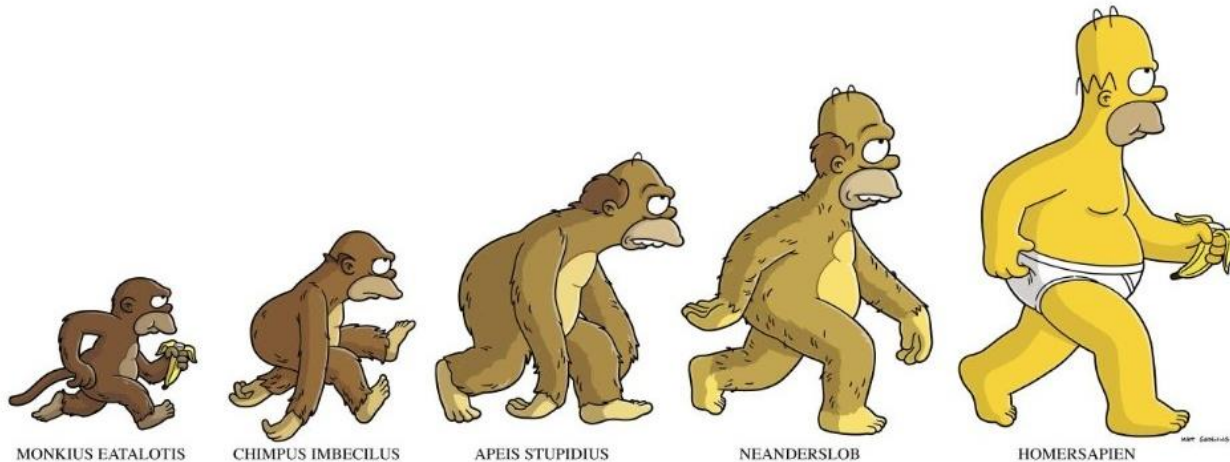
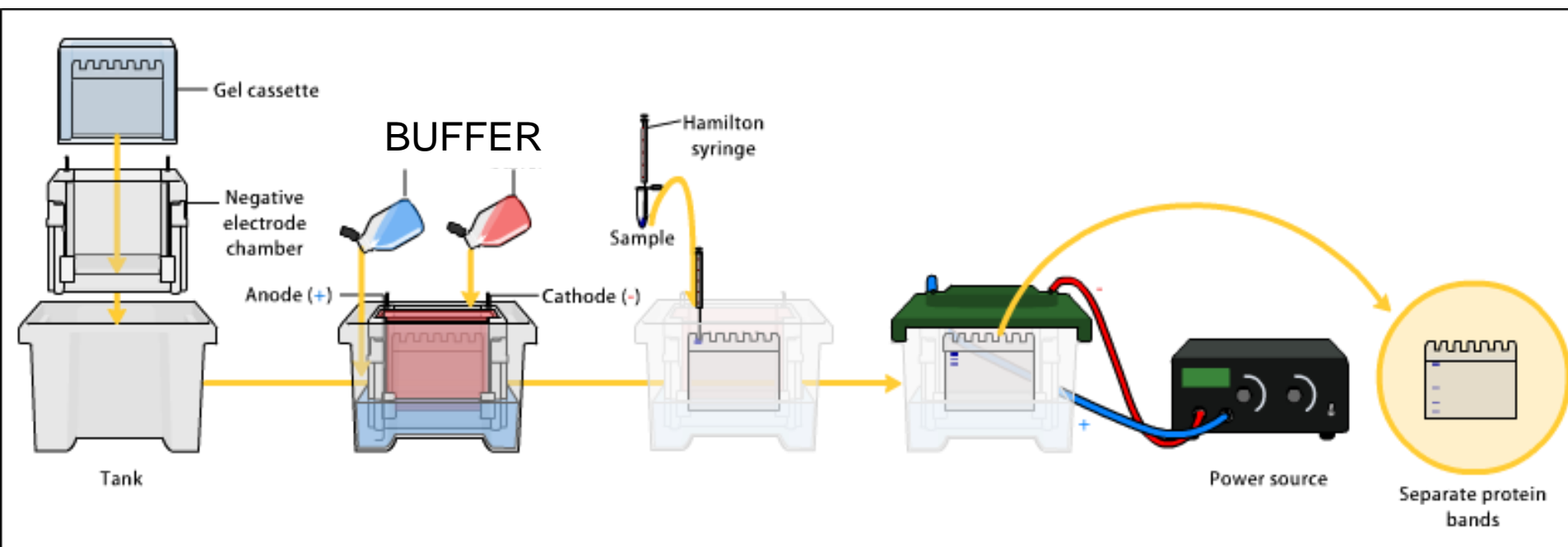
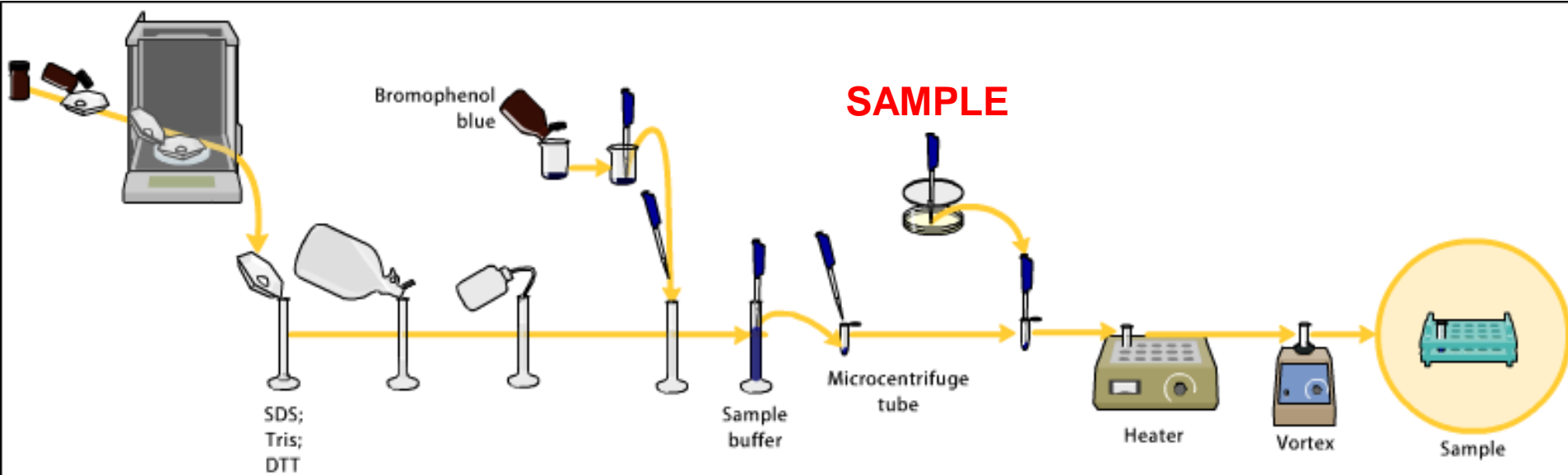


# EVOLUZIONE DEL WESTERN BLOTTING



HOMERSAPIEN

# Western Blotting (1979-2008)



# Western Blottin

Transfer

Block unbound membrane sites

Incubate with primary antibody

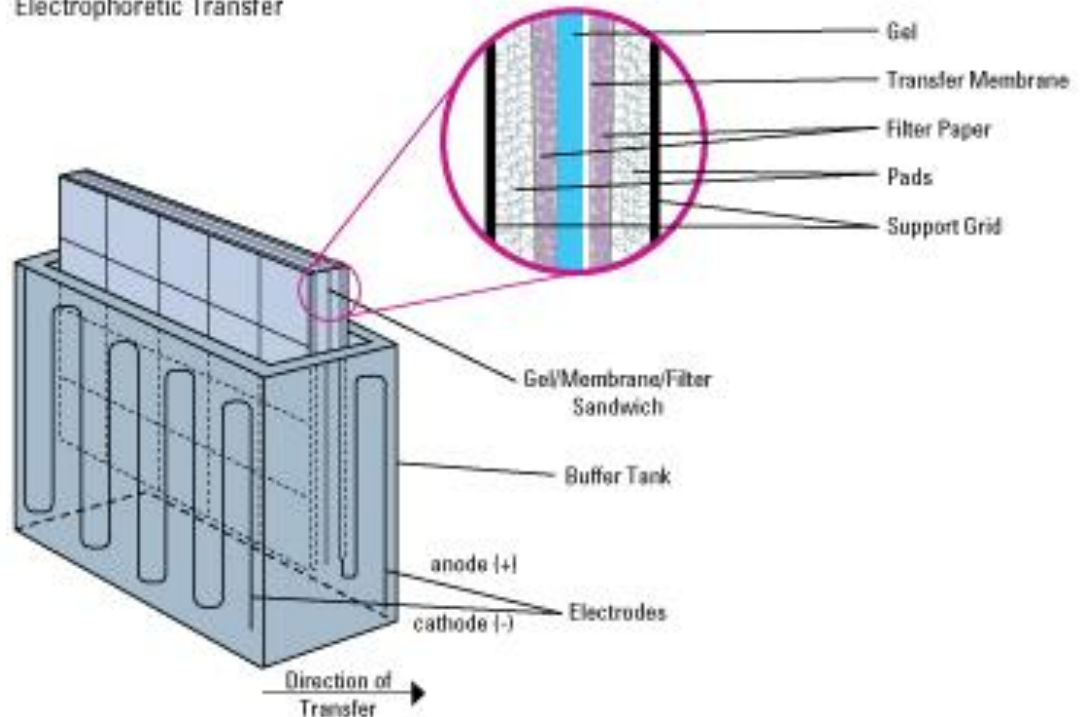
Wash

Incubate with conjugated secondary antibody or ligand

Wash

Develop signal based on color or chemiluminescence

Electrophoretic Transfer



**Tutto avviene in opportuni tamponi.**

# Rilevazione



Luminolo



Lastre fotografiche

# Esposizione delle lastre in camera oscura



**Sviluppo e fissaggio**

# Variazioni del Western Blotting

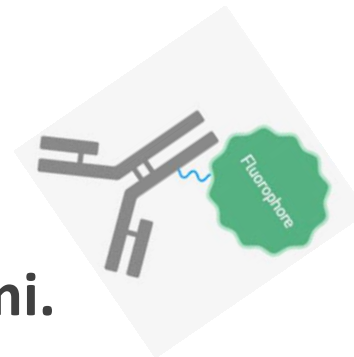
**Trasferimento** con nuovi sistemi per aumentare sensibilità e ridurre i tempi di lavoro.



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.

# Funzionamento trasferimento classico

# FILMATO

<https://www.youtube.com/watch?v=VgAuZ6dBOfs>



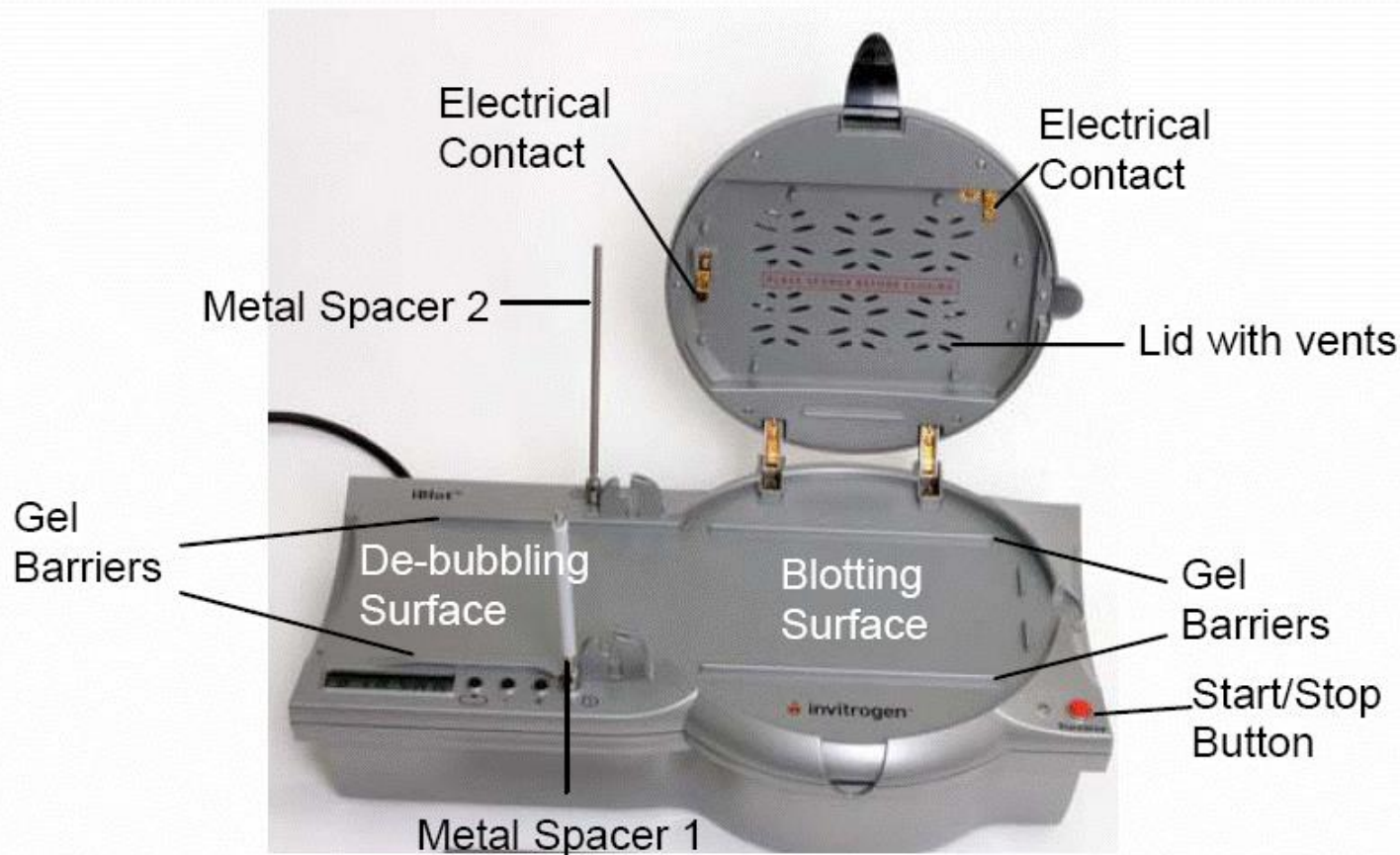
# Trasferimento con iBlot dry blotting system

 **invitrogen™**  
part of *life* technologies™



Sistema per il trasferimento di proteine su membrane, rapido (7-13 minuti) e **privo di tamponi** e **metanolo**.

