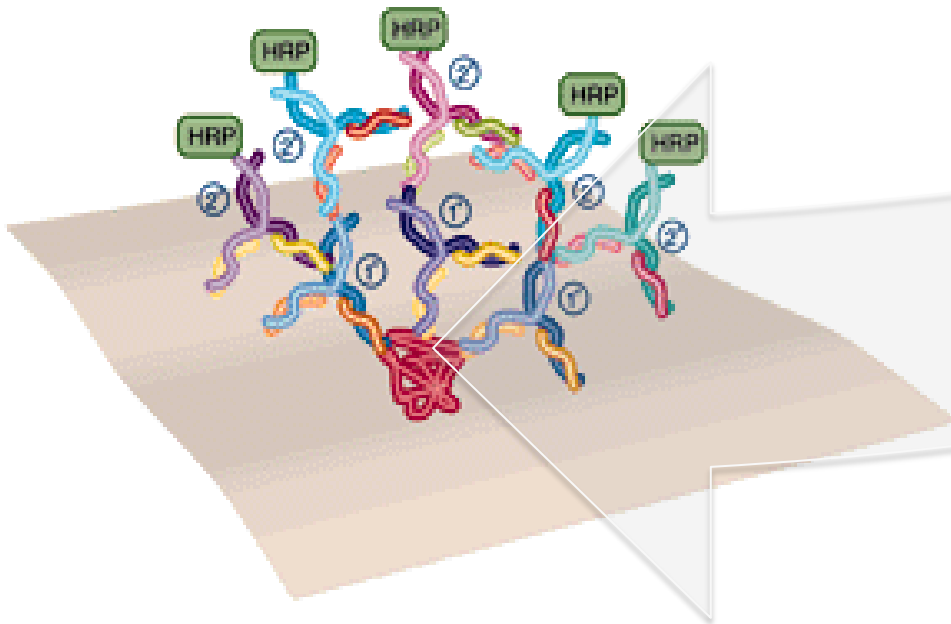
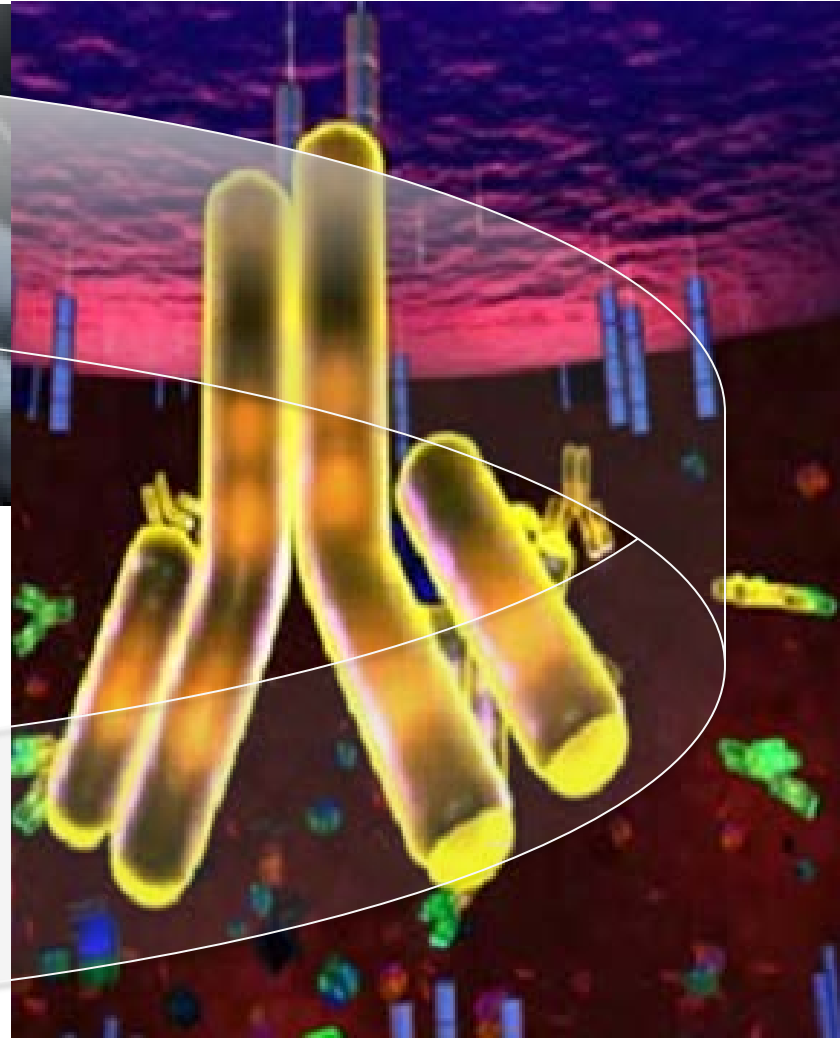
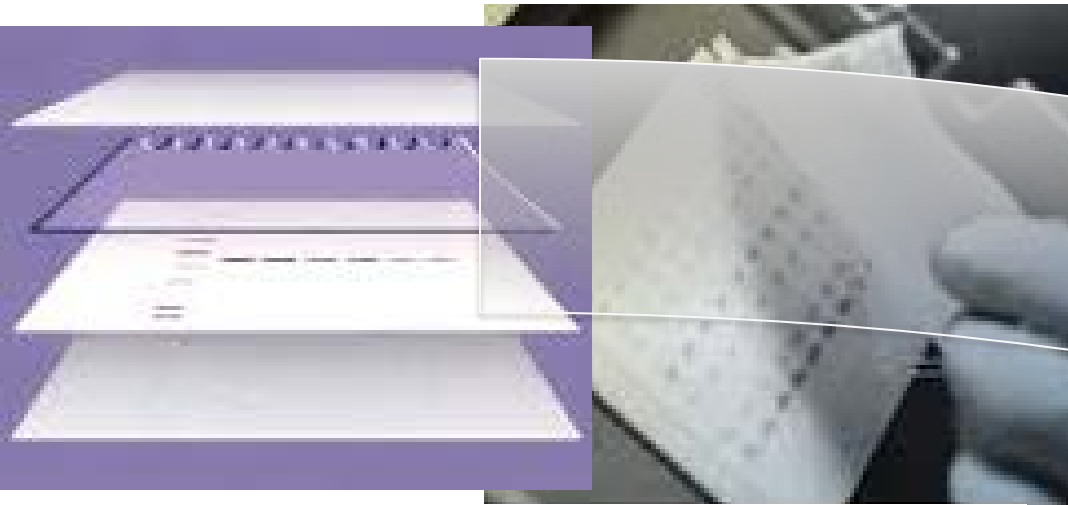
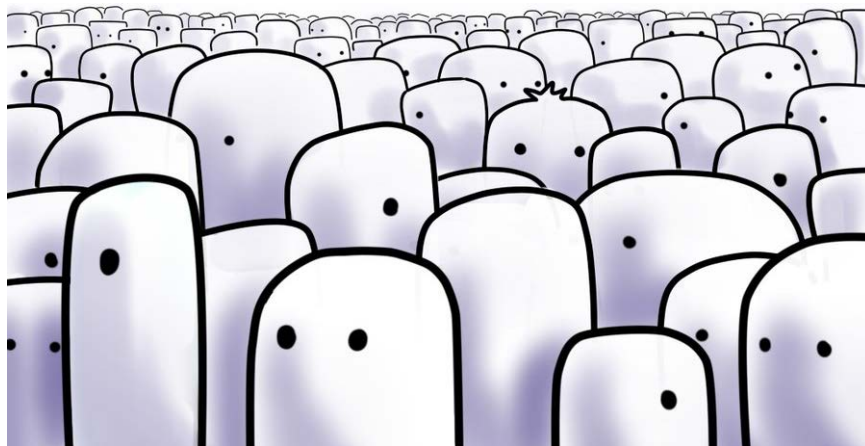


WESTERN BLOTTING



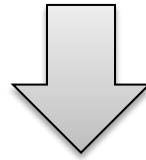
Metodi colorimetrici



Metodi immunochimici

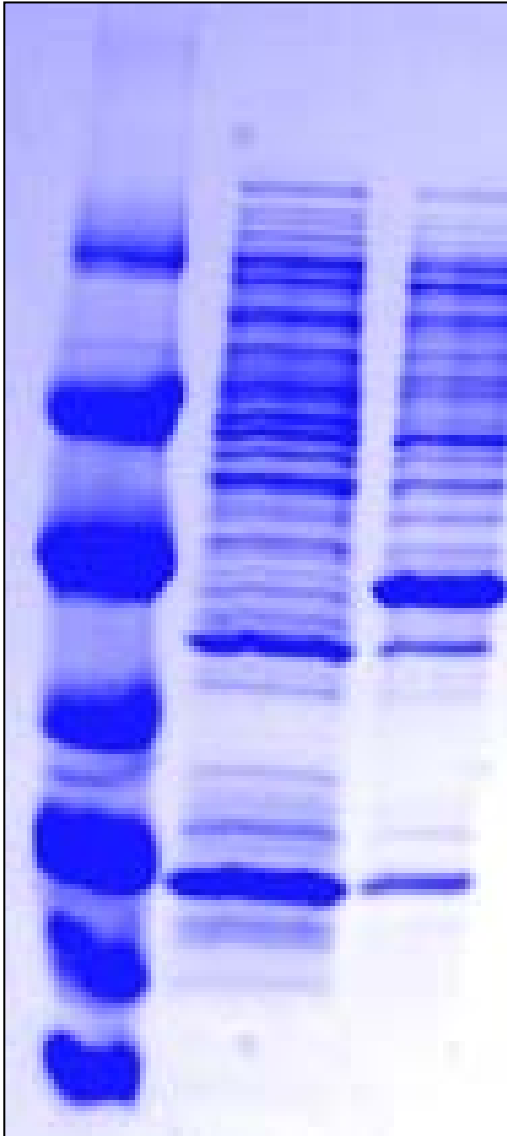


SCOPO DEL WESTERN BLOTTING

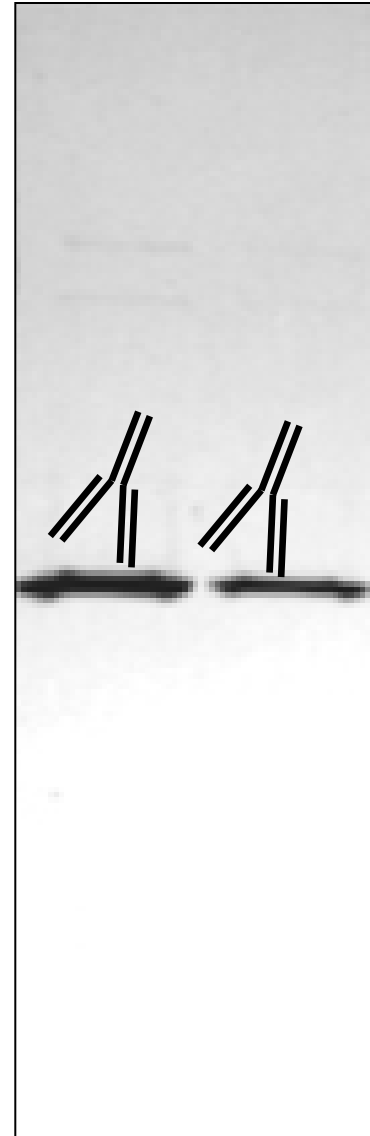


SCOPO DEL WESTERN BLOTTING

Colorazione (**Blue Coomassie**)



Rilevazione con **anticorpi**



SCOPO DEL WESTERN BLOTTING

Tecnica che consente di **visualizzare/individuare UNA proteina** tra milioni, grazie all'utilizzo di anticorpi

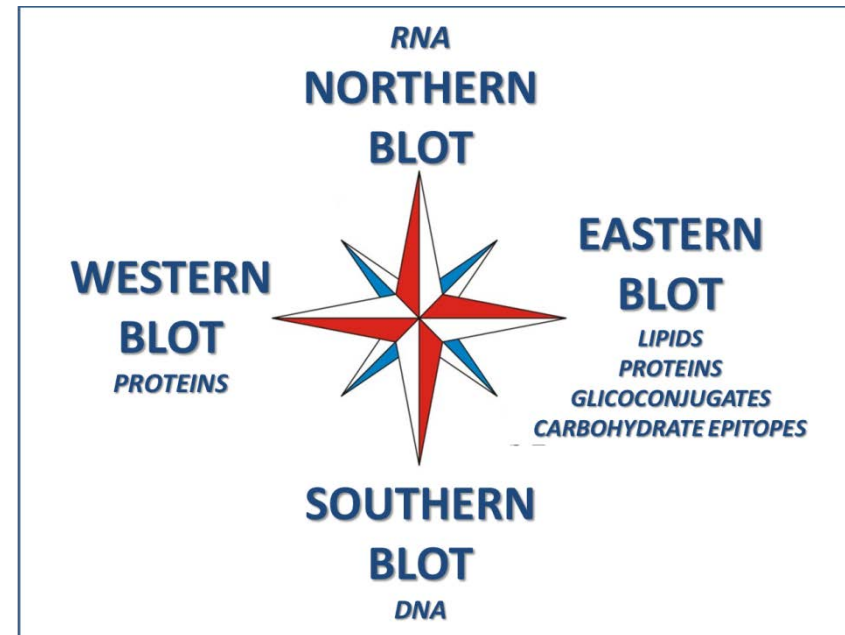


Consente la ricerca dell'ago nel pagliaio!

