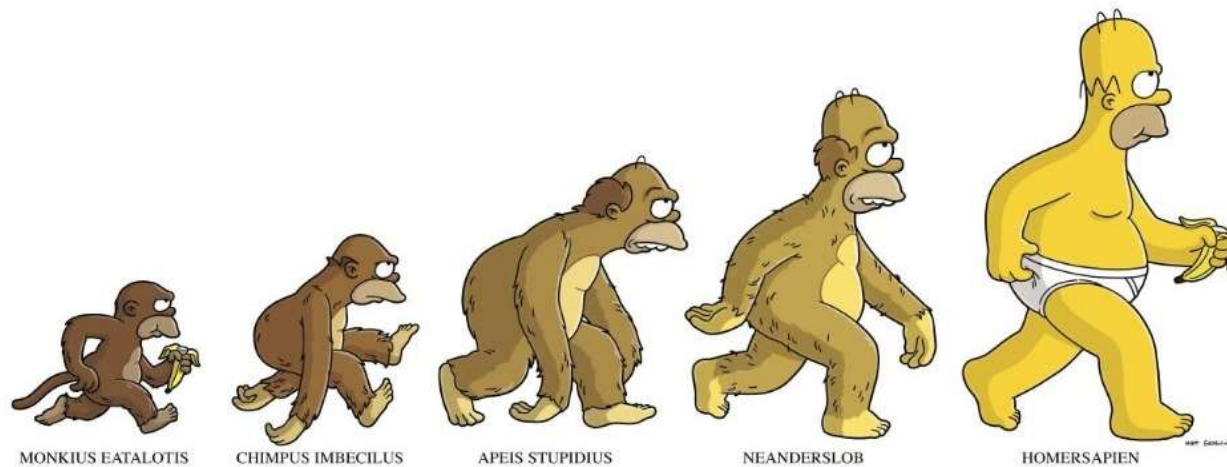
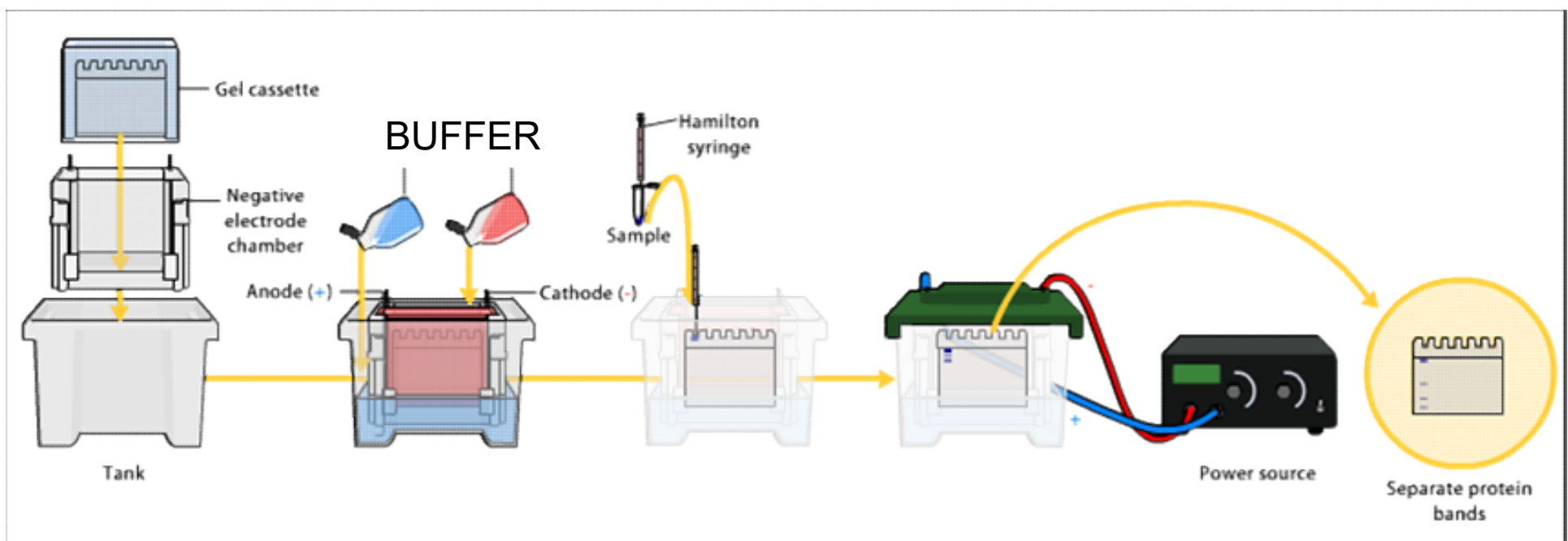