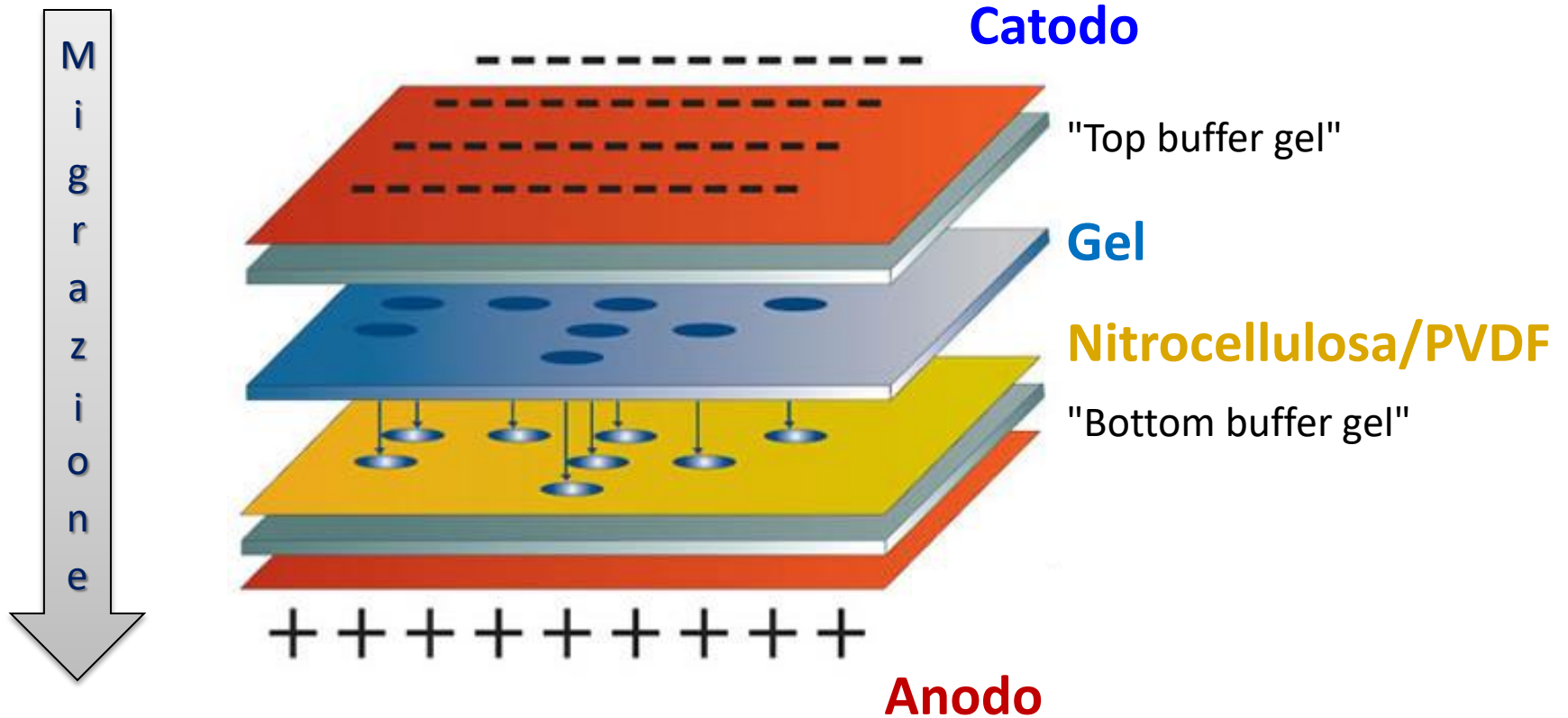
# Trasferimento con iBlot dry blotting system



Sistema per il trasferimento di proteine su membrane,  
rapido (7-13 minuti) e **privo di tamponi** e **metanolo**.

# iBlot dry blotting system

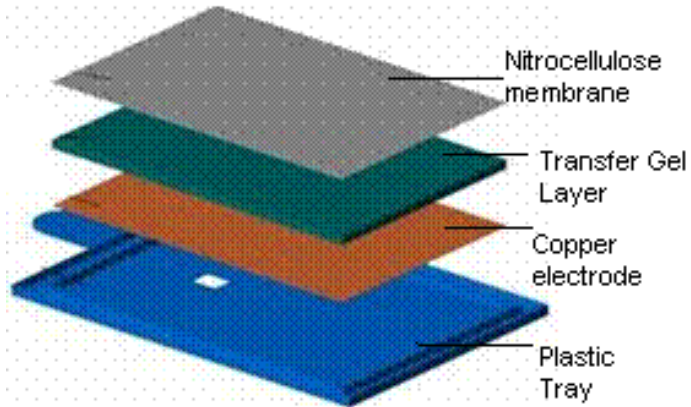
**ASSENZA DI TAMPONI**



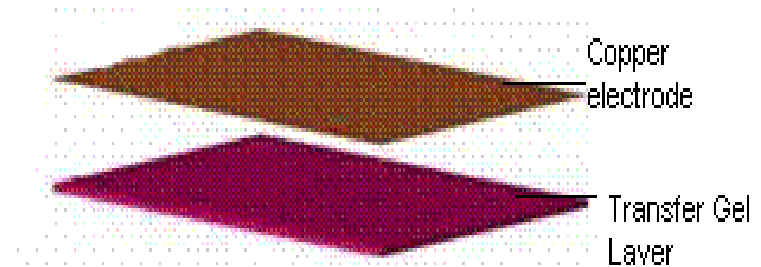
**BASATO SEMPRE SU UNA ELETTROFORESI**

## Anodo iBlot

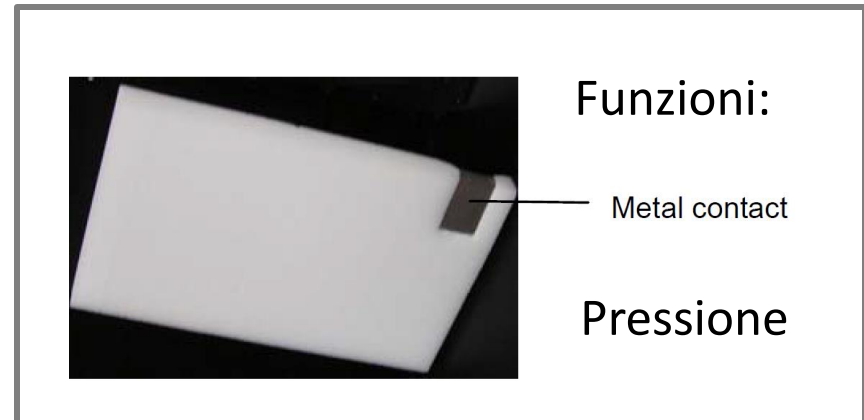
Contiene un elettrodo di **rame**, il "**Bottom Transfer Gel**" ed una membrana di nitrocellulosa (0,2  $\mu\text{m}$ ) o PVDF. La membrana **non** richiede alcun pretrattamento prima dell'uso.



## Catodo iBlot



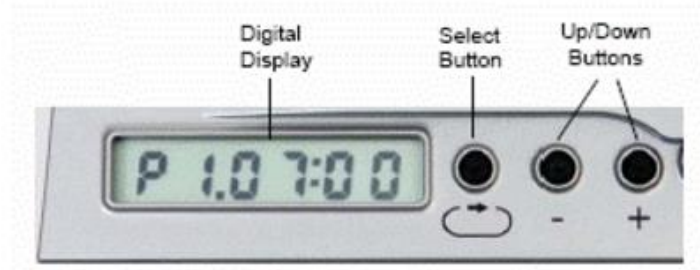
Contiene un elettrodo di **rame** e lo strato di "**Top Transfer Gel**".



Il "**Transfer Gel**" agisce come un **serbatoio di ioni** ed ha una composizione **brevettata** ottimizzata per garantire il blot ad alta qualità in soli 7 minuti.

# iBlot dry blotting system

## Programmi



Program	Volt	Default Run Time	Run Time Limit
P1	25	6 minutes	10 minutes
P2	23	6 minutes	11 minutes
P3	20	6 minutes	13 minutes
P4	15	6 minutes	16 minutes
P5	10	6 minutes	25 minutes

Programmi pre-impostati con diversi voltaggi e tempi da combinare in funzione delle necessità di trasferimento

# iBlot dry blotting system

## Efficienza

**iBlot**



**Normale elettroBlot**



**EFFICIENZA DI TRASFERIMENTO UGUALE O SUPERIORE  
AL METODO CLASSICO**

# Funzionamento iBlot

## FILMATO

1) [https://www.youtube.com/watch?v=d5\\_nZyj72us](https://www.youtube.com/watch?v=d5_nZyj72us)

2) <https://www.youtube.com/watch?v=3LqGnkfcZvU>

# iBlot dry blotting system

## Pro e Contro

### PREGI

- Trasferimento **molto rapido**.
- **Efficienza** del Blot.
- **Assenza di composti nocivi**.
- Strumento relativamente economico.

### DIFETTI

- **Costi** elevati dei consumabili.
- Poco efficiente con proteine ad **alto PM**.



# Trans-Blot Turbo

BIO-RAD

Turbo Transfers



Intuitive Interface



System Flexibility



High Throughput



Ready-to-use  
Prepacked  
Consumables



Superior Transfer Efficiency



# Trans-Blot Turbo

## Caratteristica principale

- Per il trasferimento da MINI (7.0 x 8.5 cm) o MIDI gel (13.5 x 8.5 cm).
- **Non contiene metanolo.**
- **Trasferimento rapidissimo (3'-10').**
- Cassette indipendenti.
- Protocolli predefiniti (ma modificabili).



Sistema **ultrarapido (3'-10')** per il trasferimento di proteine da gel a membrane, in **assenza di metanolo**.

# Trans-Blot Turbo



LCD display

Navigation buttons



Alphanumeric keypad

Cassette bay A (upper)

Cassette bay B (lower)

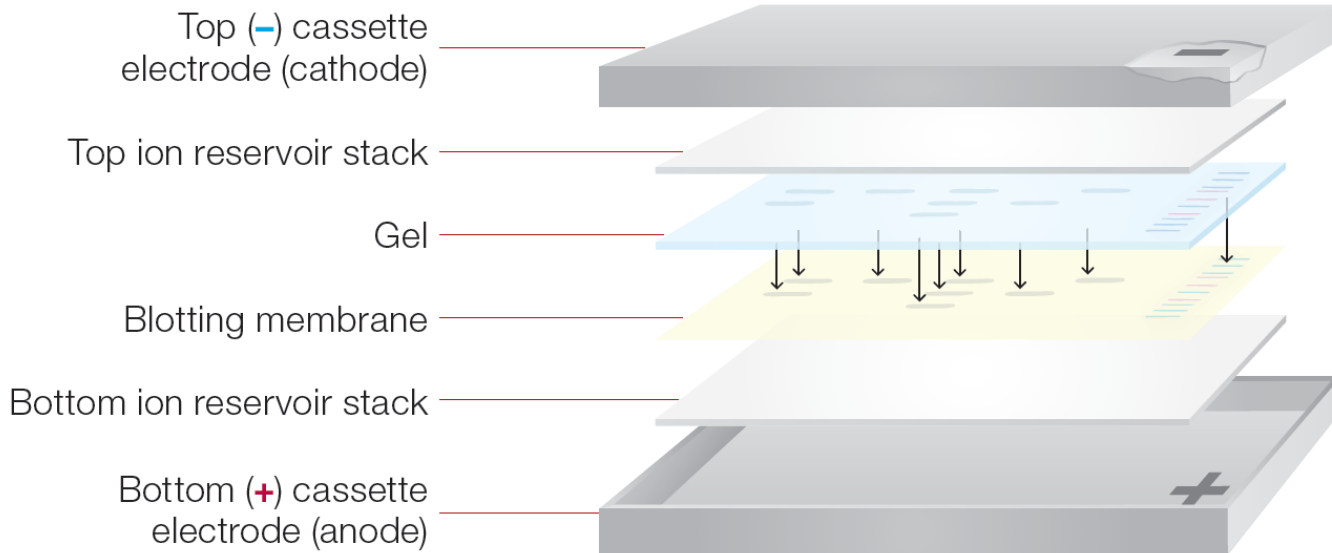
Possibilità di effettuare 2 trasferimenti contemporaneamente o sfasati nel tempo.