BLOTTING

Trasferimento di macromolecole su una membrana immobilizzante

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

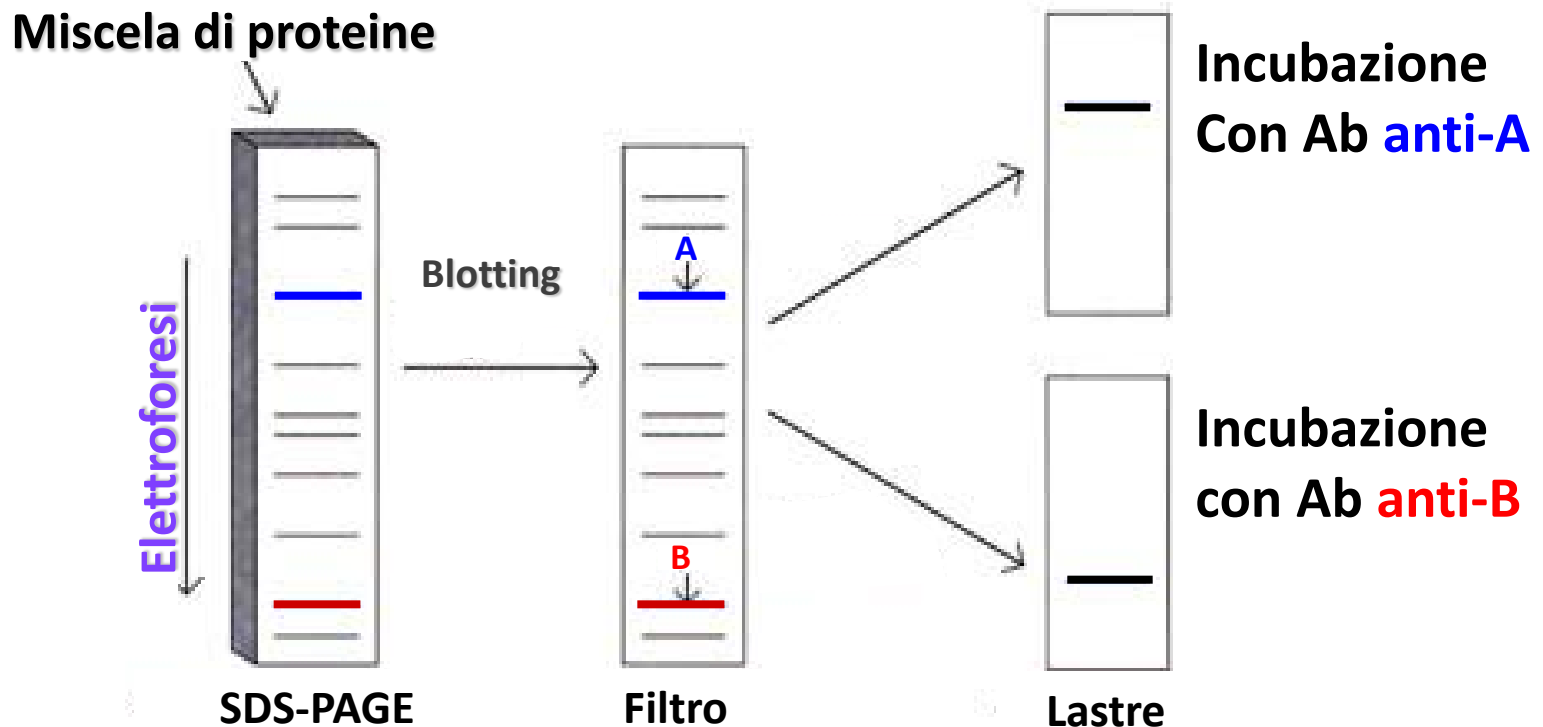


WESTERN BLOTTING (WB)

Tecnica **QUALITATIVA** che consente di **visualizzare/individuare UNA proteina** tra milioni, grazie all'utilizzo di anticorpi

Questo sistema unisce:

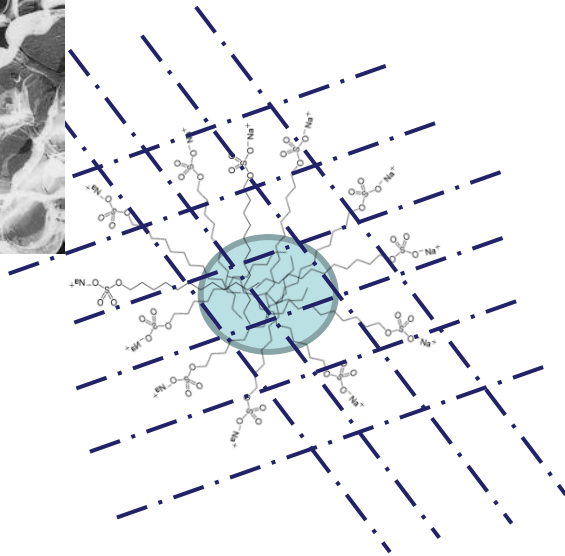
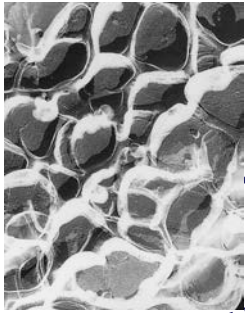
- La **risoluzione** delle separazioni elettroforetiche
- La **sensibilità** delle rivelazioni immunochimiche



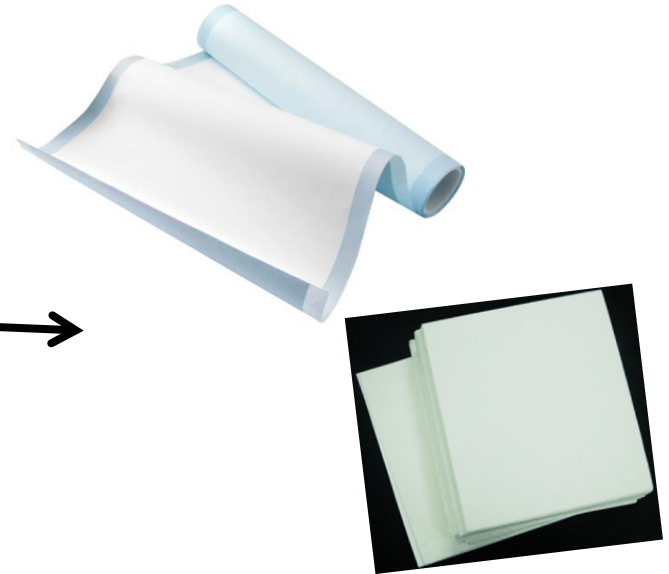
WESTERN BLOTTING – MEMBRANE IMMOBILIZZANTI

Le proteine, separate per elettroforesi su gel di poliacrilamide, devono essere trasferite su una **membrana immobilizzante**

- **Blocca** la **diffusione** delle proteine
- Rende più **accessibili** gli **EPITOP**I dell'Antigene all'anticorpo



Gel di poliacrilamide

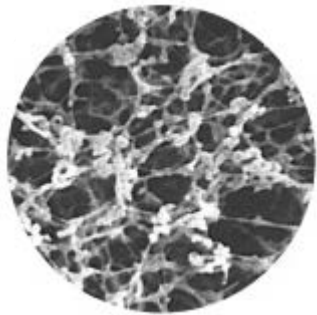
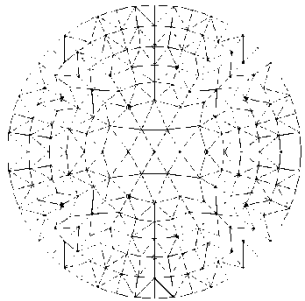


Membrana immobilizzante

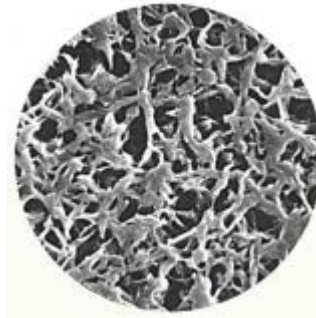
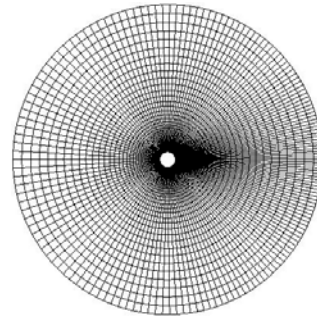
WESTERN BLOTTING – MEMBRANE IMMOBILIZZANTI

Le proteine, separate per elettroforesi su gel di poliacrilamide, devono essere trasferite su una **membrana immobilizzante**

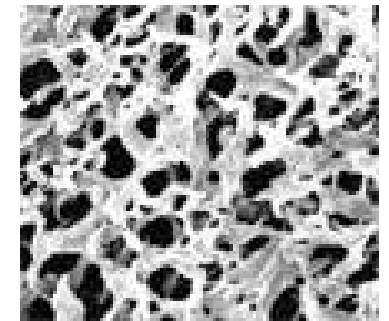
- **Blocca** la **diffusione** delle proteine
- Rende più **accessibili** gli **EPITOP**I dell'Antigene all'anticorpo



Nitrocellulosa
80-100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$



PVDF
(Polyvinylidene fluoride)
100-300 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$



Nylon

STEP SPERIMENTALI

- Preparazione del campione
 - Separazione elettroforetica
- } come per SDS-PAGE
- **Trasferimento** delle proteine dal gel alla membrana immobilizzante, tramite un campo elettrico perpendicolare al gel.
 - **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** e lavaggio dell'eccesso
 - **Rilevazione** (dipende dal tipo di marcatura)

STEP SPERIMENTALI

- Preparazione del campione
 - Separazione elettroforetica
- } come per SDS-PAGE
- **Trasferimento** delle proteine dal gel alla membrana immobilizzante, tramite un campo elettrico perpendicolare al gel.
 - **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** e lavaggio dell'eccesso
 - **Rilevazione** (dipende dal tipo di marcatura)

PREPARAZIONE DEL CAMPIONE E SEPARAZIONE ELETTROFORETICA

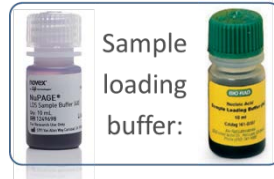
Tris-HCl a pH 6.8

SDS

addensante

riducente

traccianti

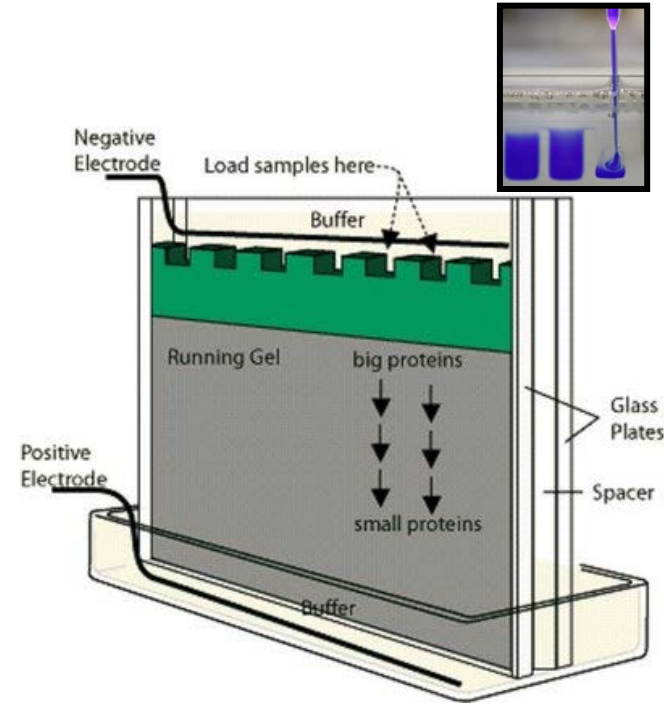
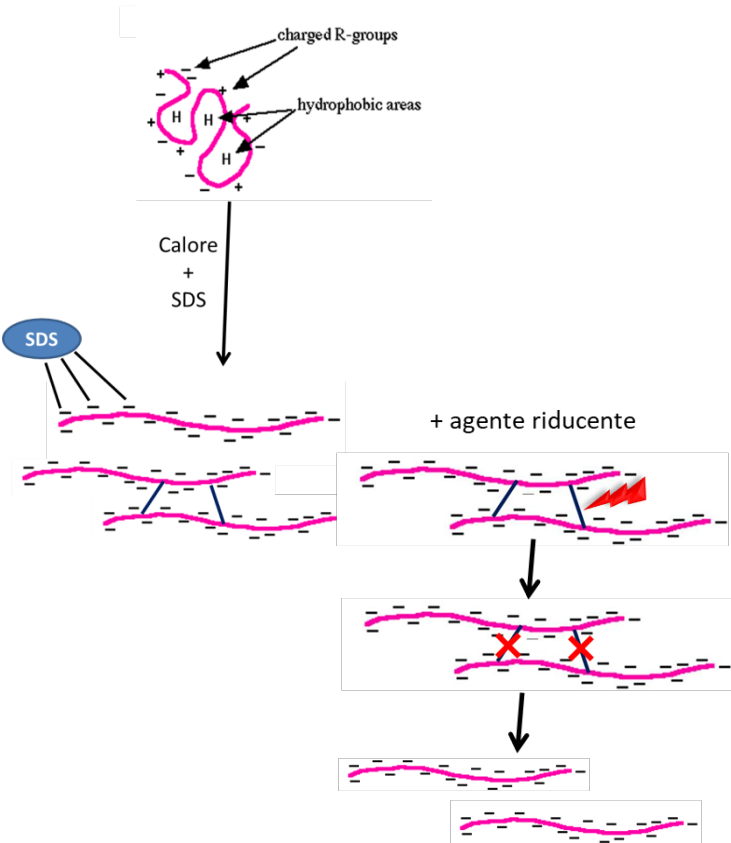
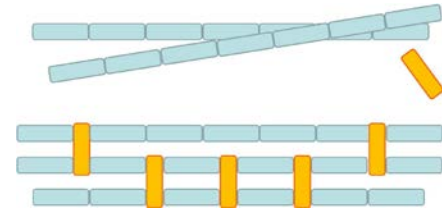