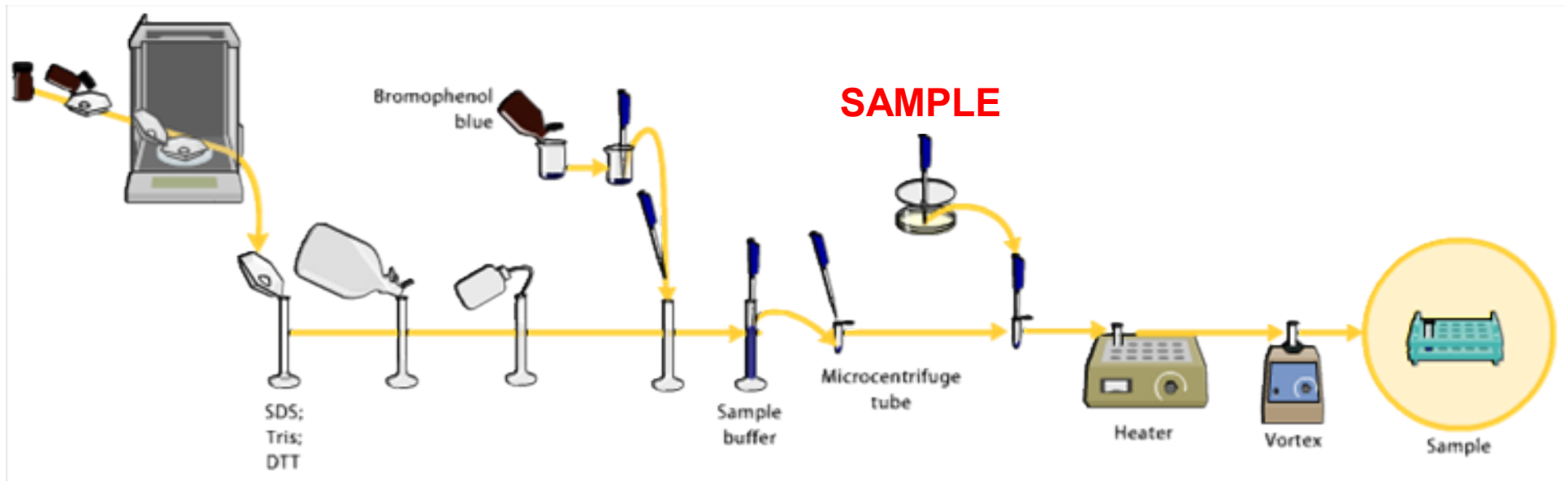