# Trans-Blot Turbo

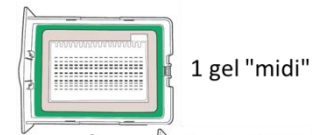
## Sistema elettroforetico



Coperchio con catodo



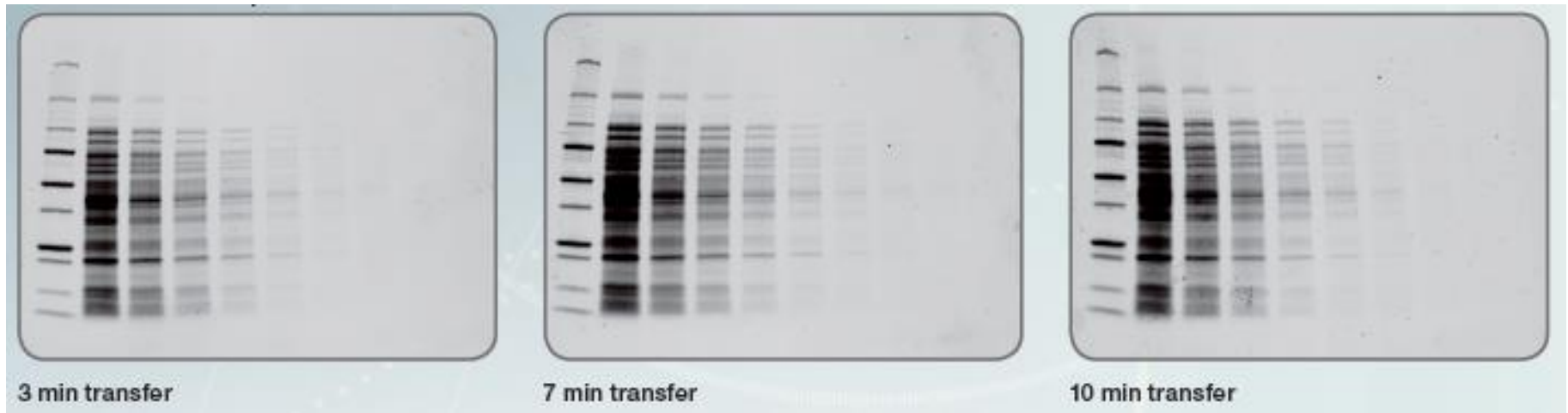
Base con anodo



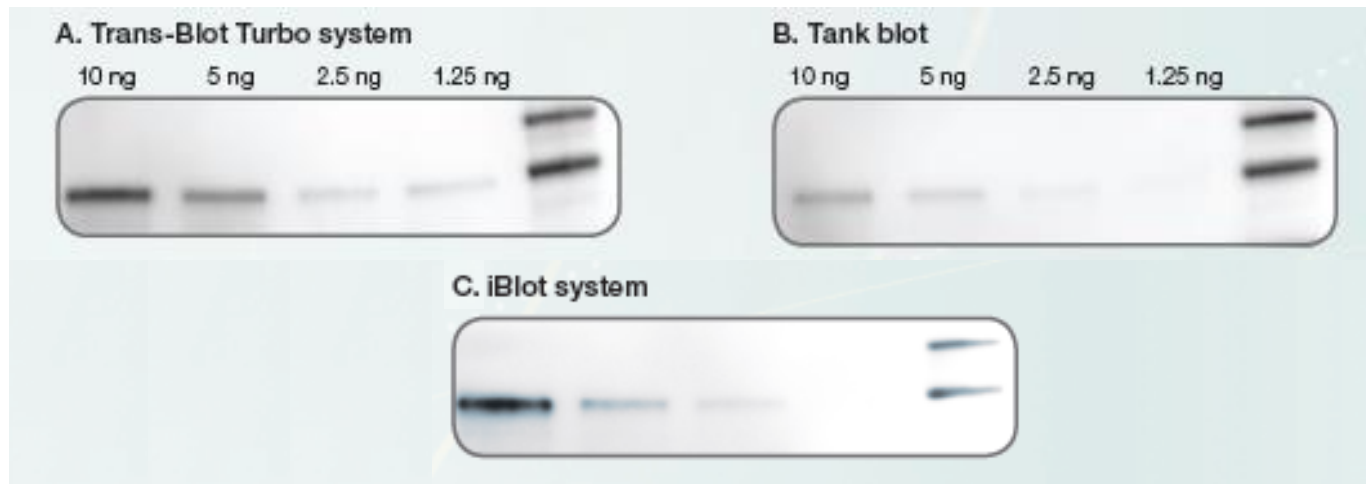
Serbatoi di ioni consentono il trasferimento dal gel alla membrana  
Anodo e catodo sono costituiti dalle pareti delle due cassette

# Trans-Blot Turbo

## Prestazioni



## Diluizioni seriali di proteina caricate su gel 4-20%



A, Trans-Blot Turbo system (25 V for 7 min); B, Tank blotting (100 V for 30 min) C, iBlot (P3 for 7 min).

# Funzionamento Trans-Blot Turbo

# FILMATO

<https://www.youtube.com/watch?v=e5UUjkmchCY>

# Trans-Blot Turbo

## Pro eo Contro

### PREGI

- Trasferimento rapidissimo.
- Efficienza del Blot forse superiore all'iBlot.
- Assenza di composti nocivi.
- Consumabili economici.

### DIFETTI

- Costo di acquisto dello strumento.
- Utilizzabile solo nel trasferimento

# 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.



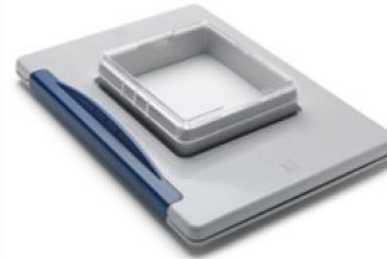
Rilevazione con sistemi di acquisizione digitale delle immagini.



Ciò permette di abbandonare la camera oscura.



# SNAP 2.0



Sistema rapidissimo (30 minuti) per fasi di **Blocking**, **incubazioni anticorpali** e **lavaggi**

# SNAP

## Tempistiche



### SISTEMA CLASSICO

### SNAP

Transfer



Block unbound membrane sites



Incubate with primary antibody



Wash



Incubate with conjugated secondary antibody or ligand



Wash



Develop signal based on color or chemiluminescence

Saturazione  
(Blocking)

Ab 1<sup>ario</sup>

Lavaggio

Ab 2<sup>ario</sup>

Lavaggio

1-8h

≥1 h

20 min

~1 h

20 min

**8-12 h**

**20 secondi**

10 min

1 min

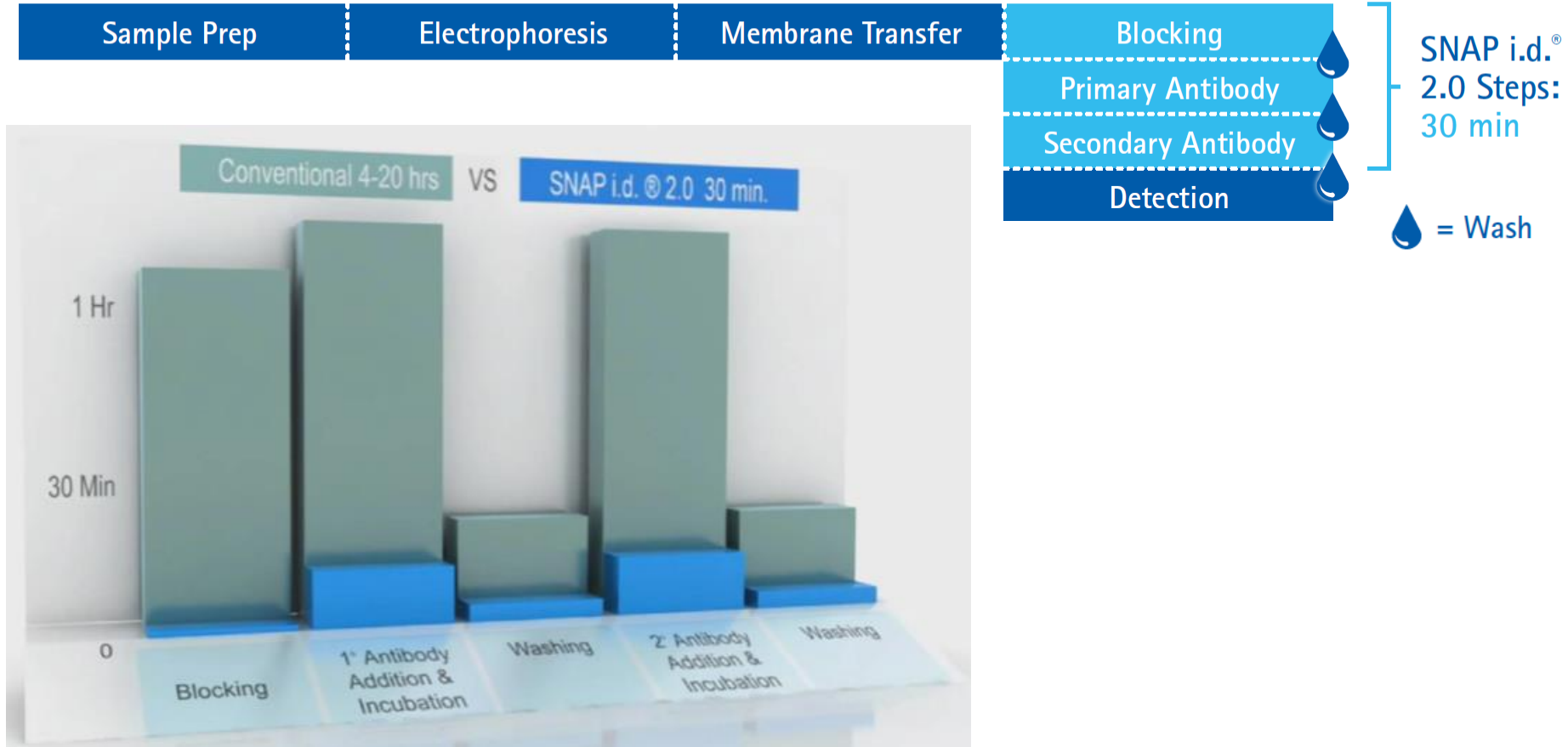
10 min

1 min

**Max 30 min**

# Utilizzo dello SNAP

SNAP i.d.<sup>®</sup> 2.0 system in the Western blotting workflow

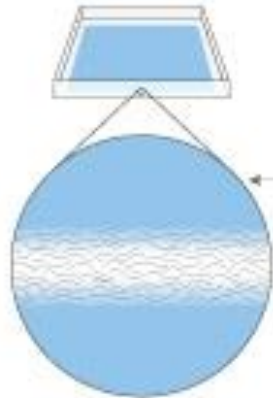


Consente di ridurre significativamente i tempi grazie ad un sistema di aspirazione

# Funzionamento dello SNAP

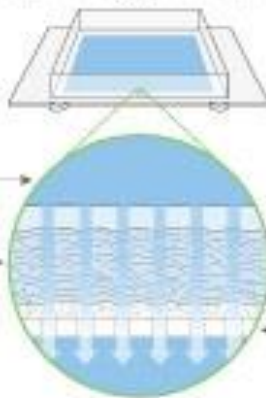
## Fase di Blocking

TRADITIONAL WESTERN BLOT  
(Passive reagent transport)

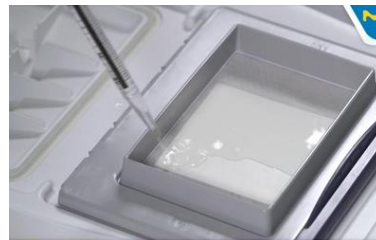


DIFFUSION

SNAP i.d. System  
(Active reagent transport)



VACUUM



Standard Western Blot  
5% NFDM (Nonfat Dry Milk)