Sample loading buffer:

[Saccarosio o glicerolo]

[β -mercaptoetanol]

[Xilene Cianolo-Blu di Bromofenolo]



gel di impaccamento ("stacking" gel)

(concentrazione delle proteine)

gel per la corsa ("running" o "resolving" gel)

(separazione delle proteine in base al loro PM)

Come per SDS-PAGE

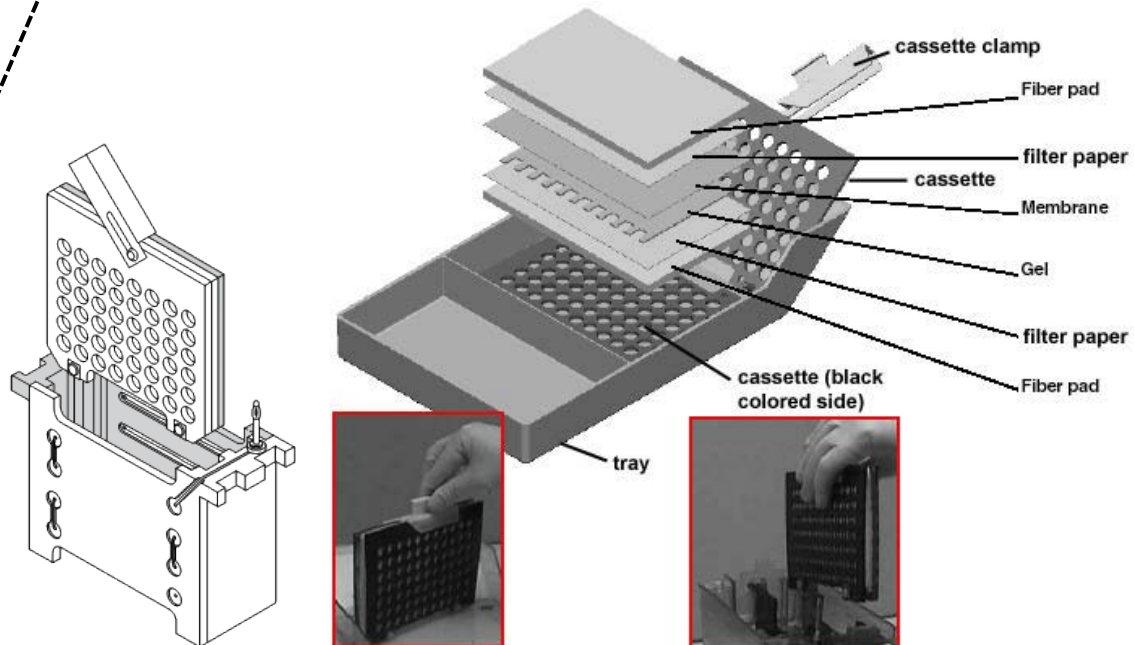
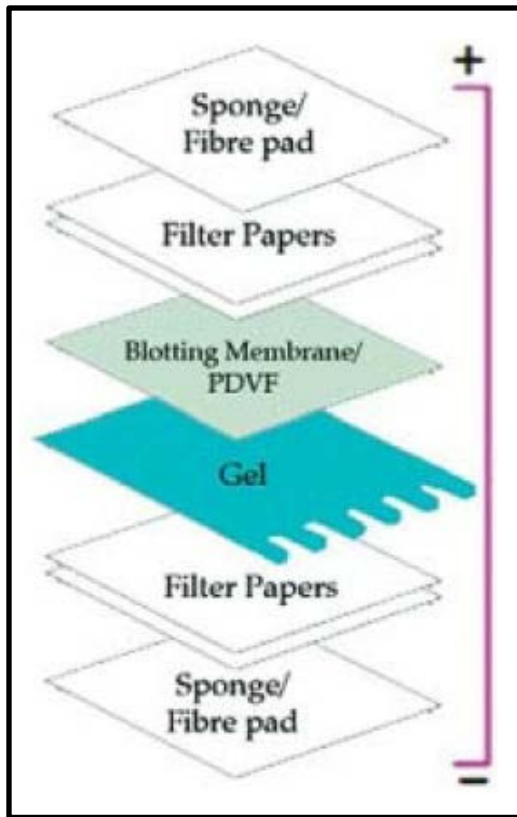
STEP SPERIMENTALI

- Preparazione del campione
 - Separazione elettroforetica
- } come per SDS-PAGE
- **Trasferimento** delle proteine dal gel alla membrana immobilizzante, tramite un campo elettrico perpendicolare al gel.
 - **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** e lavaggio dell'eccesso
 - **Rilevazione** (dipende dal tipo di marcatura)

FASE DI TRASFERIMENTO (BLOTTING)

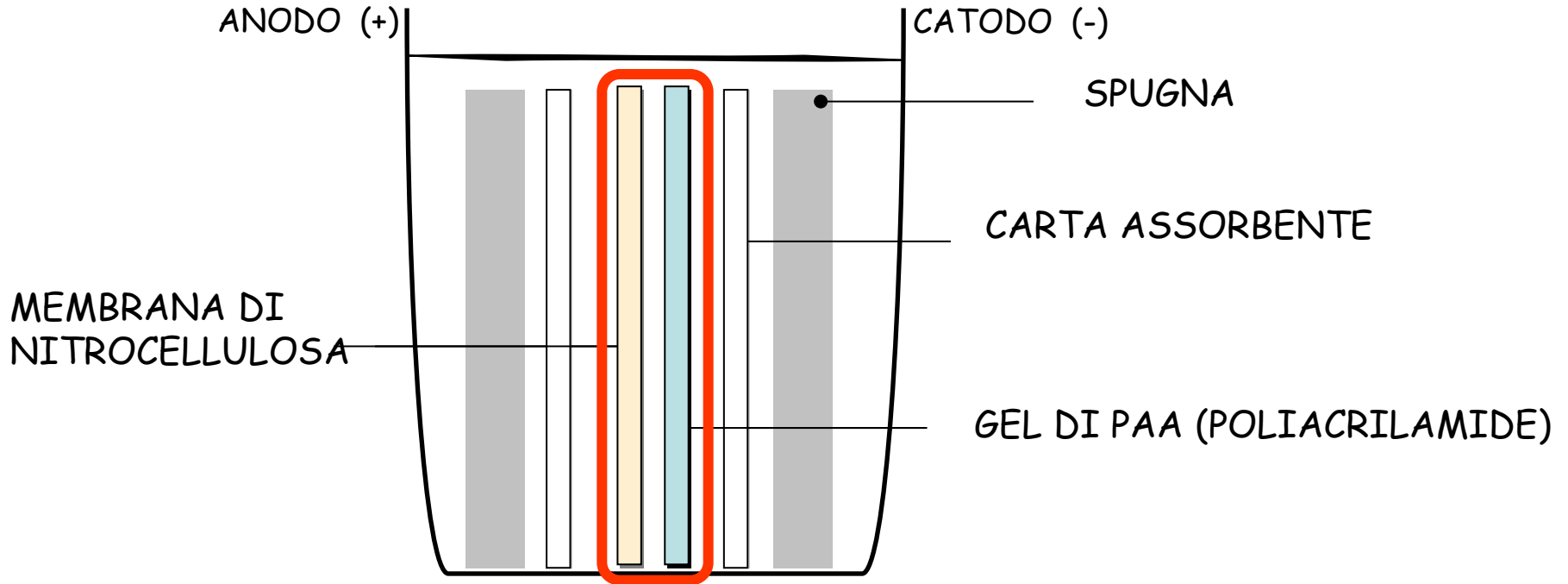
Spostamento delle proteine dal gel alla membrana immobilizzante

Preparazione del "sandwich"

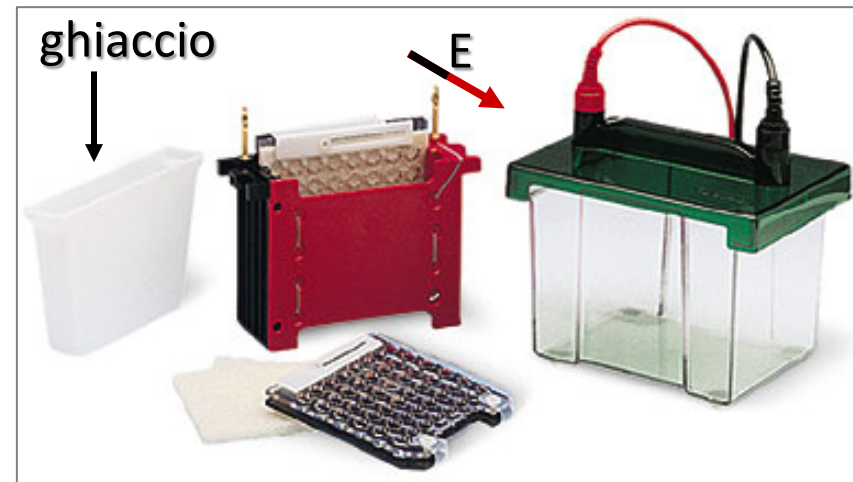


FASE DI TRASFERIMENTO (BLOTTING)

ELETTROBLOTTING



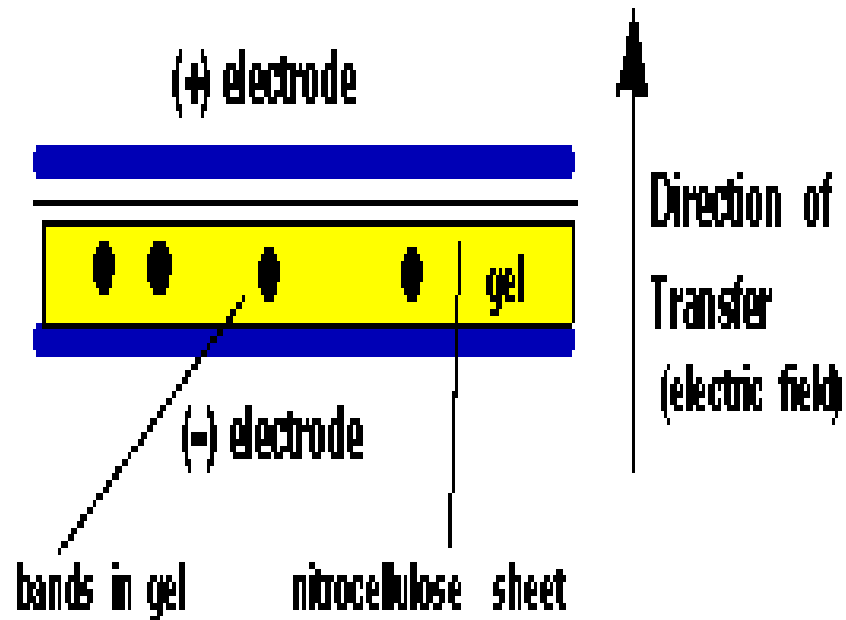
Trasferimento delle proteine dal gel alla membrana di nitrocellulosa mediante un **CAMPO ELETTRICO ORTOGONALE AL GEL**



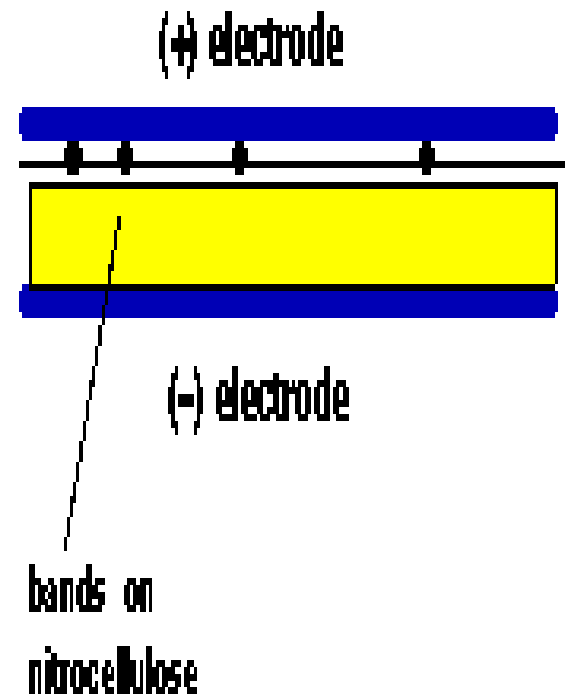
FASE DI TRASFERIMENTO (BLOTTING)

ELETTROBLOTTING

Before Transfer:



After Transfer:



Note: All the layers are pressed tightly together.