EVOLUZIONE DEL WESTERN BLOTTING

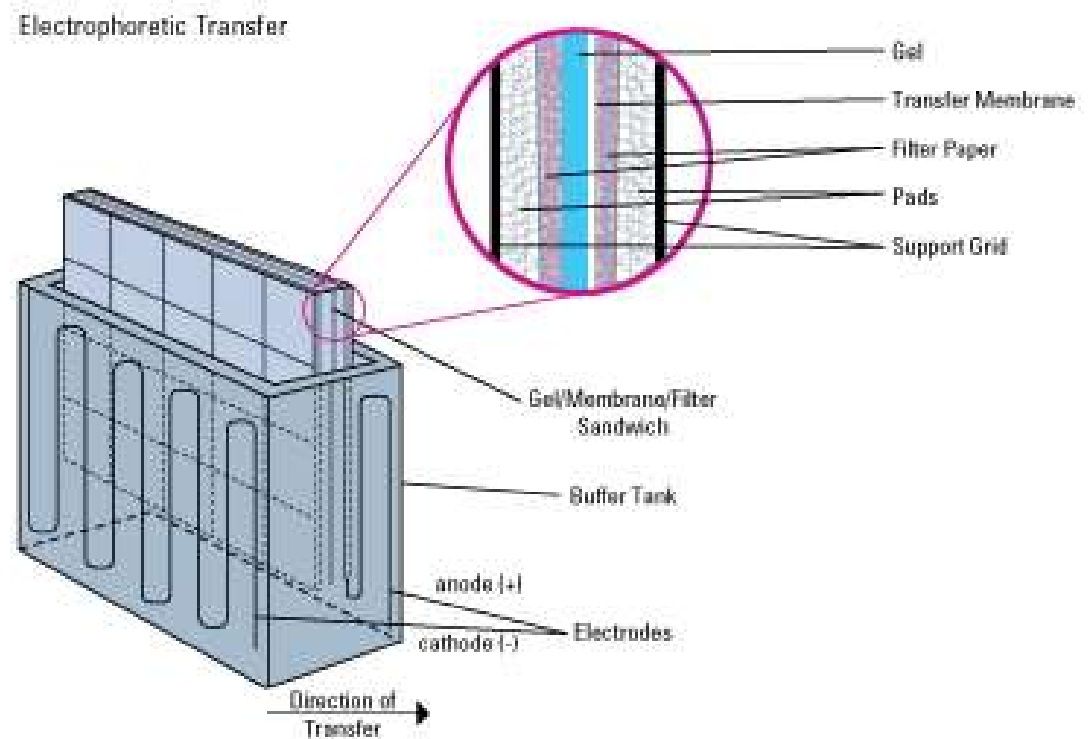
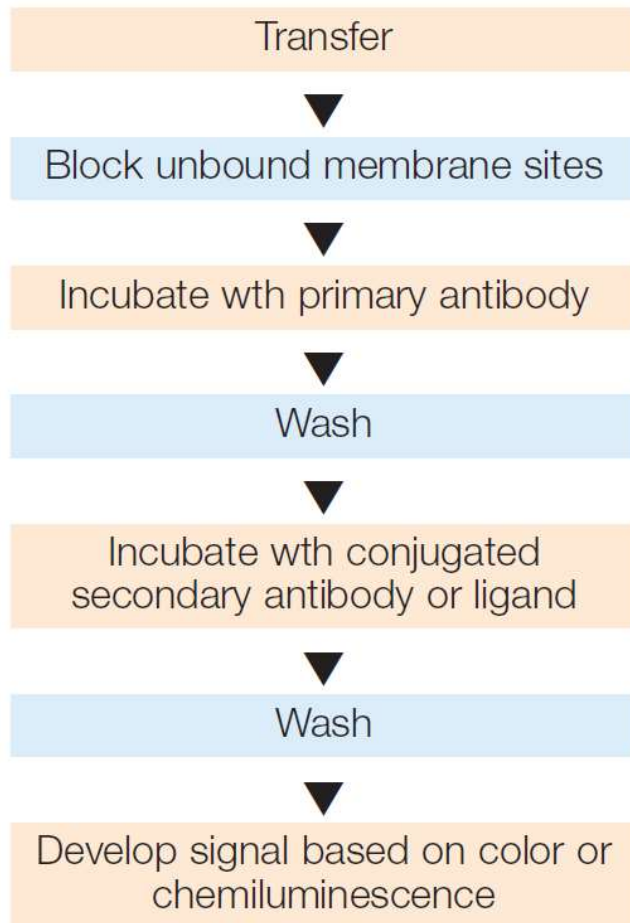


HOMERSAPIEN

Western Blotting (1979-2008)



Western Blottin



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**.