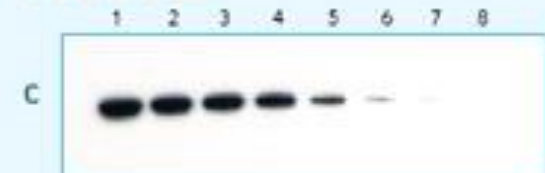


SNAP i.d. Protein  
Detection System

0.5% NFDM



0.1% NFDM



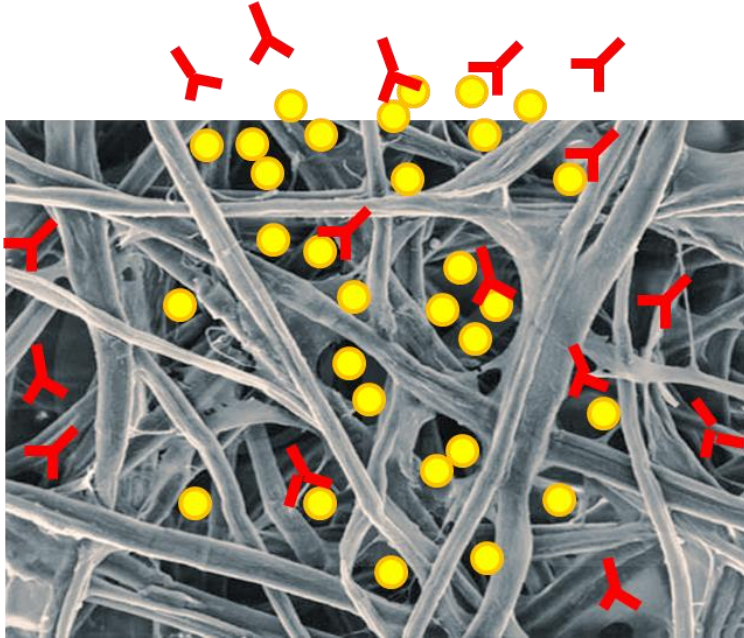
0.05% NFDM



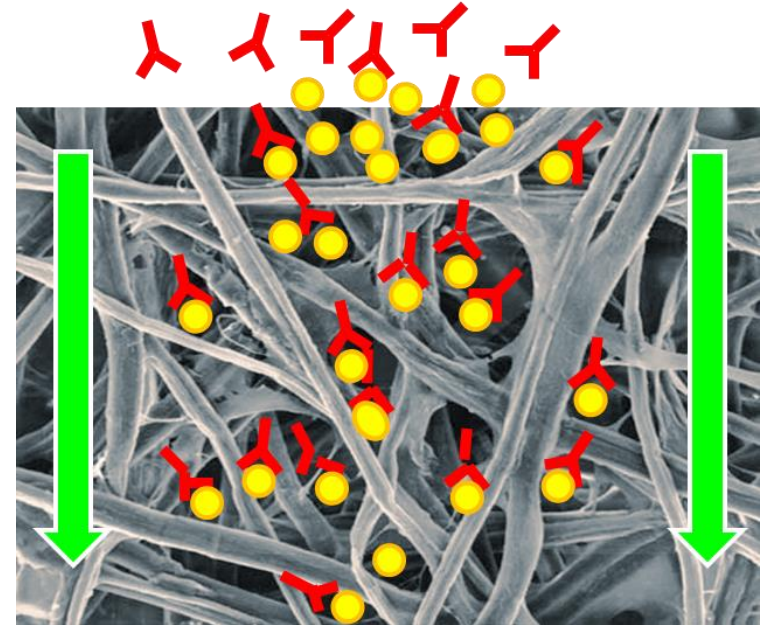
Lo SNAP garantisce che i pori della membrana siano adeguatamente bloccati e lavati

# Funzionamento dello SNAP

## Incubazione con gli anticorpi



Nel Western **tradizionale** la membrana è sottoposta a fasi di **diffusione**.



Lo **SNAP** aumenta l'esposizione delle proteine intrappolate nella membrana  
L'anticorpo in eccesso viene spinto all'esterno della membrana con **riduzione** del **background**

# Funzionamento dello SNAP

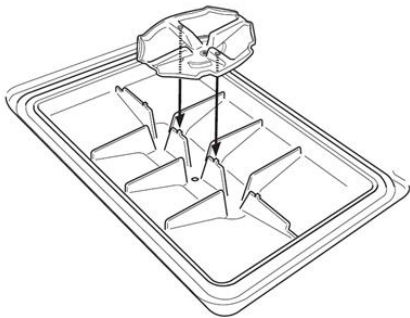
## Incubazione con gli anticorpi

Gli anticorpi possono essere recuperati

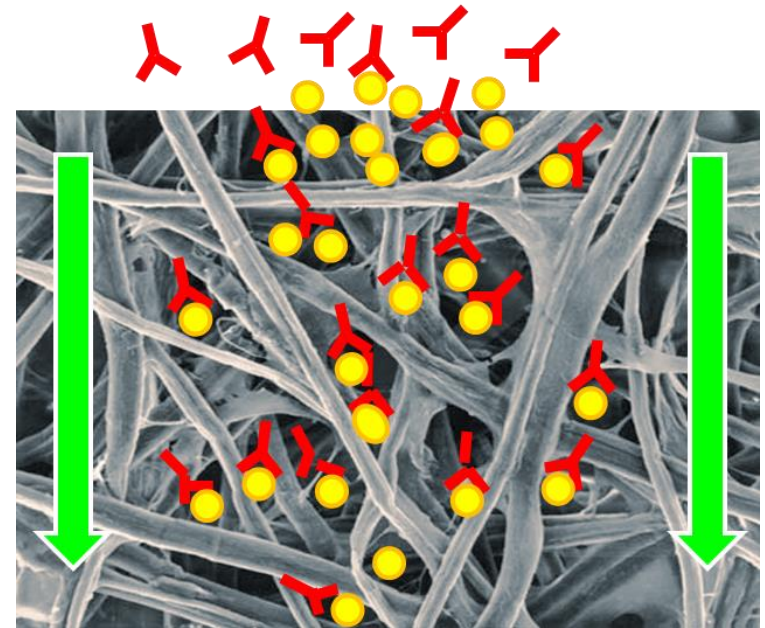
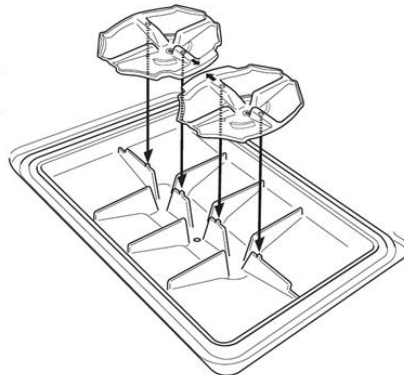


Vassoio per il recupero degli anticorpi.

Position of antibody tray  
for single well blot holder:



Position of antibody trays  
for double well blot holder:



Lo **SNAP** aumenta  
l'esposizione delle proteine  
intrappolate nella membrana  
L'anticorpo in eccesso viene  
spinto all'esterno della  
membrana con  
**riduzione** del **background**

# Funzionamento Snap 2.0

# FILMATO

<https://www.youtube.com/watch?v=65x1O71GRPc>

# 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.



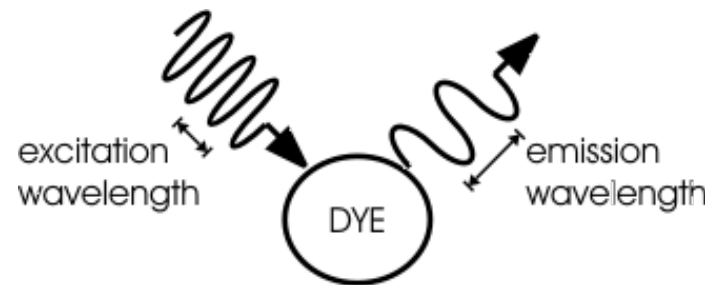
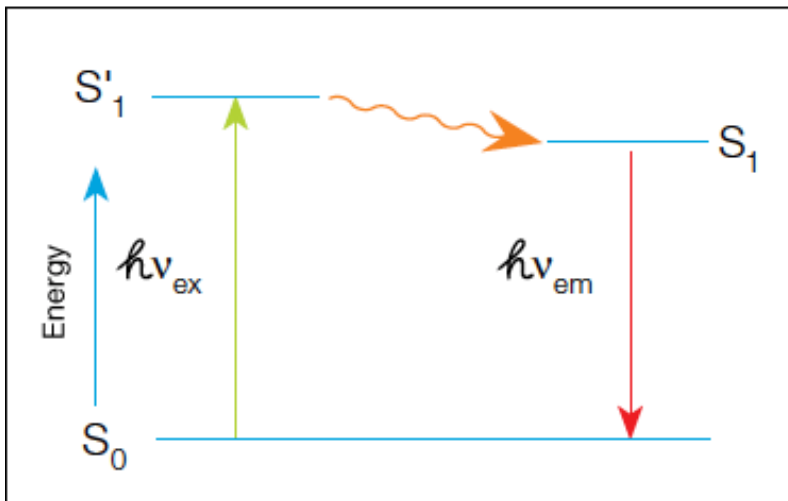
Ciò permette di abbandonare la camera oscura.



# Fluorescenza



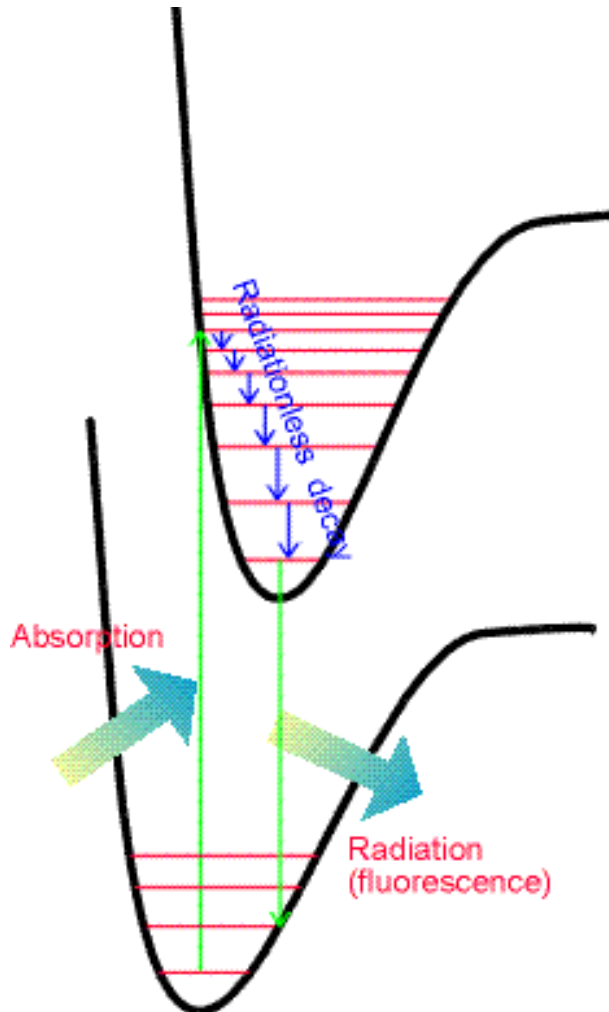
Assorbimento da parte di una **molecola** di una radiazione con **emissione** di un'altra radiazione a **lunghezza d'onda maggiore**



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

# SPOSTAMENTO DI STOKES

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

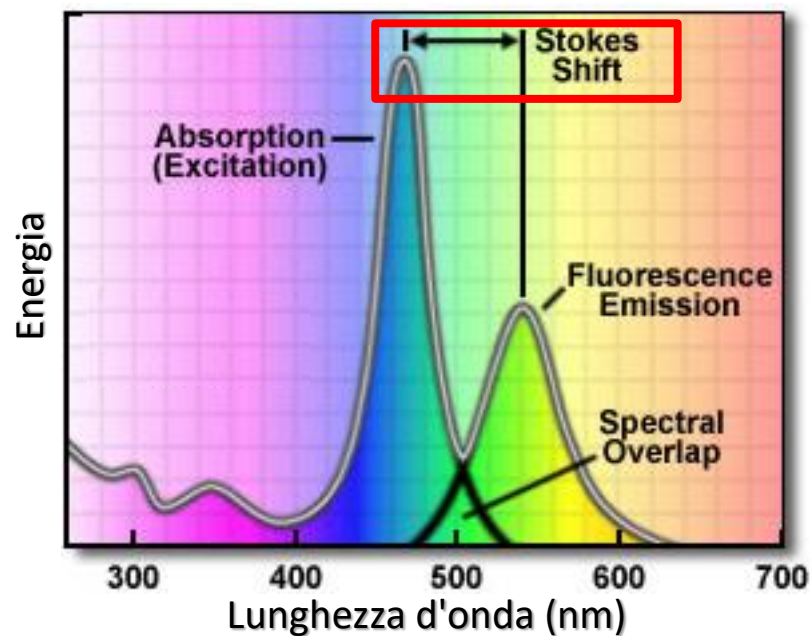
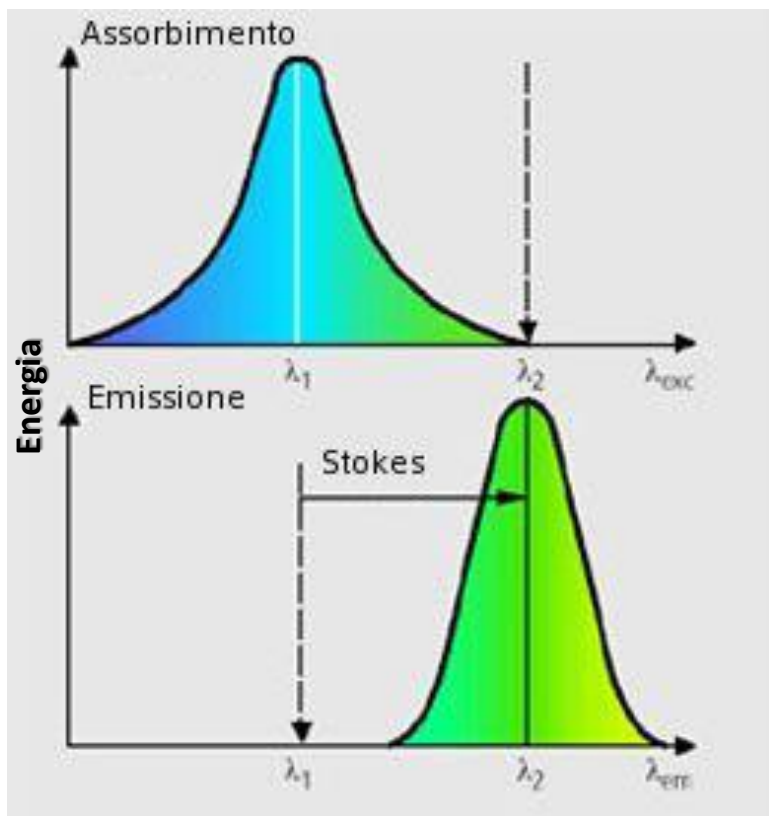


Tale aumento è definito ***spostamento (shift) di Stokes***.