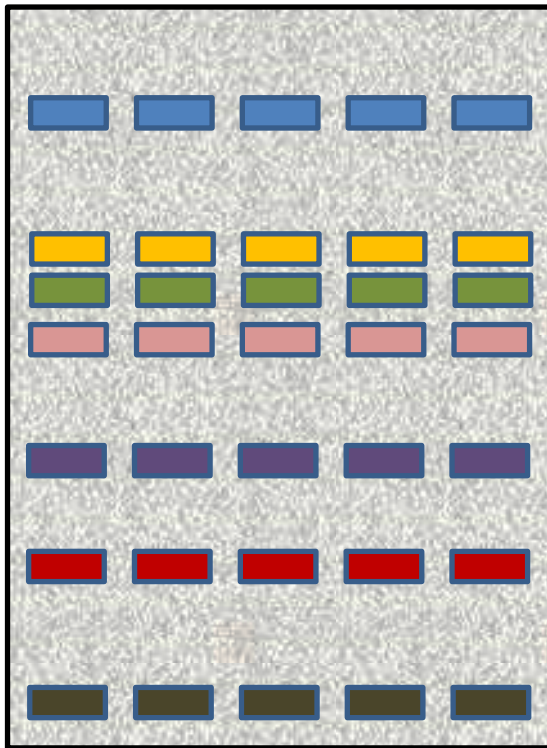
STEP SPERIMENTALI

- Preparazione del campione
 - Separazione elettroforetica
- } come per SDS-PAGE
- **Trasferimento** delle proteine dal gel alla membrana immobilizzante, tramite un campo elettrico perpendicolare al gel.
 - **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** e lavaggio dell'eccesso
 - **Rilevazione** (dipende dal tipo di marcatura)

SATURAZIONE DELLA MEMBRANA e BLOCCO dei siti aspecifici

La membrana ha una elevata capacità di legare le proteine su tutta la superficie. Risulta quindi INDISPENSABILE bloccare i siti aspecifici di legame, ossia tutta la superficie non impegnata in legami con le proteine trasferite

Questo consente agli anticorpi di legarsi SOLO alle proteine di interesse e non in modo casuale alla superficie della membrana (background)



Tra i più utilizzati:

- **Non-Fat Dry Milk**
Mix di proteine del latte privo di grassi
- **BSA (Bovine Serum Albumin)**
Albumina di siero bovino

STEP SPERIMENTALI

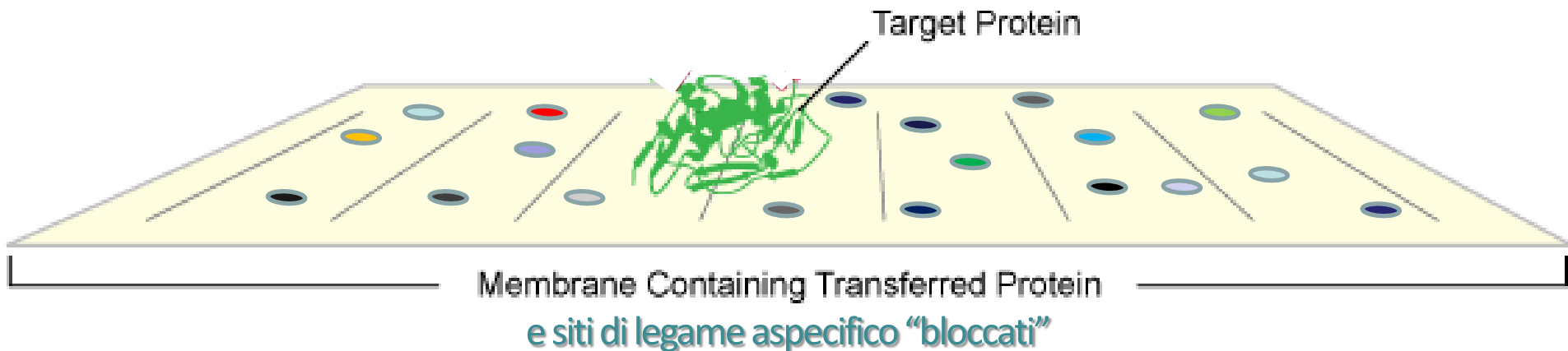
- Preparazione del campione
 - Separazione elettroforetica
- } come per SDS-PAGE
- **Trasferimento** delle proteine dal gel alla membrana immobilizzante, tramite un campo elettrico perpendicolare al gel.
 - **Saturazione** della membrana con una soluzione proteica (BSA o caseina del latte)
 - Aggiunta dell'**anticorpo 1^{ario}** specifico e lavaggio dell'eccesso
 - Aggiunta dell'**anticorpo 2^{ario} marcato** e lavaggio dell'eccesso
 - **Rilevazione** (dipende dal tipo di marcatura)

IDENTIFICAZIONE DELLA PROTEINA DI INTERESSE

La proteina di interesse, trasferita sulla membrana immobilizzante di nitrocellulosa, può trovarsi all'interno di una miscela complessa contenente un alto numero di proteine (es. plasma, lisato cellulare, ecc.)

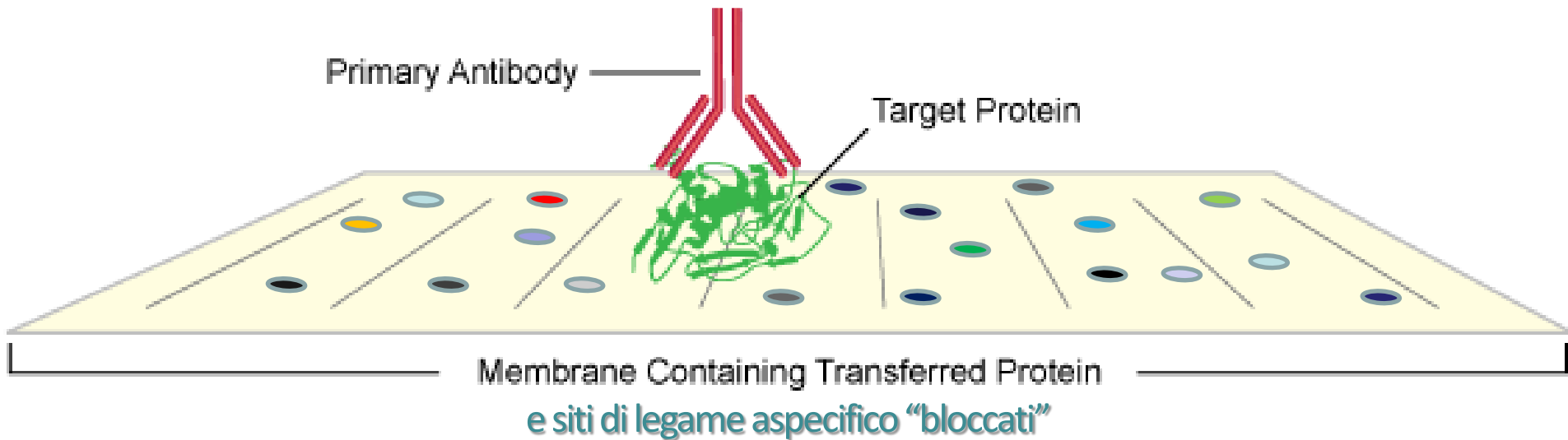


Serve uno strumento altamente **SPECIFICO** per quella proteina



AGGIUNTA DELL'ANTICORPO PRIMARIO

Utilizzo di un anticorpo (**anticorpo primario**) che riconosce in **modo SPECIFICO** la proteina di interesse ma non le altre presenti sulla membrana



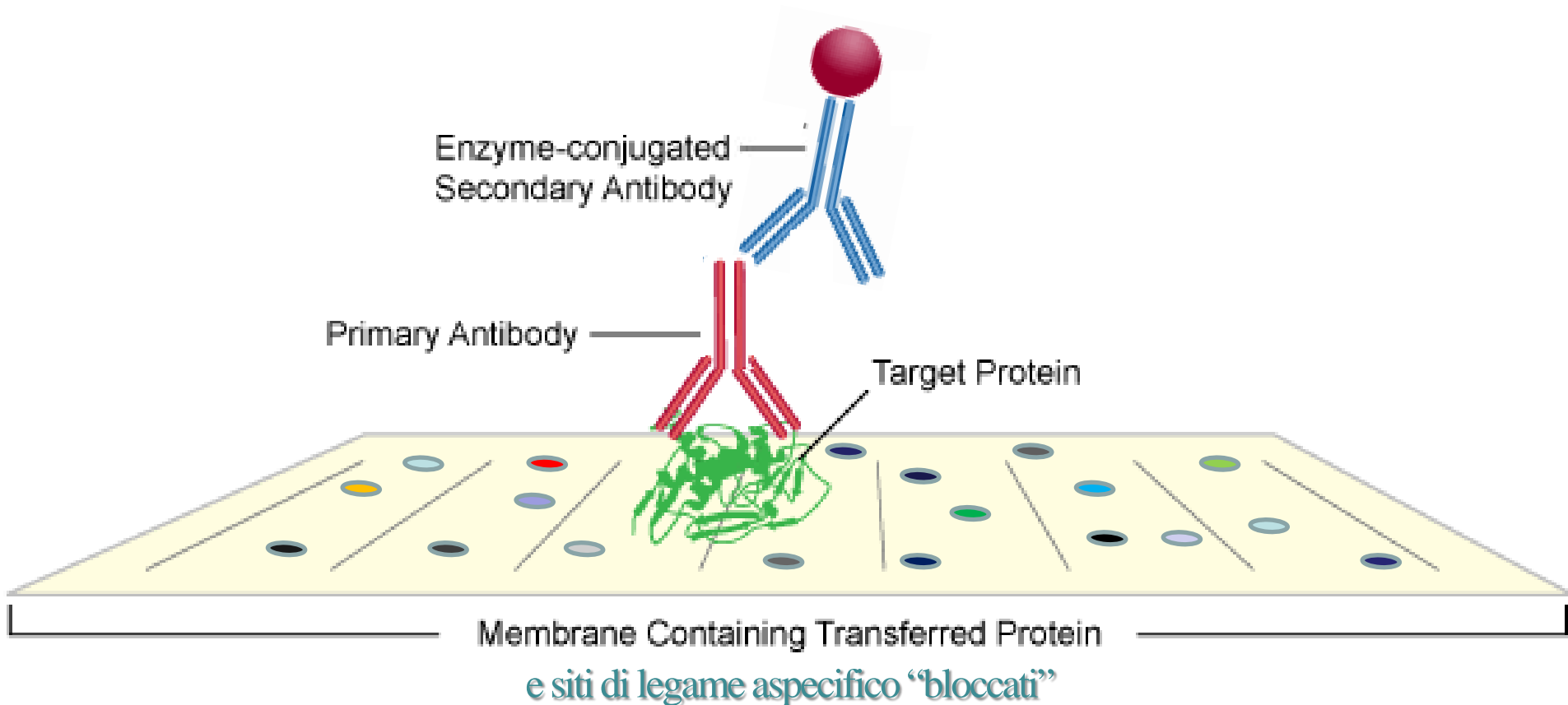
STEP SPERIMENTALI

- Preparazione del campione
 - Separazione elettroforetica
- } come per SDS-PAGE
- **Trasferimento** delle proteine dal gel alla membrana immobilizzante, tramite un campo elettrico perpendicolare al gel.
 - **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** e lavaggio dell'eccesso
 - **Rilevazione** (dipende dal tipo di marcatura)

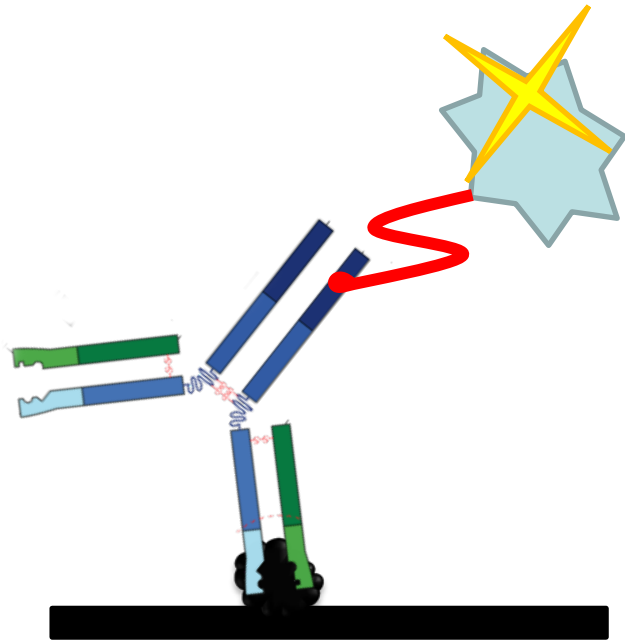
AGGIUNTA DELL'ANTICORPO SECONDARIO

Utilizzo di un secondo anticorpo (**anticorpo secondario**) che riconosce il primo (legato alla proteina di interesse)