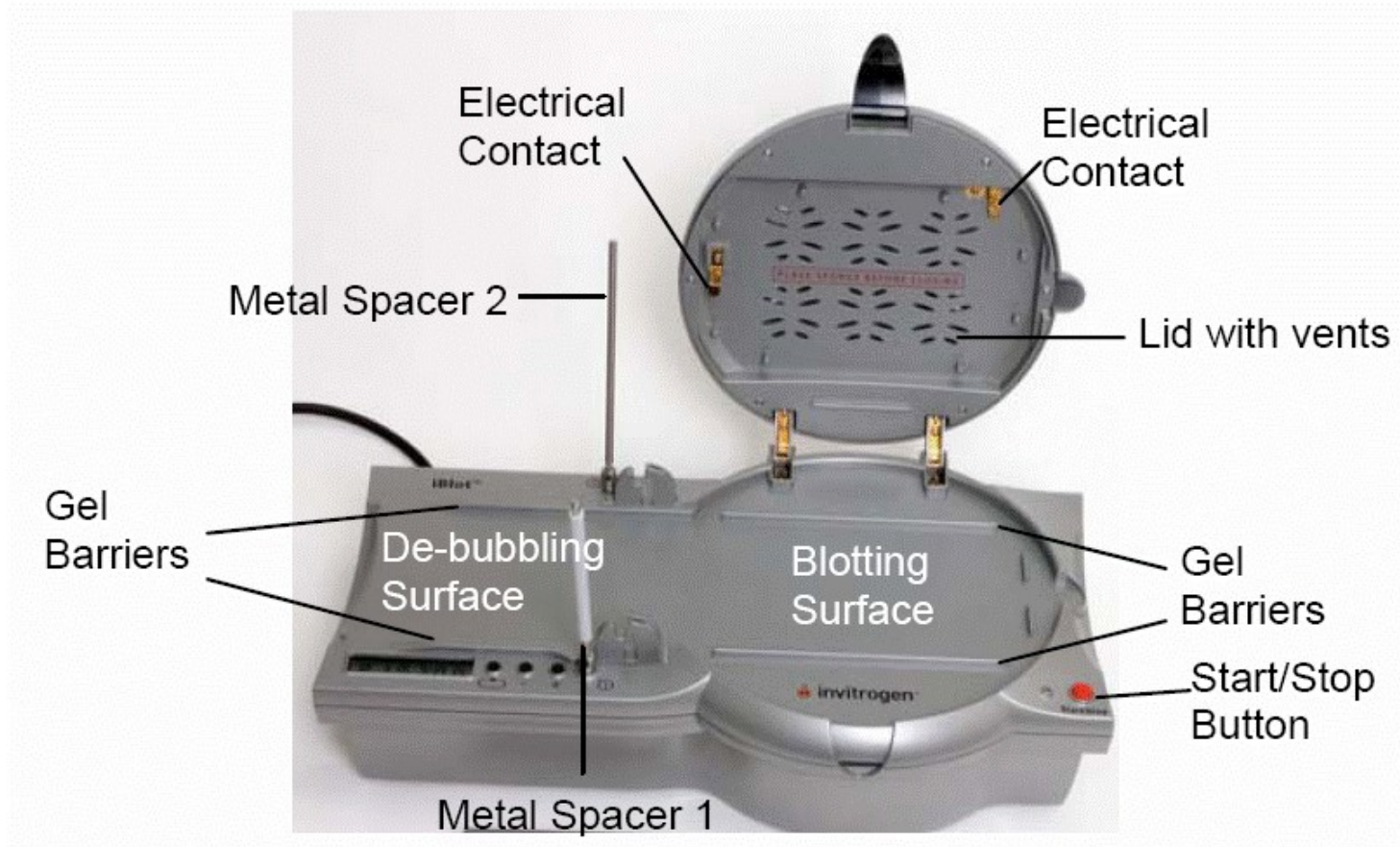
Trasferimento con iBlot dry blotting system