Assorbimento di un quanto di energia ( $h\nu$ ) che porta la molecola in uno stato eccitato da cui può tornare nello stato fondamentale con una o più **transizioni successive**.

# 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.

# SUBSTRATI FLUOROGENICI

## Studi funzionali di attività enzimatica

A fluorogenic substrate for the for the amidolytic assay of factor Xa and for reactions in which factor Xa is generated.

Formula:  $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{-D-CHA-Gly-Arg-AMC.AcOH}$

Molecular Weight: 679.8 D

Chemical Name: methylsulfonyl-D-cyclohexylalanyl-glycyl-arginine-7-amino-4-methylcoumarin acetate salt

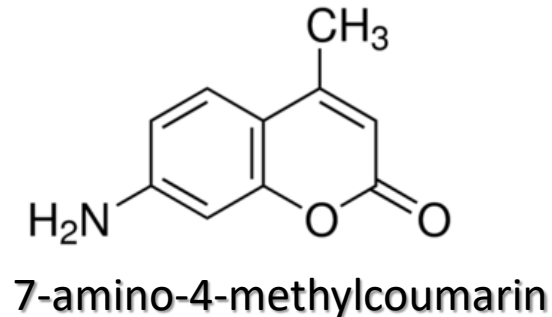
Composition: Enzymatically digestible substrate colyophilized with glycine excipient

Purity:  $\leq 0.5\%$  free AMC

Solubility:  $\geq 10$  mM in distilled/deionized water

Optical Characteristics:

Absorption Maximum Wavelength,  $\lambda_{\text{Abs}}$ : 342 nm  
Emission Maximum Wavelength,  $\lambda_{\text{Em}}$ : 440 nm



### Assay Conditions/Substrate Kinetics

Enzyme activity is determined by measuring the increase in fluorescence of the free fluorophore (AMC) generated, in comparison to the original substrate, per unit time at  $\lambda_{\text{Em}}$  440 nm.

# SUBSTRATI FLUOROGENICI

## Studi funzionali di attività enzimatica

A fluorogenic substrate for the amidolytic assay of factor Xa and for reactions in which factor Xa is generated.

Formula: CH3SO2-D-CHA-Gly-Arg-AMC.AcOH

Molecular Weight: 679.8 D

Chemical Name: methylsulfonyl-D-cyclohexylalanyl-glycyl-arginine-7-amino-4-methylcoumarin acetate salt

Composition: Enzymatically digestible substrate colyophilized with glycine excipient

Purity:  $\leq 0.5\%$  free AMC

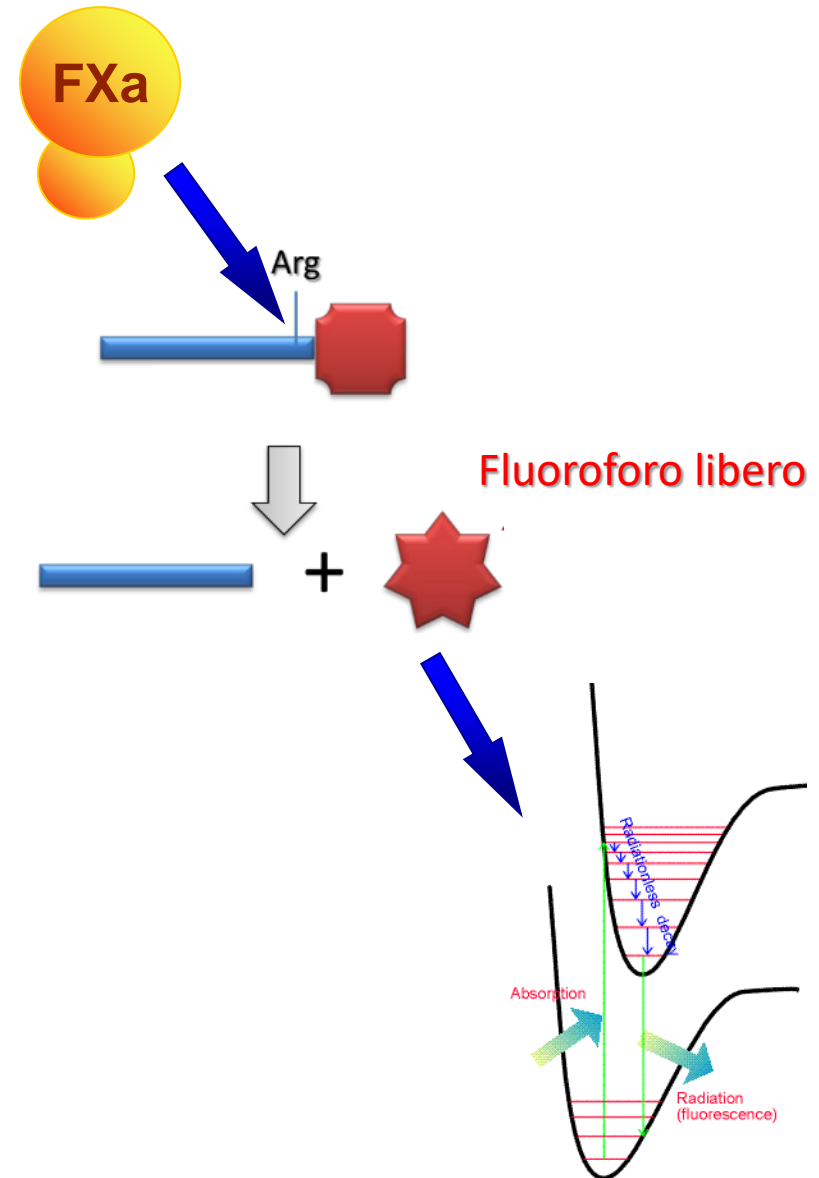
Solubility:  $\geq 10$  mM in distilled/deionized water

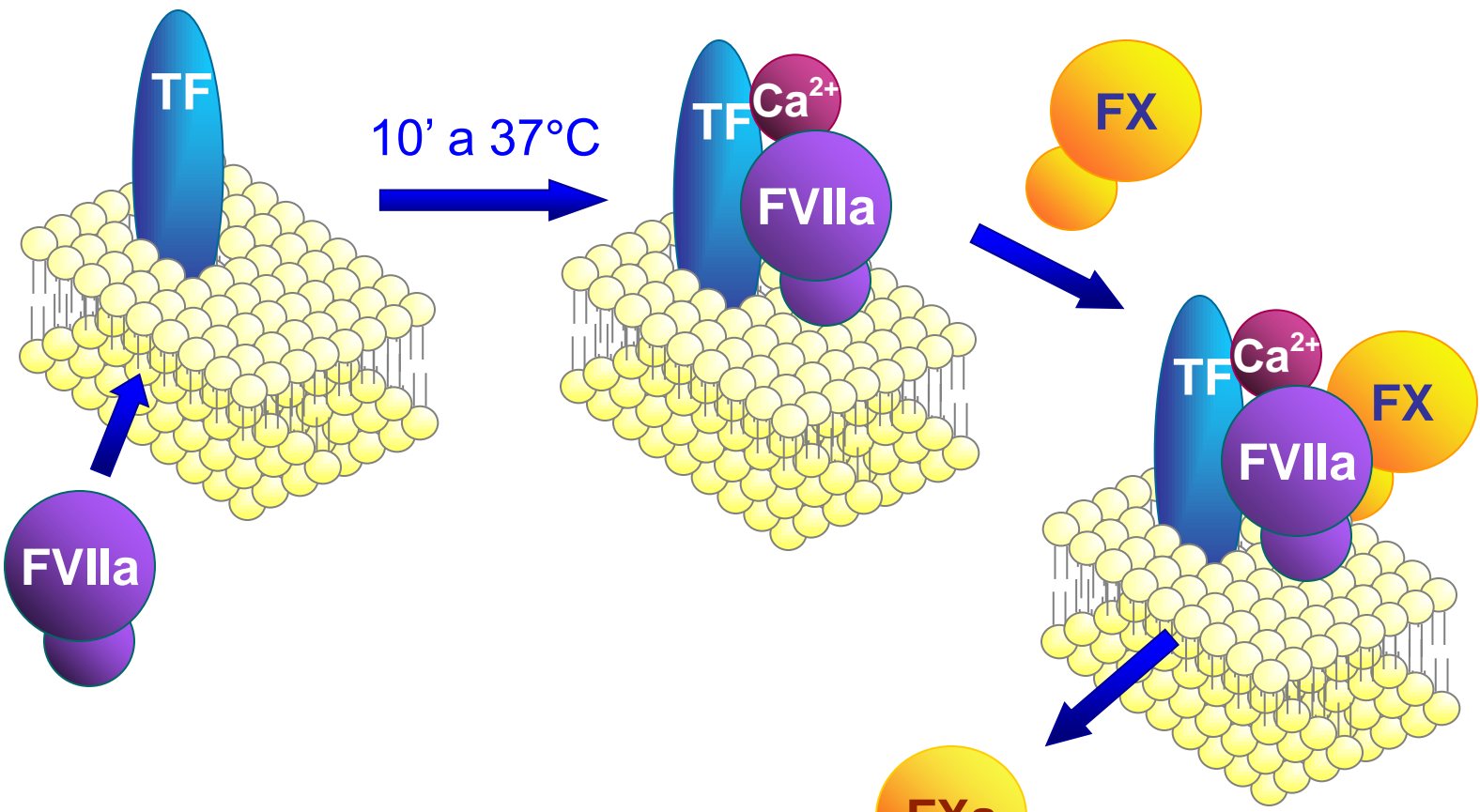
Optical Characteristics:

Absorption Maximum Wavelength,  $\lambda_{Abs}$ : 342 nm  
Emission Maximum Wavelength,  $\lambda_{Em}$ : 440 nm

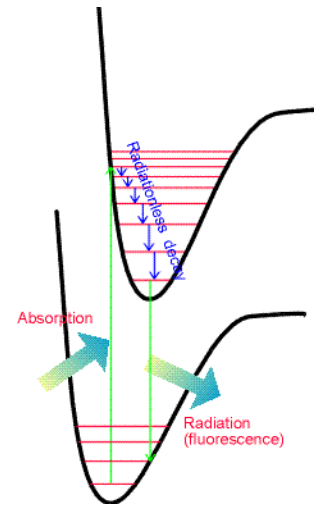
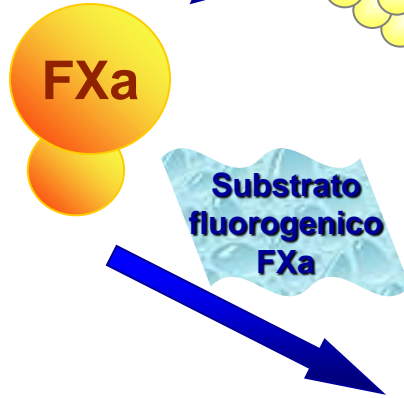
### Assay Conditions/Substrate Kinetics

Enzyme activity is determined by measuring the increase in fluorescence of the free fluorophore (AMC) generated, in comparison to the original substrate, per unit time at  $\lambda_{Em}$  440 nm.