L'anticorpo secondario è **marcato** con una molecola che serve per la rilevazione (es. **coniugato** con un **enzima**)

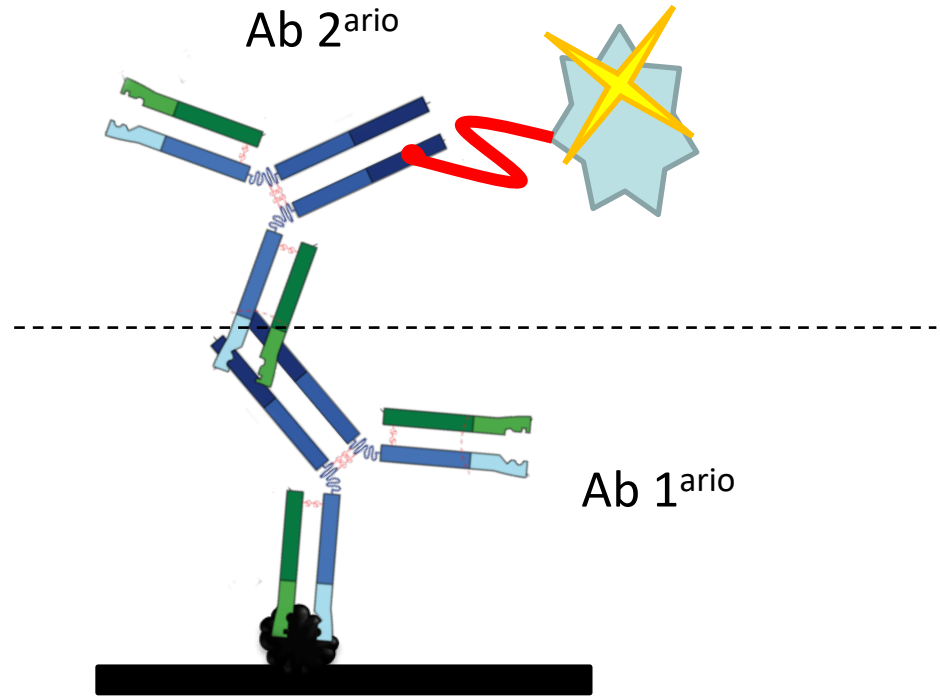


IL RICONOSCIMENTO MEDIANTE Ab PUÒ ESSERE DIRETTO O INDIRETTO



Riconoscimento diretto

L'epitopo è riconosciuto da un solo anticorpo direttamente coniugato con il sistema di rilevazione



Riconoscimento indiretto

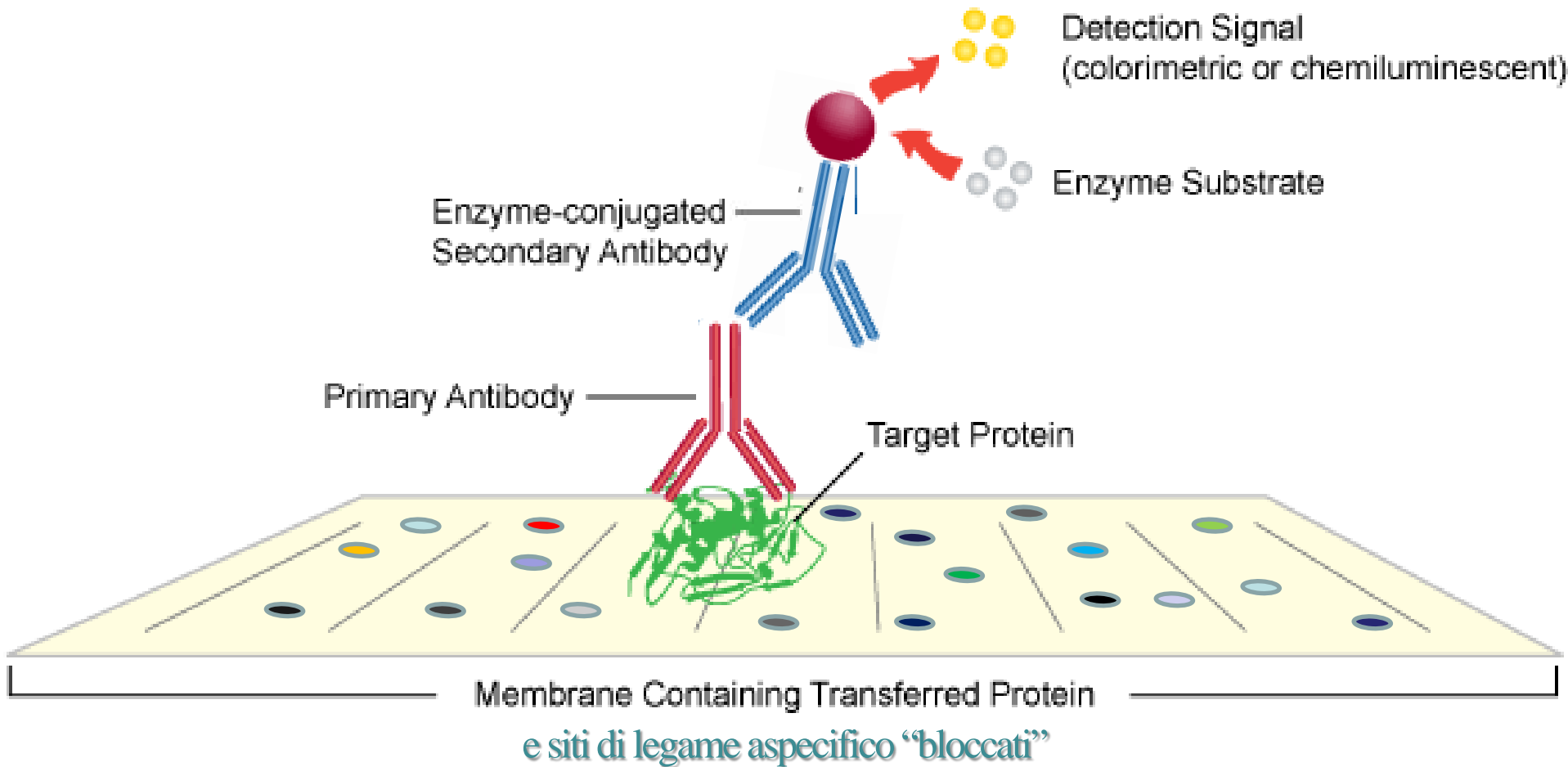
Il riconoscimento avviene mediante due anticorpi. L'epitopo è riconosciuto da un primo anticorpo, a sua volta riconosciuto e legato dal secondo anticorpo coniugato con il sistema di rilevazione

STEP SPERIMENTALI

- Preparazione del campione
 - Separazione elettroforetica
- } come per SDS-PAGE
- **Trasferimento** delle proteine dal gel alla membrana immobilizzante, tramite un campo elettrico perpendicolare al gel.
 - **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** e lavaggio dell'eccesso
 - **Rilevazione** (dipende dal tipo di marcatura)

RILEVAZIONE DEL SEGNALE (e della presenza della proteina di interesse)

Aggiunta di un **substrato** specifico, riconosciuto dall'enzima coniugato all'anticorpo secondario che a seguito di reazione enzimatica fornirà un **prodotto rilevabile**



SISTEMA DI RILEVAZIONE DEL SEGNALE

Uno dei metodi più classici è quello che utilizza come enzima coniugato la **PEROSSIDASI di rafano (Horse-radish peroxidase, HRP)**



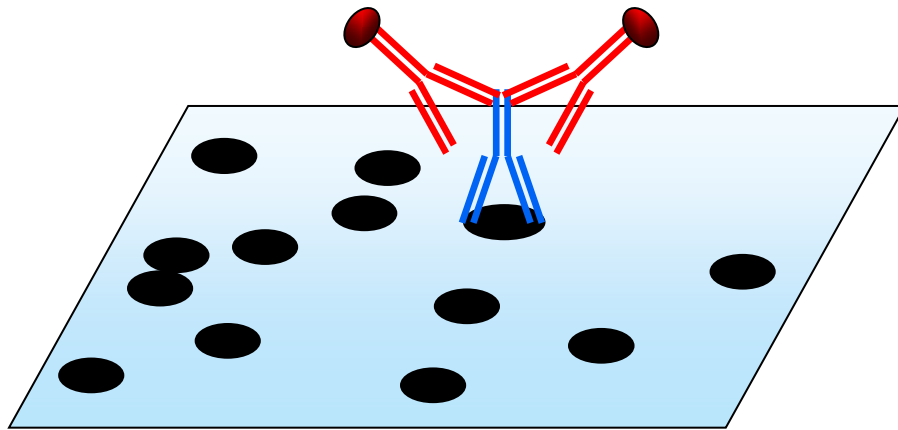
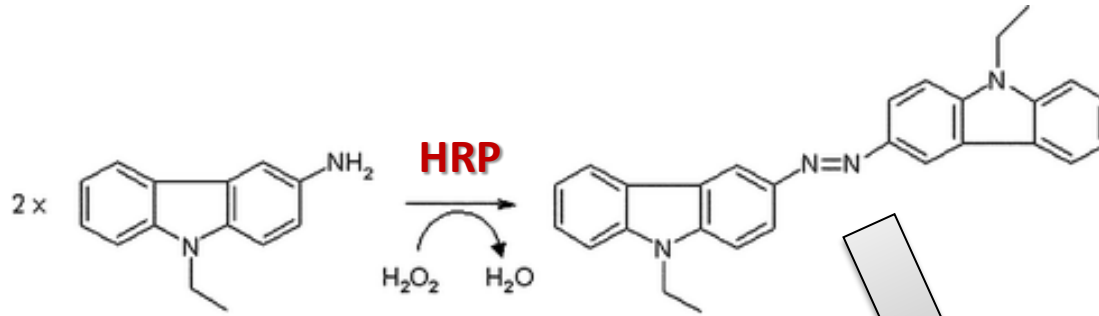
Rilevazione Colorimetrica

conversione di un substrato in
precipitato (prodotto) colorato

Rilevazione in chemiluminescenza

conversione di **luminolo** in un
prodotto che emette luce

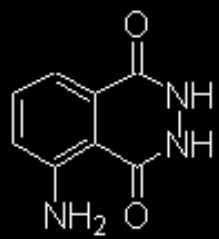
RILEVAZIONE COLORIMETRICA



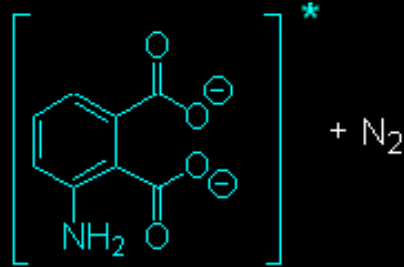
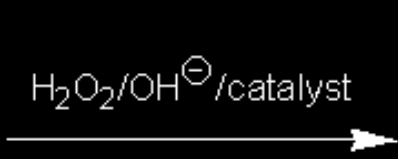
● **Perossidasi** = usando H_2O_2 come substrato, **ossida** il

3-amino-9-etilcarbazolo

a prodotto insolubile e **marrone**.



luminol



+ N₂

3-aminophthalate* (3-APA*)