 invitrogen™
part of *life* technologies™



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

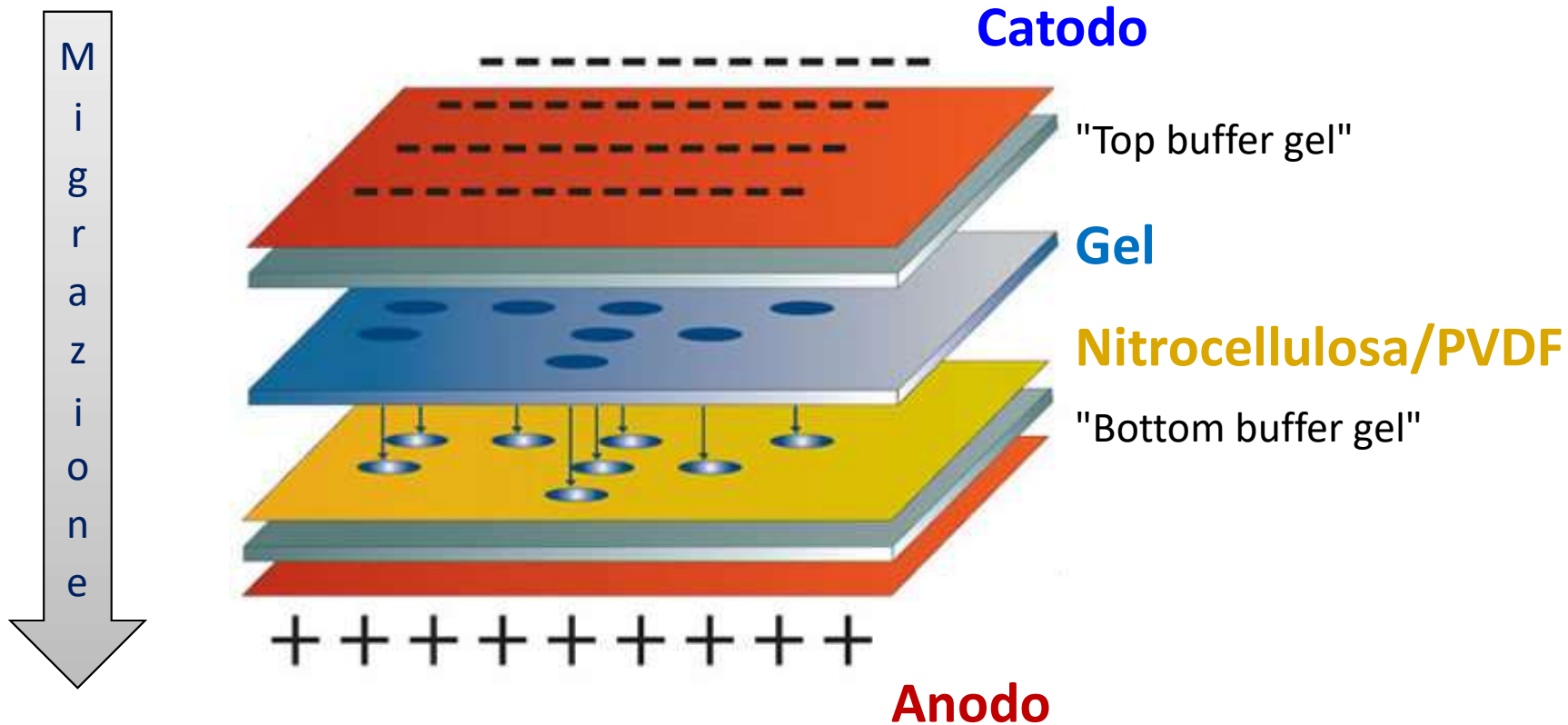
Trasferimento con iBlot dry blotting system