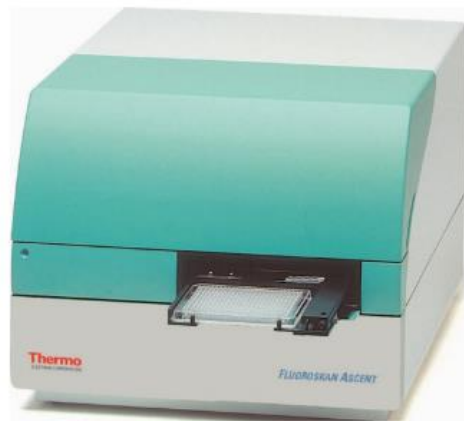
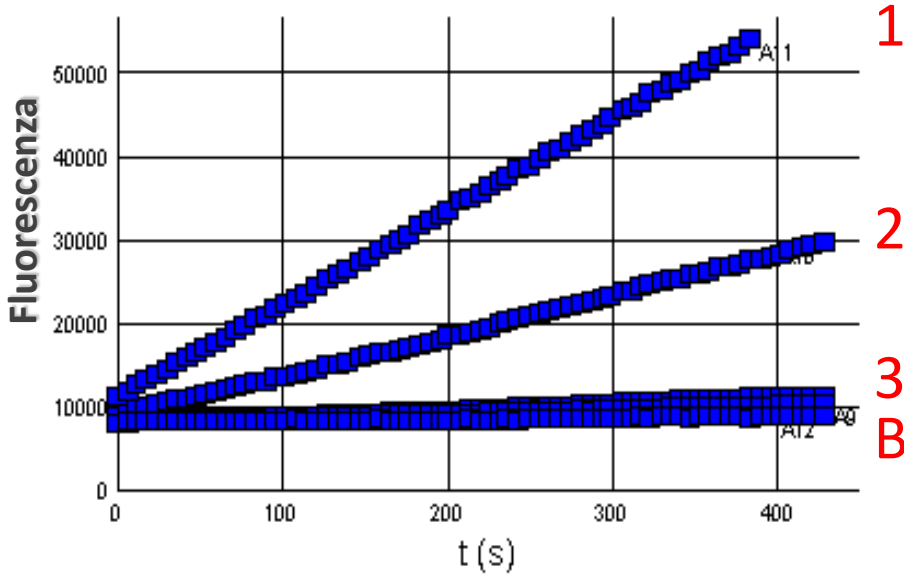


**STUDIO ATTIVITÀ  
ENZIMATICA  
IN VITRO**



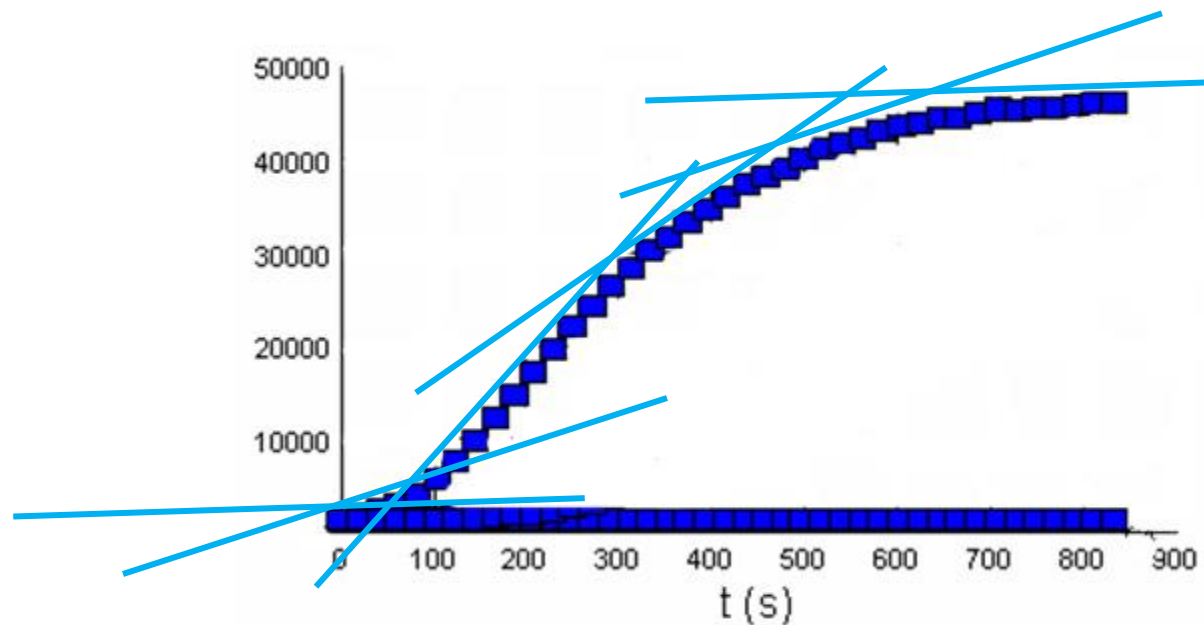
# APPLICAZIONE DELLA FLUORIMETRIA

## Risposta lineare



Fluorimetro

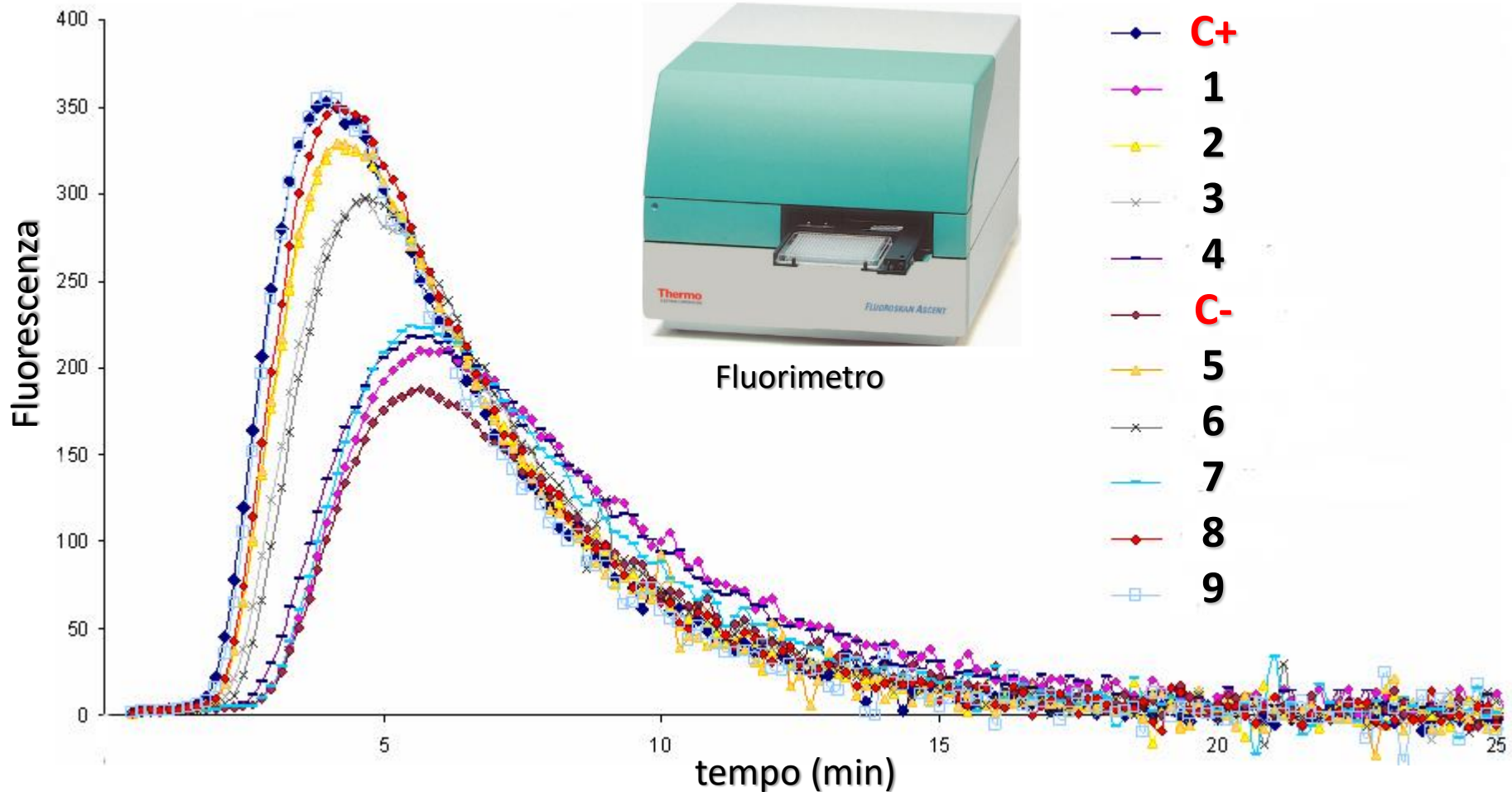
## Risposta sigmoideale



# SUBSTRATI FLUOROGENICI

## Studi funzionali di attività enzimatica

Si calcola la **derivata prima** per poter individuare i massimi, i minimi e l'andamento della funzione.

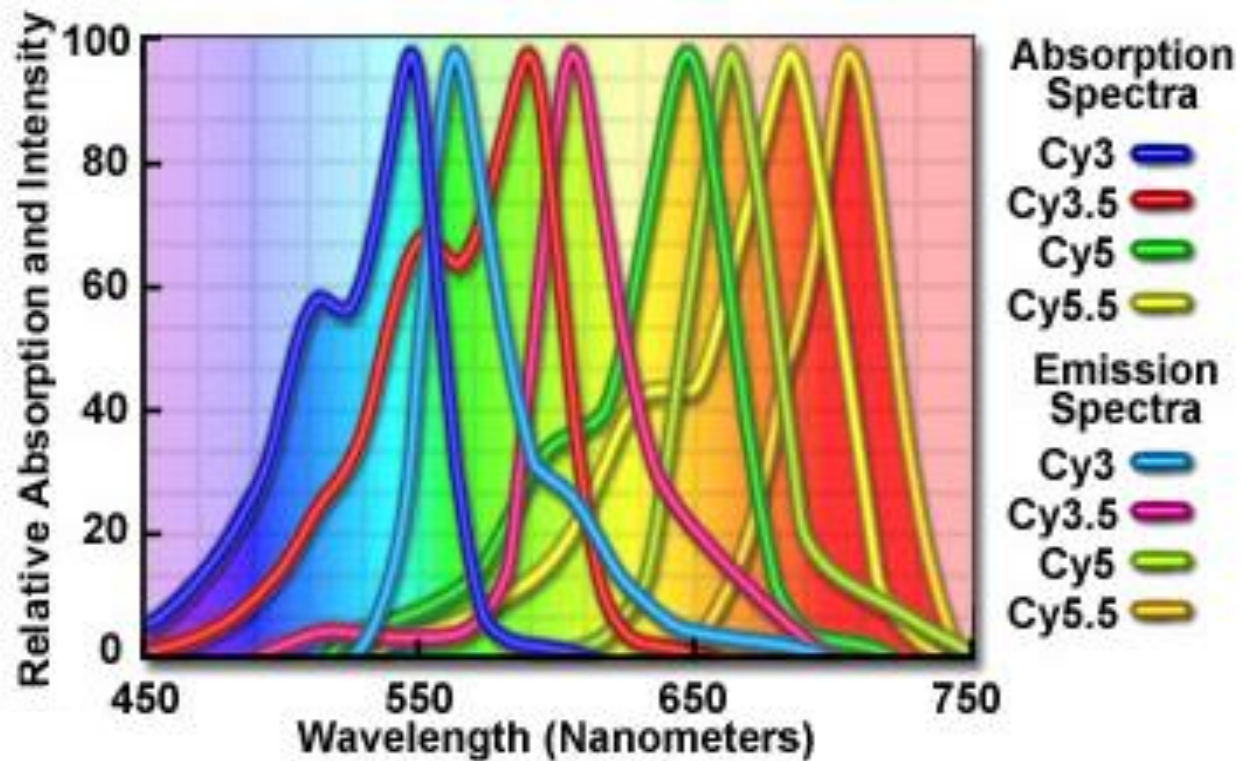
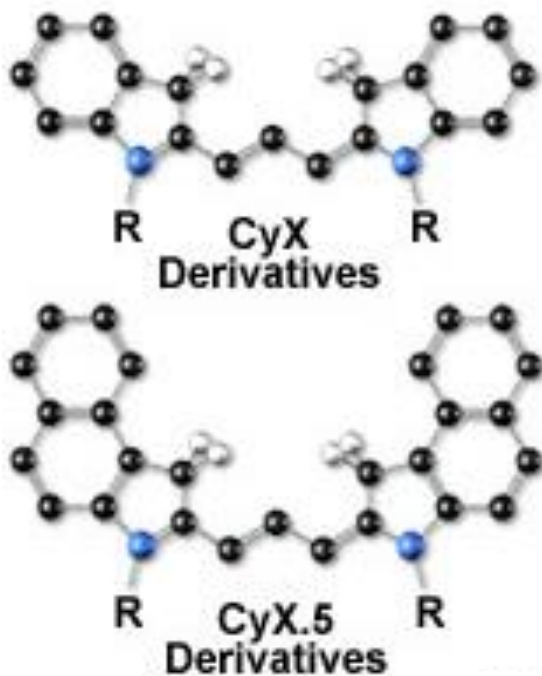




# Cianine

Composti solubili, fluorescenti a basso ingombro sterico.