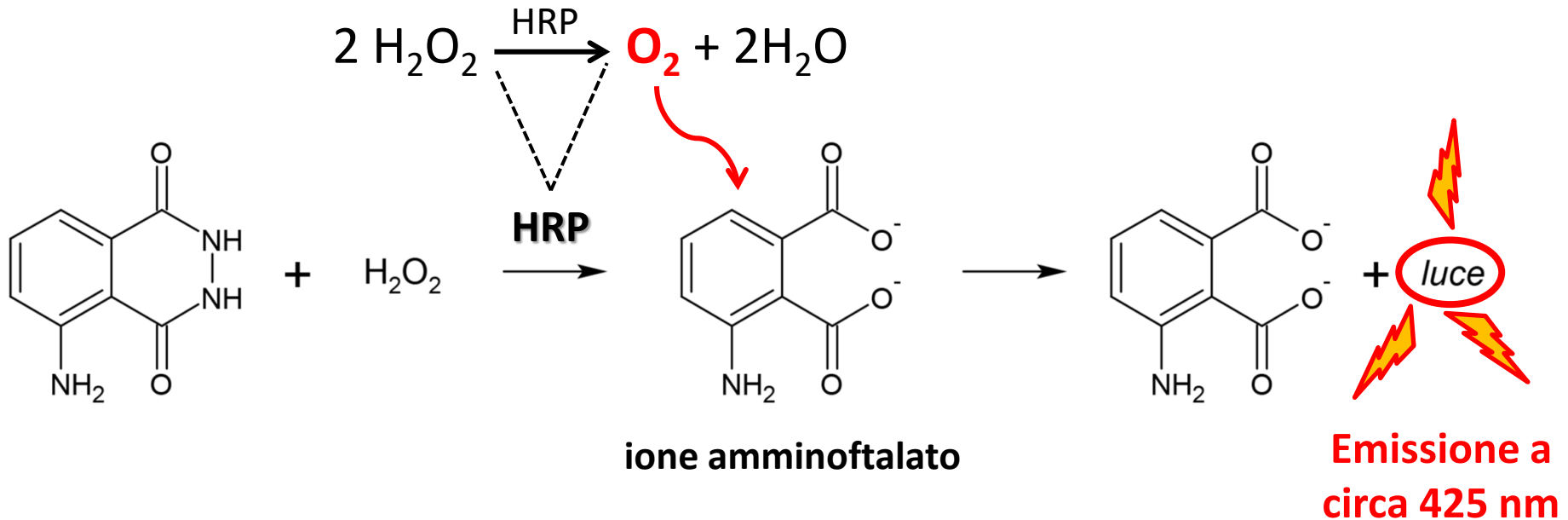
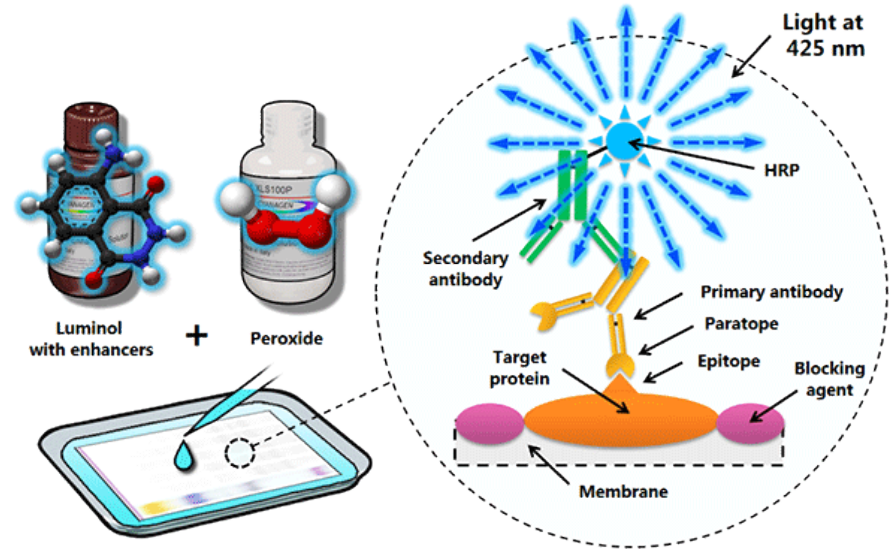
3-APA + LIGHT

Luminolo



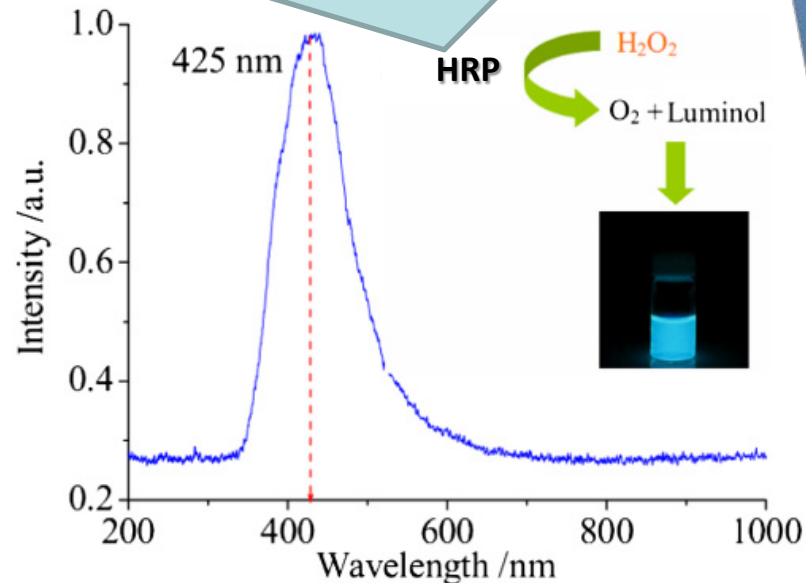
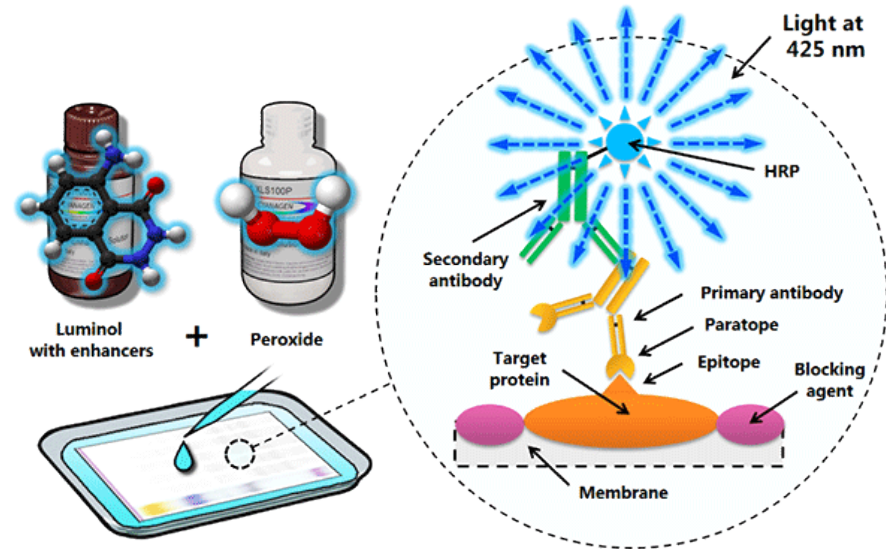
RIVELAZIONE IN CHEMILUMINESCENZA

In presenza di HRP e H_2O_2 il luminolo viene **ossidato**:
si produce **luce**, la cui intensità può essere aumentata di 1000 volte con un intensificatore (enhancer) chimico.



RIVELAZIONE IN CHEMILUMINESCENZA

In presenza di HRP e H_2O_2 il luminolo viene **ossidato**: si produce **luce**, la cui intensità può essere aumentata di 1000 volte con un intensificatore (enhancer) chimico.

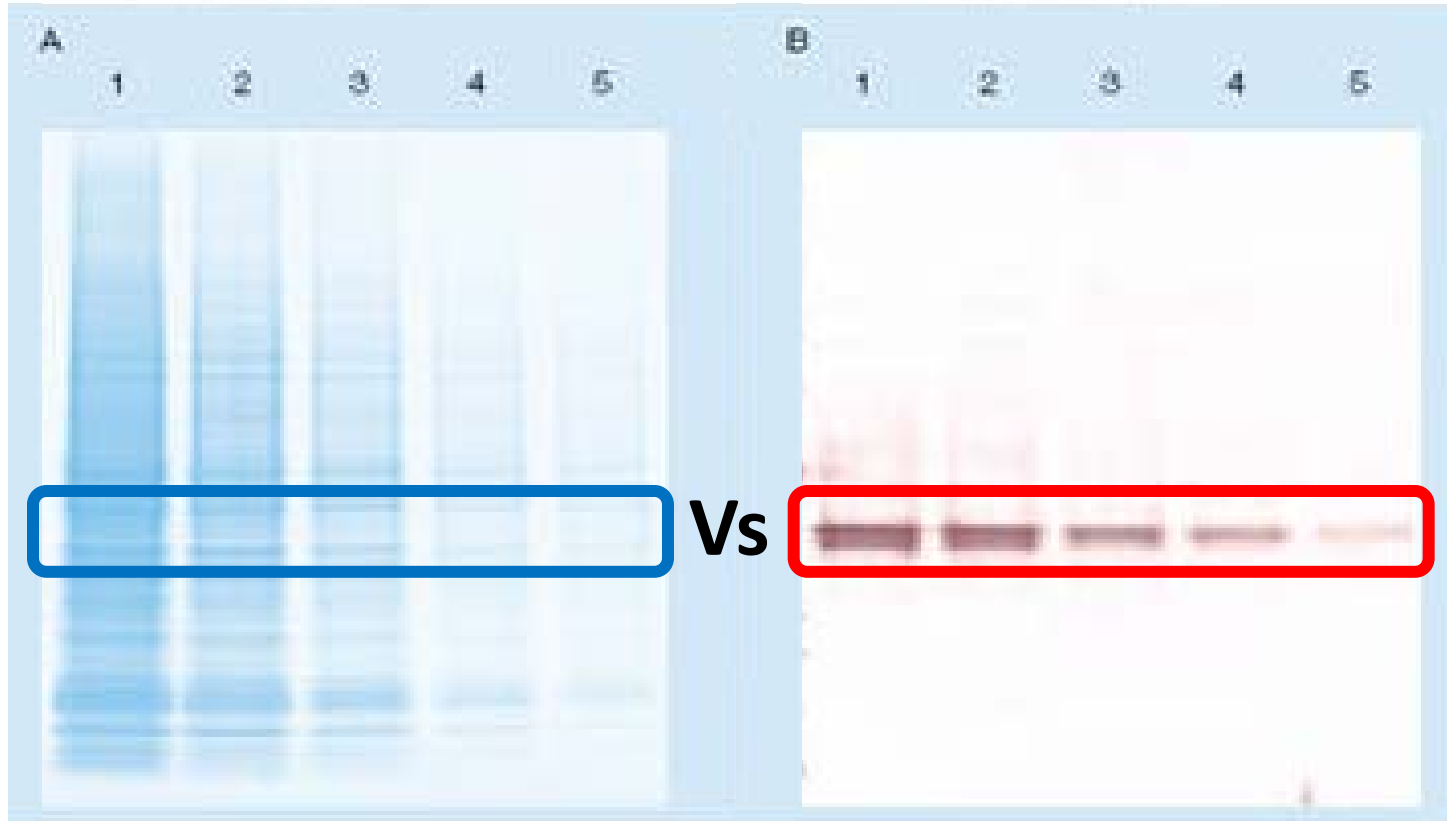


Confronto tra **COLORAZIONE** e **RIVELAZIONE con anticorpi**

Colorazione

Western Blotting

Marcatore
PM



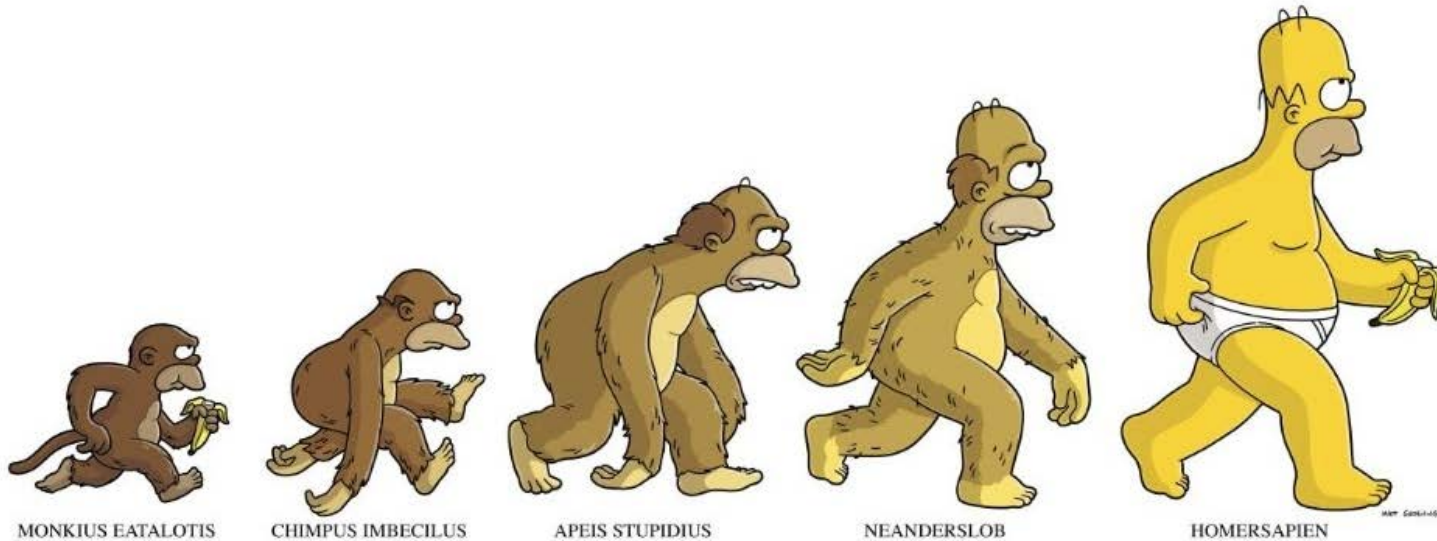
ASPECIFICA

- Direttamente sul **gel** di PAA
- colora **TUTTE** le **proteine**
- **Bassa sensibilità**

SPECIFICO

- Su **membrana** immobilizzante
- Visualizza **UNA** **proteina**
- **ALTA sensibilità**

EVOLUZIONE DEL WESTERN BLOTTING



HOMERSAPIEN

Variazioni del Western Blotting

Trasferimento con nuovi sistemi per aumentare sensibilità e ridurre i tempi di lavoro.



