

Gel di PAA per i laboratori

1°

Running gel (5 mL) finale 12%

H ₂ O	2,1 (2,098) mL
TRIS 1,5 M pH 8,8	1,3 mL
Acrilammide (40%→12%)	1,5 mL
SDS 10%	50 uL
APS 10%	50 uL
TEMED	2 uL

2°

Stacking gel (2 mL) finale 4%

H ₂ O	1508 uL
TRIS 1,0 M pH 6,8	250 uL
Acrilammide (40% →8%)	200 uL
SDS 10%	20 uL
APS 10%	20 uL
TEMED	2 uL