**Ideali per marcare proteine e DNA**

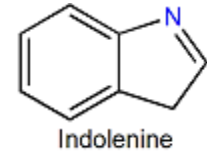


# Cianine

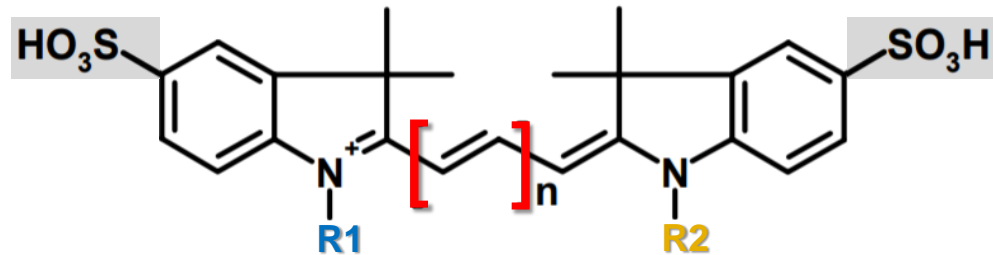
Cy = cyanine

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

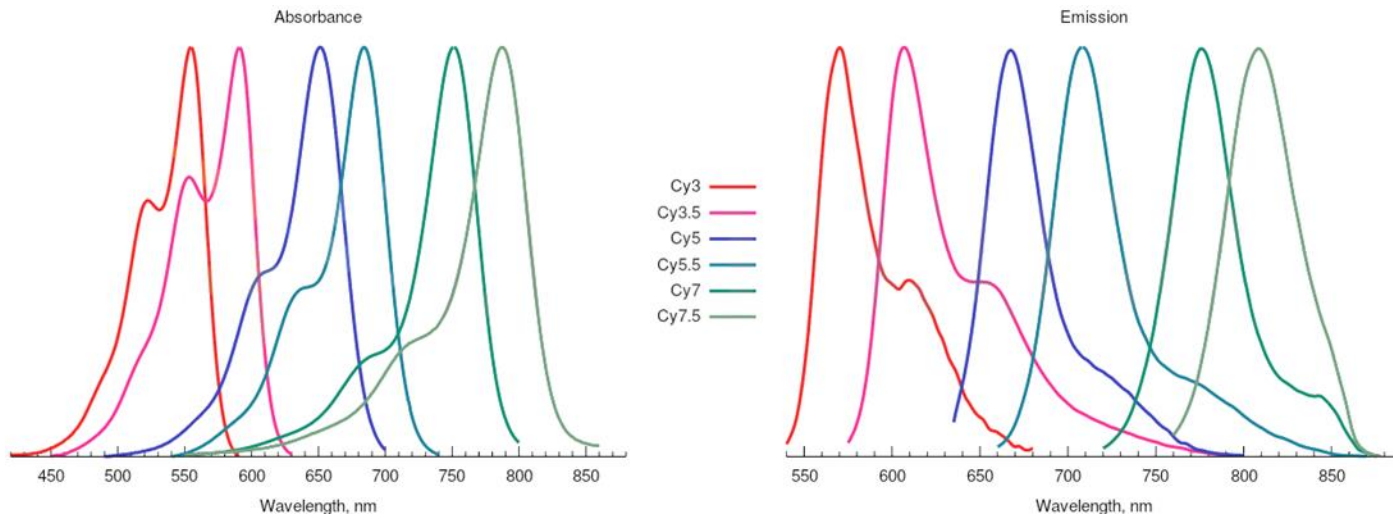
.5 = aggiunta di gruppi benzilici



## Struttura generale di una cianina



## Esempi di spettri di assorbimento/emissione

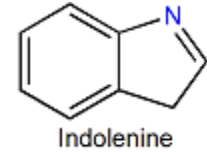


# Cianine

Cy = cianine

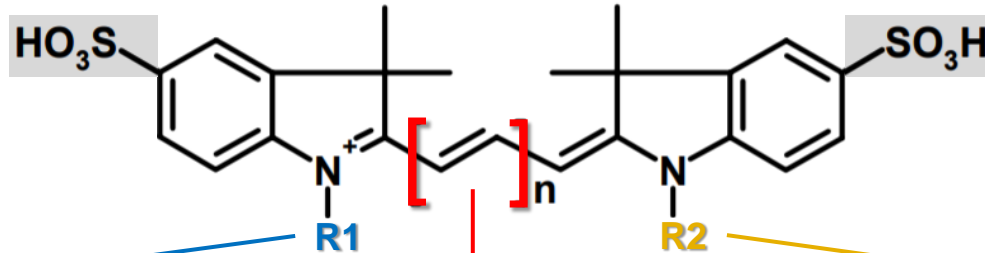
3-5-7 = numero di **atomi di C** presenti tra due gruppi

.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**)

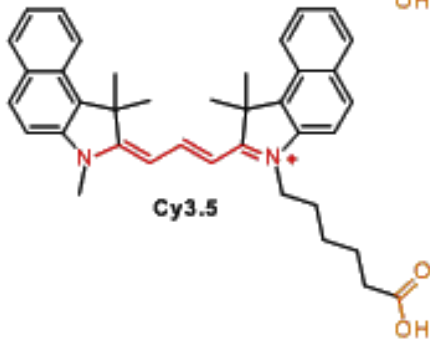
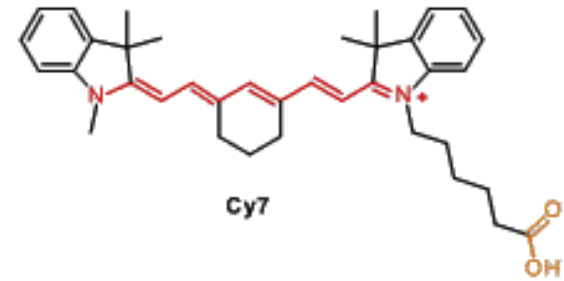
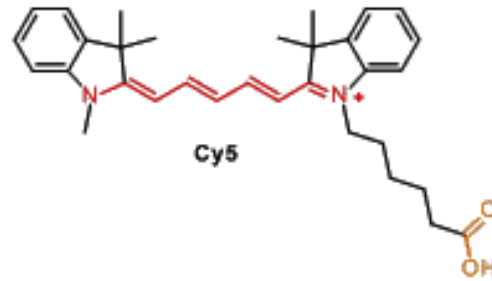
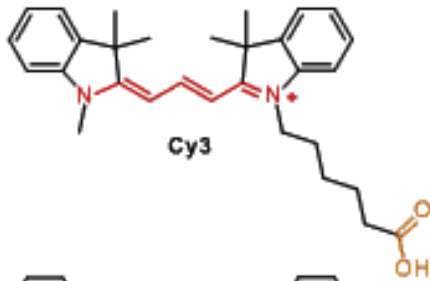
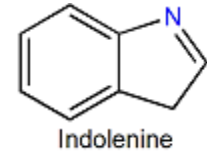
$n = 3$  Cy**7** (**7** atomi di **C**)

# Cianine

Cy = cyanine

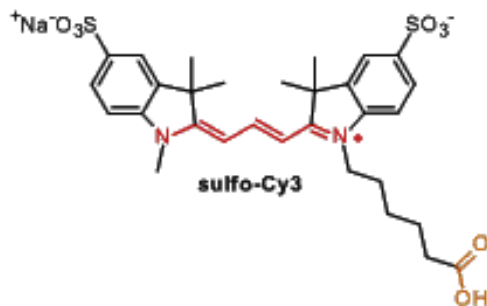
3-5-7 = numero di **atomi di C** presenti tra due gruppi

.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***

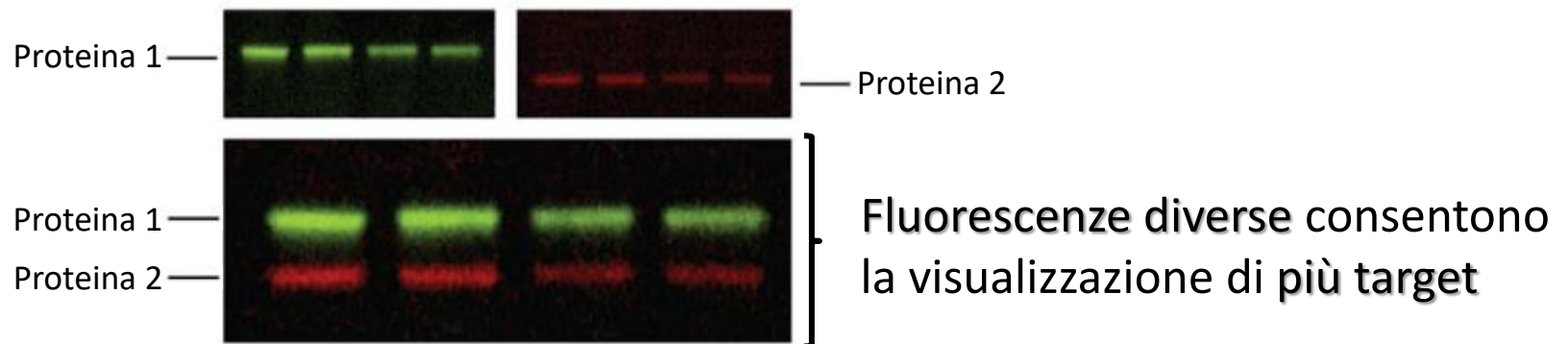
# Anticorpi marcati con cianine

- Adatti al Western Blot.
- Sistema **stabile** per **settimane**.
- **Risparmio** di tempo e denaro.
- Si ottengono **immagini digitalizzate**.
- Sistema con grande **linearità di risposta** alle concentrazioni del campione.



e.....

- No incubazione con substrati o esposizione di lastre
- **Rilevazione** di **target multipli** nello stesso Western Blotting  
(No "stripping" e re-incubazione di Ab per rilevare target multipli)



# 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.

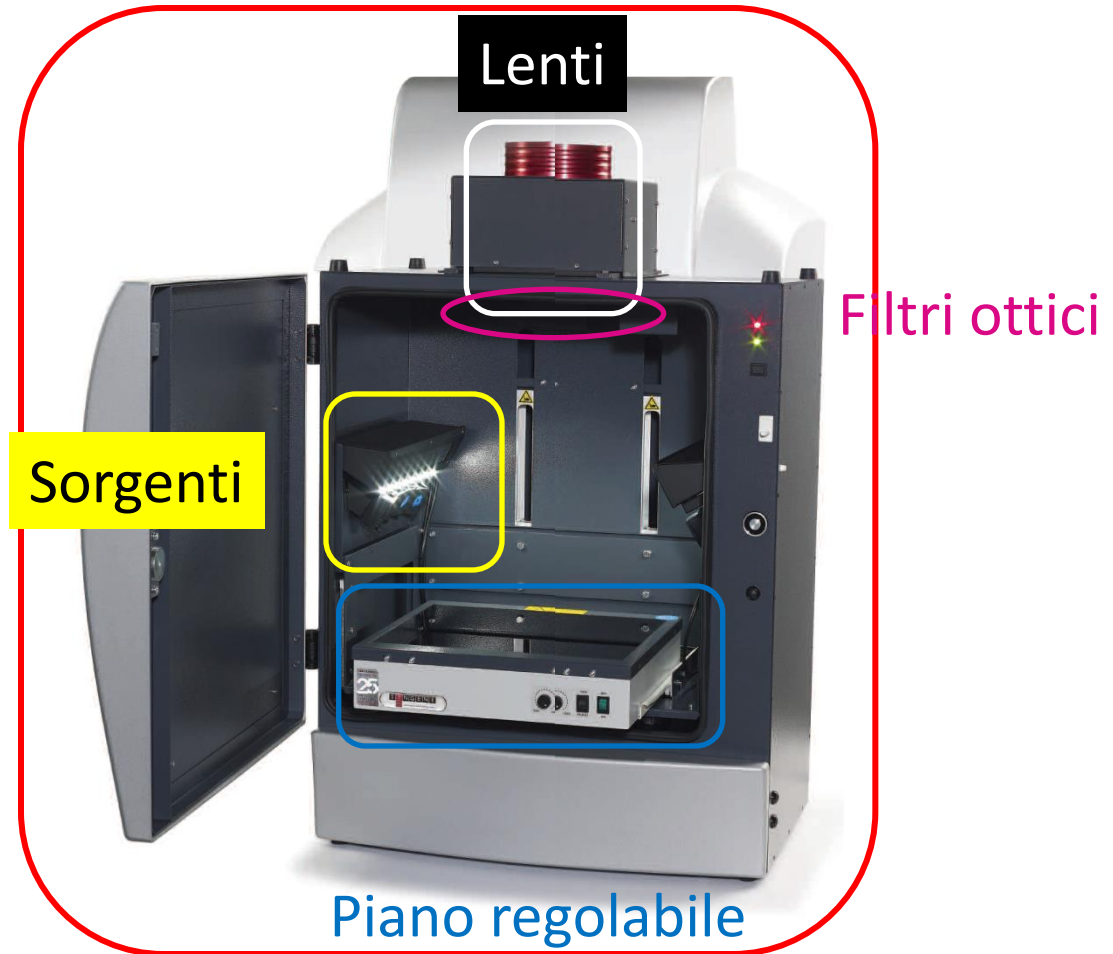


Ciò permette di abbandonare la camera oscura.

# Sistemi per Imaging "camere"

"Scatola nera"

**SCHEMA  
STRUTTURALE**



# Sistema ottico

MOLTA LUCE

POCA LUCE

LUCE SUL SENSORE

DIAFRAMMA APERTO

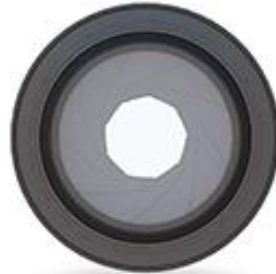
DIAFRAMMA CHIUSO



f/2.0



f/4.0



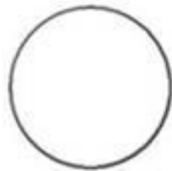
f/5.6



f/11



f/22



f1



f1.4



f2



f2.8



f4



f5.6



f8



f11



f16



f22

## DIAFRAMMA

f/0.85 - 0.95

Obiettivi straordinariamente  
luminosi.