Sistemi per velocizzare Blocking e incubazioni anticorpali.



Anticorpi marcati con **cianine** (emissione in fluorescenza) anziché enzimi.



Rilevazione con sistemi di acquisizione digitale delle immagini.

Ciò permette di **abbandonare la camera oscura.**



Variazioni del Western Blotting

Trasferimento con nuovi sistemi per aumentare sensibilità e ridurre i tempi di lavoro.



Sistemi per velocizzare Blocking e incubazioni anticorpali.



Anticorpi marcati con **cianine** (emissione in fluorescenza) anziché enzimi.



Rilevazione con sistemi di acquisizione digitale delle immagini.



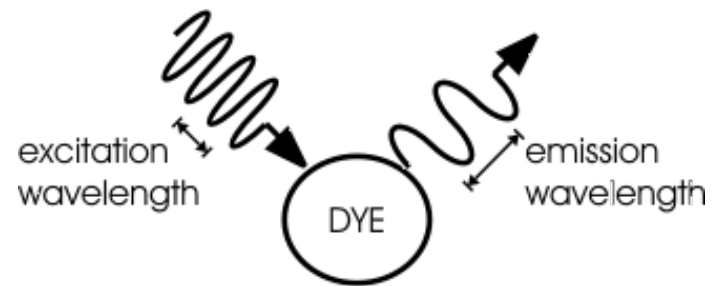
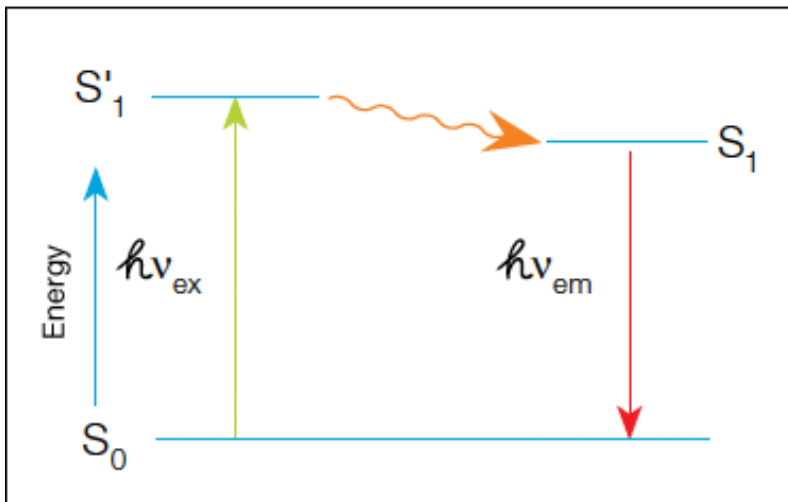
Ciò permette di abbandonare la camera oscura.



Fluorescenza



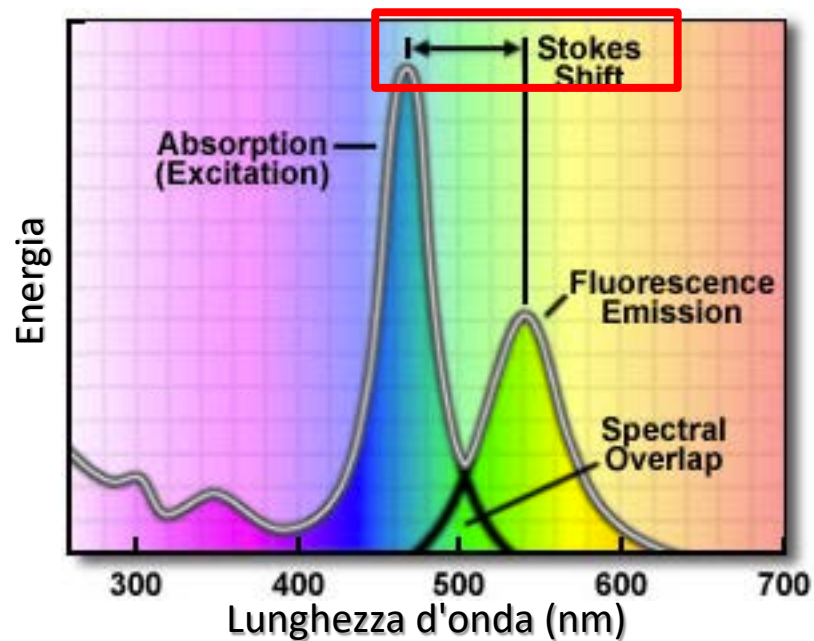
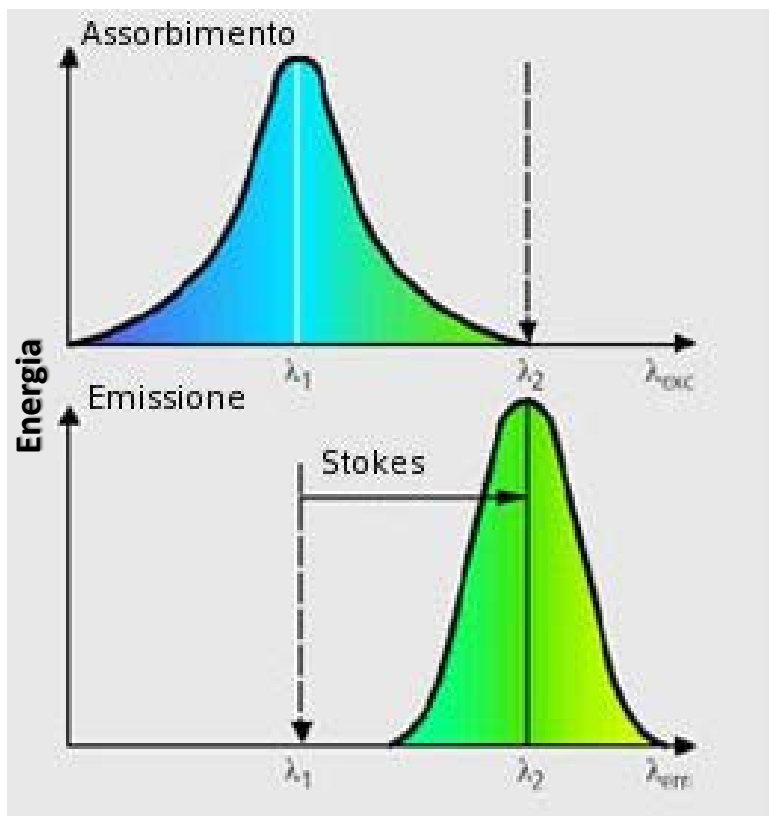
Assorbimento da parte di una **molecola** di una radiazione con **emissione** di un'altra radiazione a **lunghezza d'onda maggiore**



È un caso particolare di luminescenza che **cessa quando termina la causa di eccitazione**

FLUORESCENZA

Assorbimento da parte di una **molecola** di una radiazione con **emissione** di un'altra radiazione a **lunghezza d'onda maggiore**



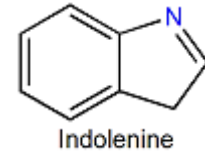
Dipende dalla "**natura elettronica**" della sostanza.

Cianine

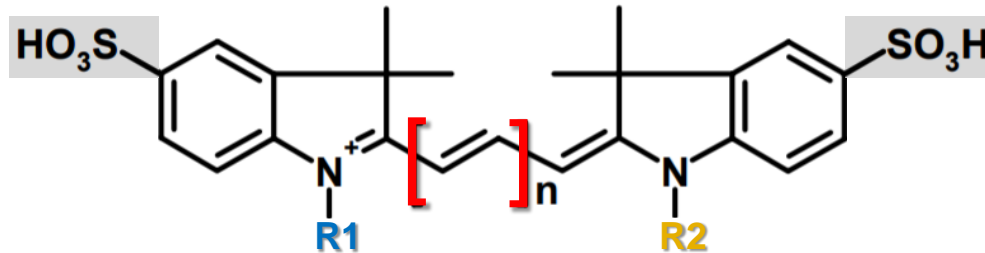
Cy = cyanine

3-5-7 = numero di **atomi di C** presenti tra due gruppi

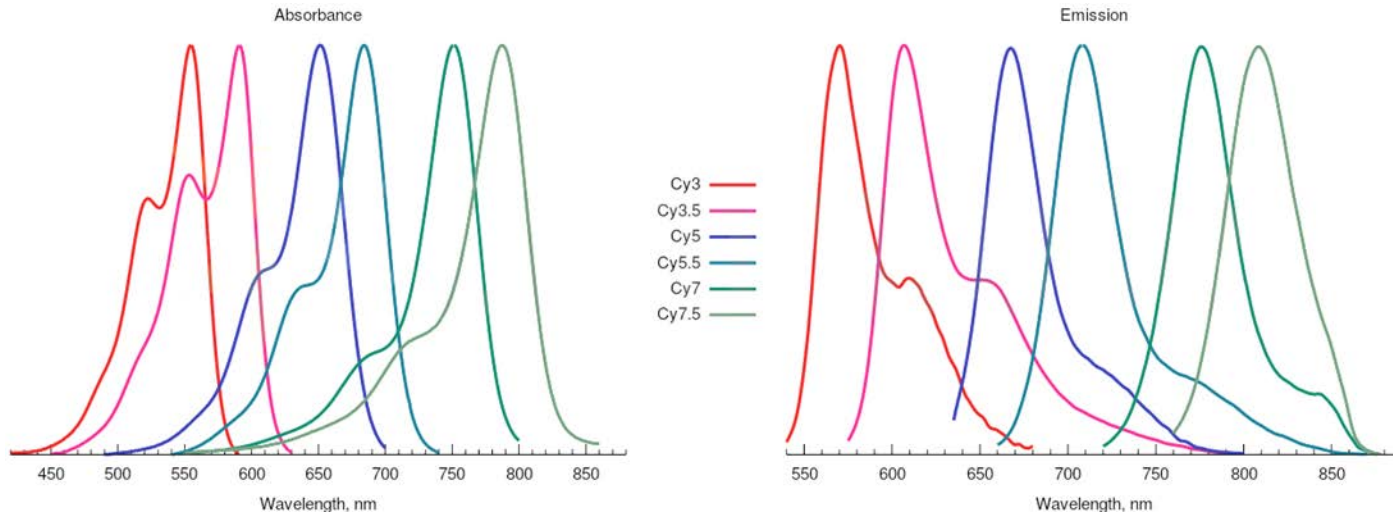
.5 = aggiunta di gruppi benzilici



Struttura generale di una cianina



Esempi di spettri di assorbimento/emissione

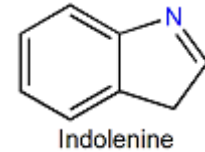


Cianine

Cy = cianine

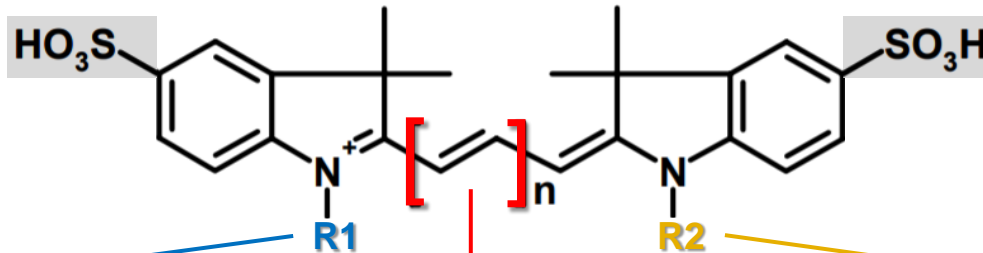
3-5-7 = numero di **atomi di C** presenti tra due gruppi

.5 = aggiunta di gruppi benzilici



Struttura generale di una cianina

Aumento solubilità



Aumento solubilità

siti di modificazione chimica
(es. acidi carbossilici) o di
marcatura ("labelling", es. **Ab**)

siti di modificazione chimica
(es. acidi carbossilici) o di
marcatura ("labelling", es. **Ab**)

$n = 1$ Cy**3** (**3** atomi di **C**)

$n = 2$ Cy**5** (**5** atomi di **C**)