# ChemiDoc XRS

BIO-RAD

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



## Applications

Chemiluminescence

Fluorescence\*

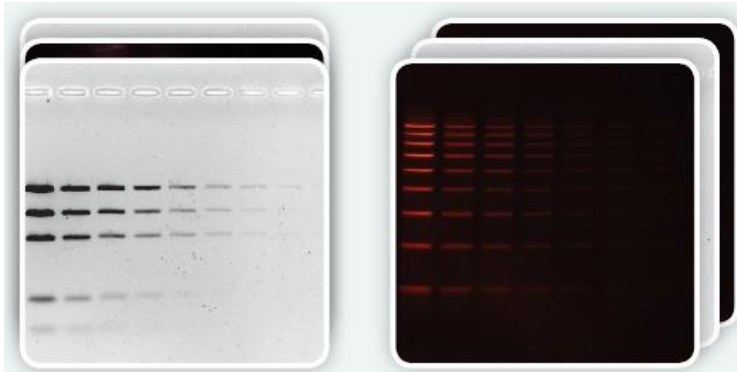
Colorimetry/densitometry

Gel documentation

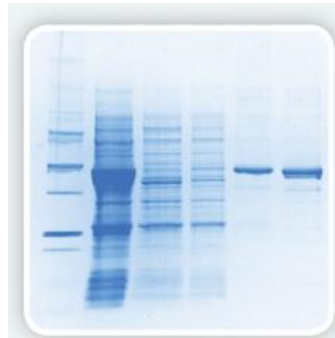
# ChemiDoc XRS

BIO-RAD

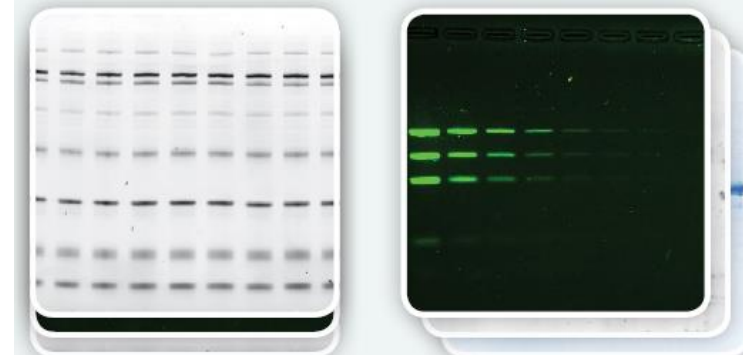
Opportune combinazioni di lampade e filtri permettono di lavorare nell'UV, Visibile, e IR.



Intercalanti DNA



Blue Coomassie



Stain-free

Ab fluorescenti

## Applications

Chemiluminescence

Fluorescence\*

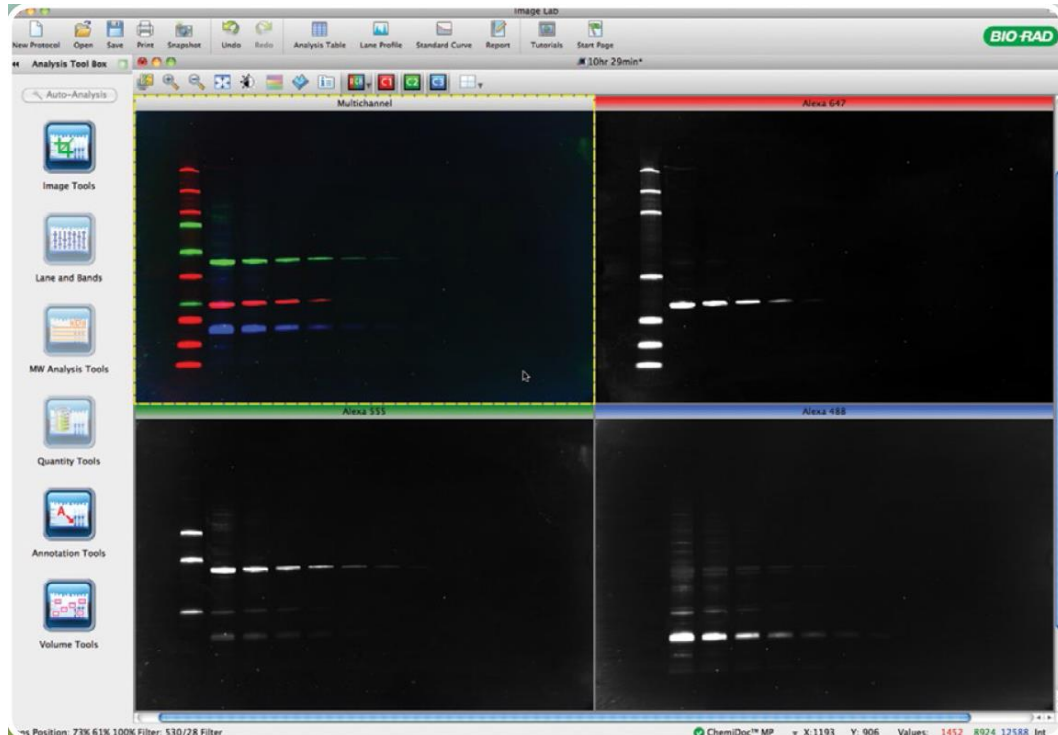
Colorimetry/densitometry

Gel documentation

# ChemiDoc XRS

BIO-RAD

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



Fluorescenza:

Possibilità di visualizzazione a singolo canale e in multiplex

*(es. Western blot con anticorpi secondari coniugati con Alexa Fluor)*

# ChemiDoc XRS

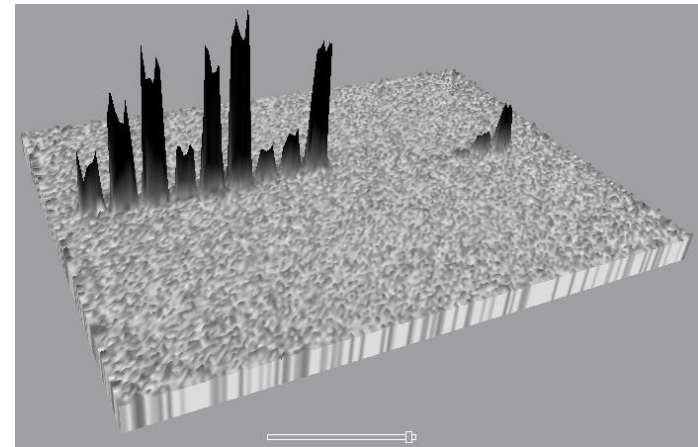
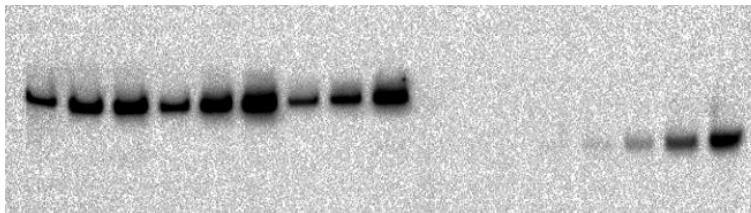
BIO-RAD

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



## Elaborazione digitale delle immagini

Rilevazione in chemiluminescenza



# ImageQuant™ LAS 4000 biomolecular imager

## Esempio di rilevazione in fluorescenza (1)



Alcune applicazioni:

Chemiluminescence

ECL

ECL Plus

Fluorescence dye

EtBr

Cy2

Cy3

Cy5

Alexa 660

Alexa 633

Digitization

Silver stain



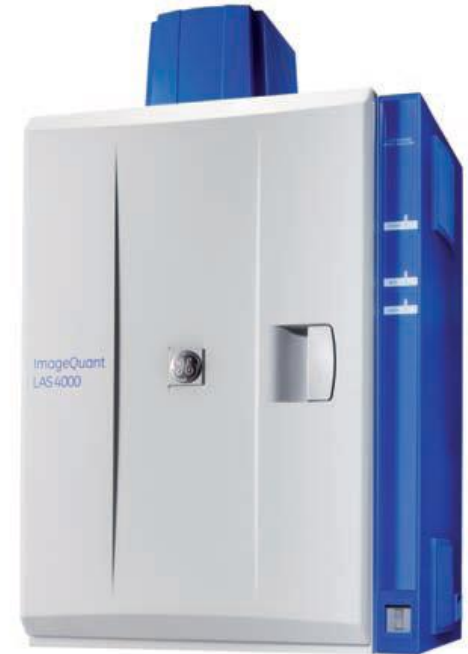
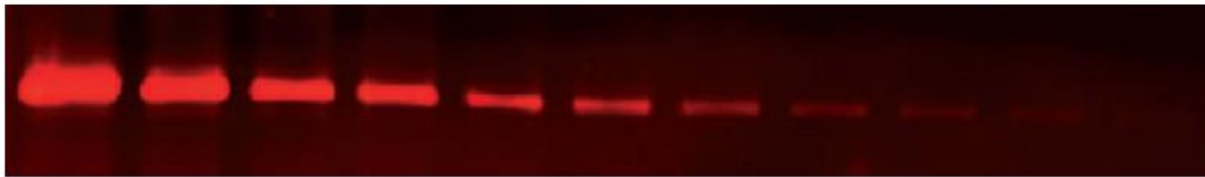
# ImageQuant™ LAS 4000 biomolecular imager

## Esempio di rilevazione in fluorescenza (1)



Transferrin

2500 1250 625 312 156 78 39 19.5 9.8 4.9 2.5 (pg)

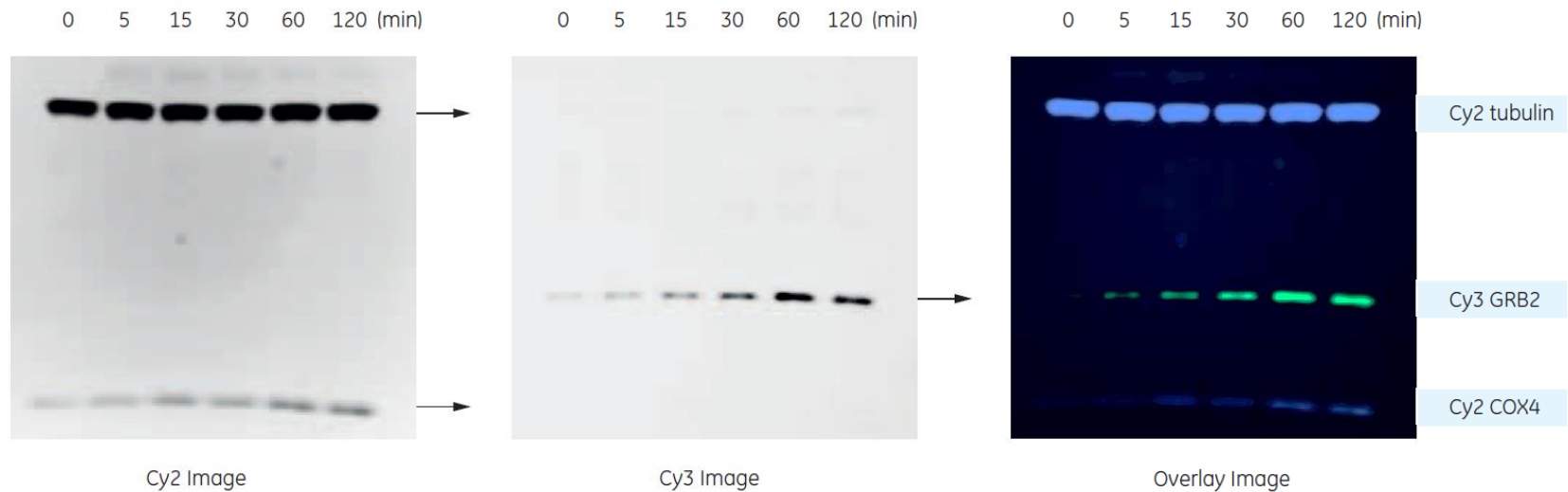


Sample: Transferrin  
Membrane: Hybond LFP  
Detection: Primary antibody: Rabbit anti-transferrin  
Secondary antibody: Amersham ECL Plex goat anti-rabbit IgG-Cy5  
Imaging: Excitation Emission filter  
Epi-red (630 nm) R670  
Exposure time: 17 s  
LOD: 4.9 pg transferrin  
DR: 2.7 orders of magnitude  
L: R<sup>2</sup> = 0.994

## Elevata linearità di risposta

# ImageQuant™ LAS 4000 biomolecular imager

## Esempio di rilevazione in fluorescenza (1)



**Sample:** Cell lysate  
**Membrane:** Hybond LFP  
**Detection:** **Primary Antibodies:** Rabbit anti-GRB2, mouse anti-COX4, and mouse anti-tubulin  
**Secondary Antibodies:** Amersham ECL Plex goat anti-mouse IgG-Cy2, Amersham ECL Plex goat anti-rabbit IgG-Cy3  
**Imaging:** **Excitation** Epi-blue (Cy2), epi-green (Cy3) **Emission filter** Y515 BP (Cy2), 575DF20 (Cy3)  
**Exposure time:** 20 s (Cy2), 2 min (Cy3)

**Campione:** lisati di cellule preparati a seguito di stimolazione con trattamento a diversi tempi

## Possibilità di rilevazione in multiplex

# Sistemi per Imaging "camere"

## PREGI

- Adatti a UV, Visibile, IR, **Chemiluminescenza**, **fluorescenza** e **transilluminazione**.
- Immagini digitali e 3D.
- Ampio **range dinamico**.
- Tempi di esposizione **"cumulativi"**.

## DIFETTI

- Messa a fuoco (a volte) **manuale**.
- **Sensibilità inferiore** a una lastra.
- **Costo** elevato dello strumento.