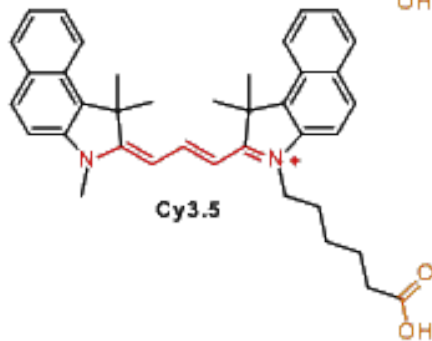
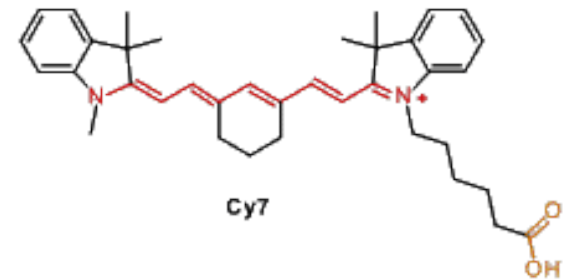
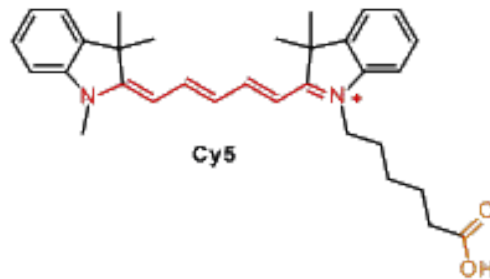
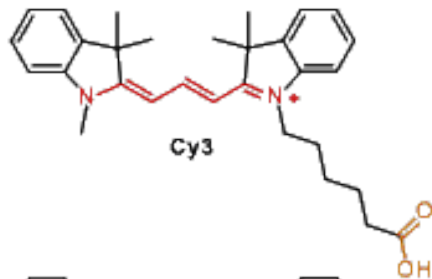
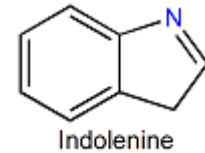
$n = 3$ Cy**7** (**7** atomi di **C**)

Cianine

Cy = cyanine

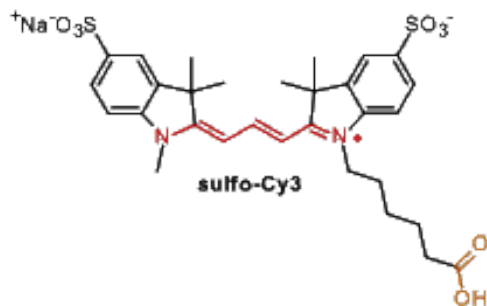
3-5-7 = numero di **atomi di C** presenti tra due gruppi

.5 = aggiunta di gruppi benzilici



Altri tipi di molecole fluorescenti:

Derivati solfonati

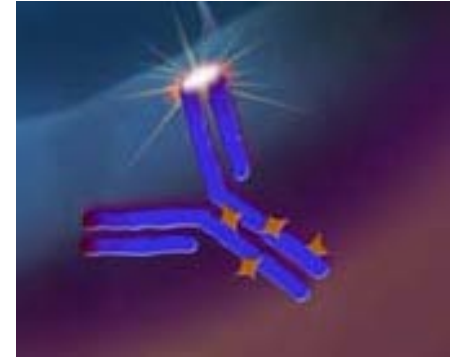


Alexa Fluor dye	Emission color*
Alexa Fluor 350	Blue
Alexa Fluor 405	Blue
Alexa Fluor 430	Green/Yellow
Alexa Fluor 488	Green
Alexa Fluor 532	Yellow
Alexa Fluor 546	Orange
Alexa Fluor 555	Orange

Alexa Fluor dye	Emission color*
Alexa Fluor 568	Orange/Red
Alexa Fluor 594	Red
Alexa Fluor 610	Red
Alexa Fluor 633	Far Red
Alexa Fluor 635	Far Red
Alexa Fluor 647	Near-IR***
Alexa Fluor 660	Near-IR***

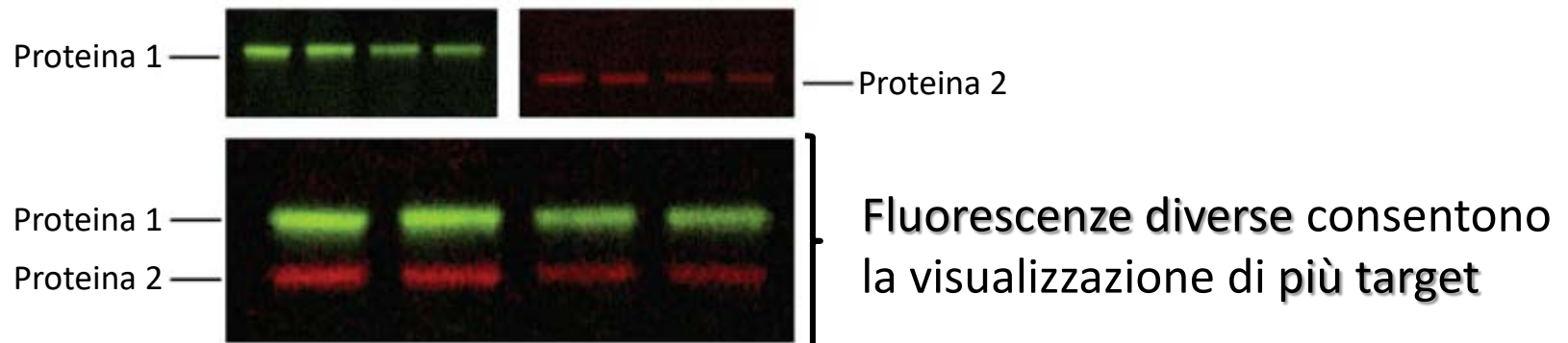
Anticorpi marcati con cianine

- Adatti al Western Blot.
- Sistema **stabile** per **settimane**.
- **Risparmio** di tempo e denaro.
- Si ottengono **immagini digitalizzate**.



e.....

- No incubazione con substrati o esposizione di lastre
- **Rilevazione** di **target multipli** nello stesso Western Blotting



Variazioni del Western Blotting

Trasferimento con nuovi sistemi per aumentare sensibilità e ridurre i tempi di lavoro.



Sistemi per velocizzare Blocking e incubazioni anticorpali.



Anticorpi marcati con cianine (emissione in fluorescenza) anziché enzimi.



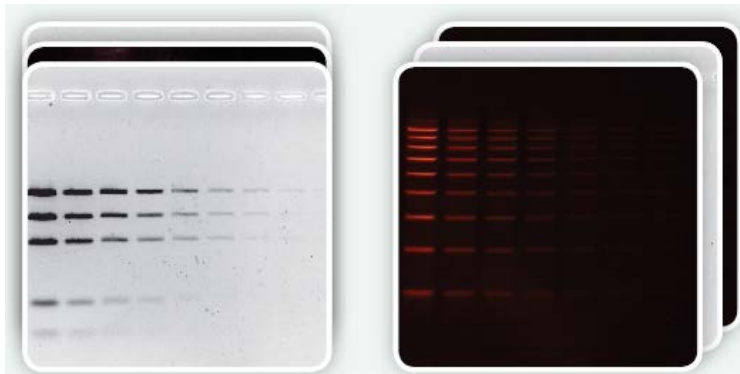
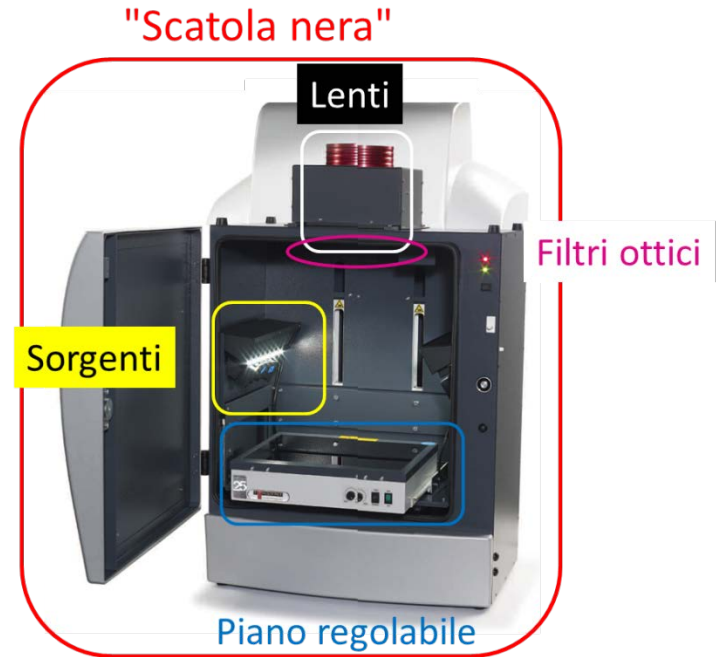
Rilevazione con sistemi di acquisizione digitale delle immagini.



Ciò permette di **abbandonare la camera oscura.**

Sistemi per Imaging

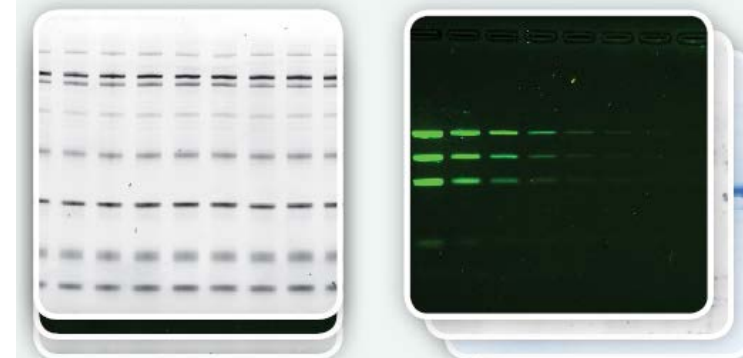
Opportune combinazioni di lampade e filtri permettono di lavorare nell'UV, Visibile, e IR.



Intercalanti DNA



Blue Coomassie



Stain-free

Ab fluorescenti

Applications

Chemiluminescence

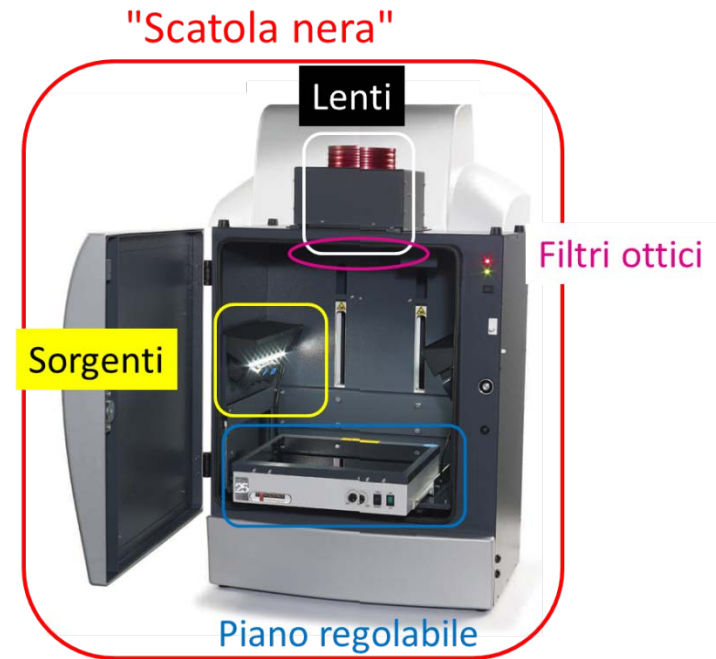
Fluorescence*

Colorimetry/densitometry

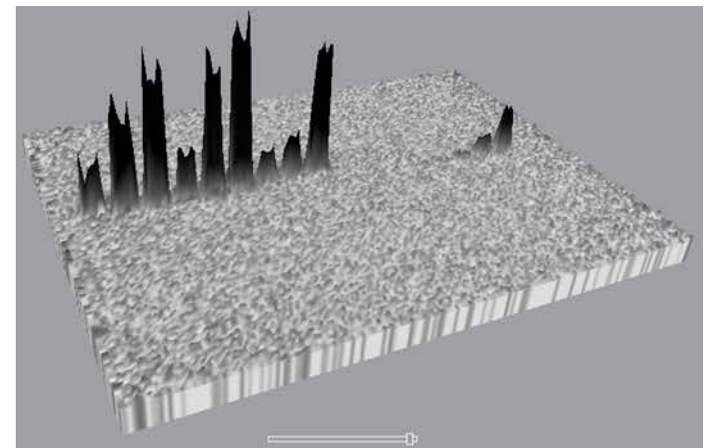
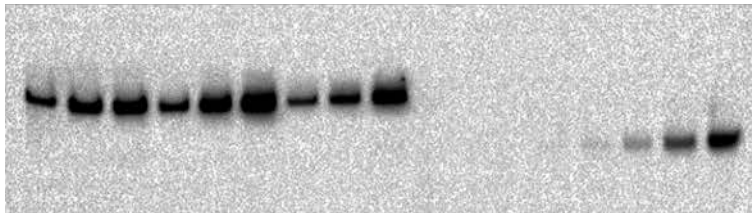
Gel documentation

Sistemi per Imaging

Opportune combinazioni di lampade e filtri permettono di lavorare nell'UV, Visibile, e IR.



Rilevazione in chemiluminescenza



Sistemi per Imaging

Opportune combinazioni di lampade e filtri permettono di lavorare nell'UV, Visibile, e IR.