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

iBlot dry blotting system

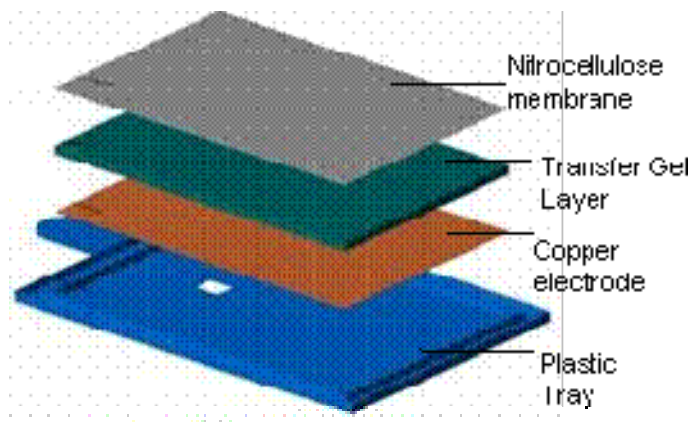
ASSENZA DI TAMPONI



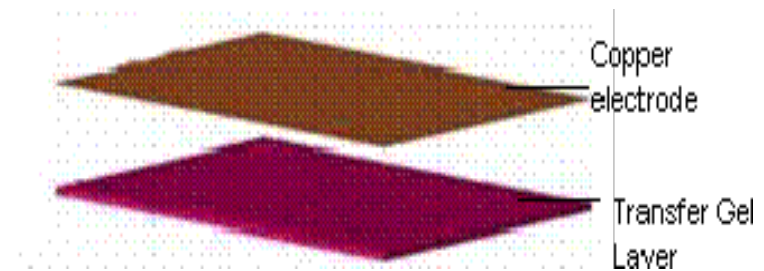
BASATO SEMPRE SU UNA ELETTROFORESI

Anodo iBlot

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



Catodo iBlot

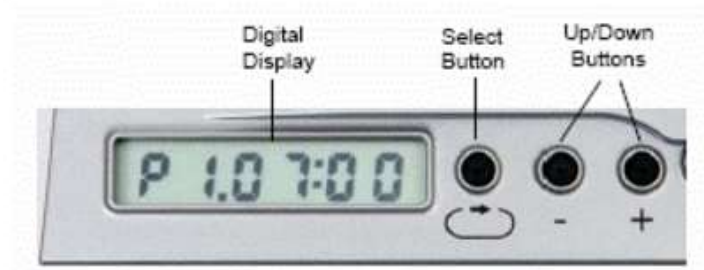


Contiene un elettrodo di **rame** e lo strato di "**Top Transfer Gel**".

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

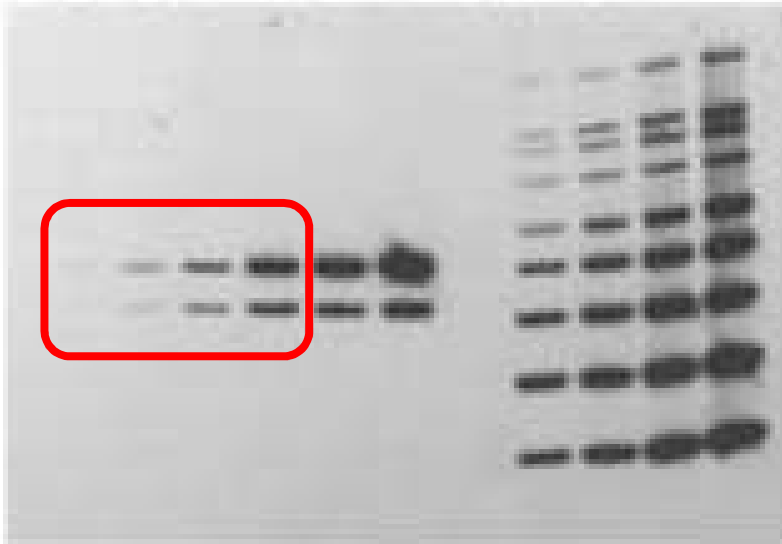
Programmi pre-impostati con diversi voltaggi e tempi da combinare
in funzione delle necessità di trasferimento

iBlot dry blotting system

Efficienza

iBlot

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



Normale elettroBlot

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



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

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



Ready-to-use
Prepacked
Consumables



High Throughput

Superior Transfer Efficiency



Trans-Blot Turbo

Caratteristica principale

- Per il traferimento da MINI (7.0 x 8.5 cm) o MIDI gel (13.5 x 8.5 cm).
- **Non contiene metanolo.**
- **Trasferimento rapidissimo (3'-10').**
- Casette 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

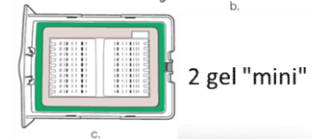
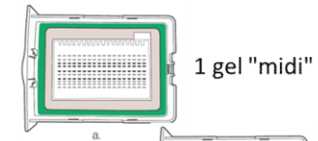
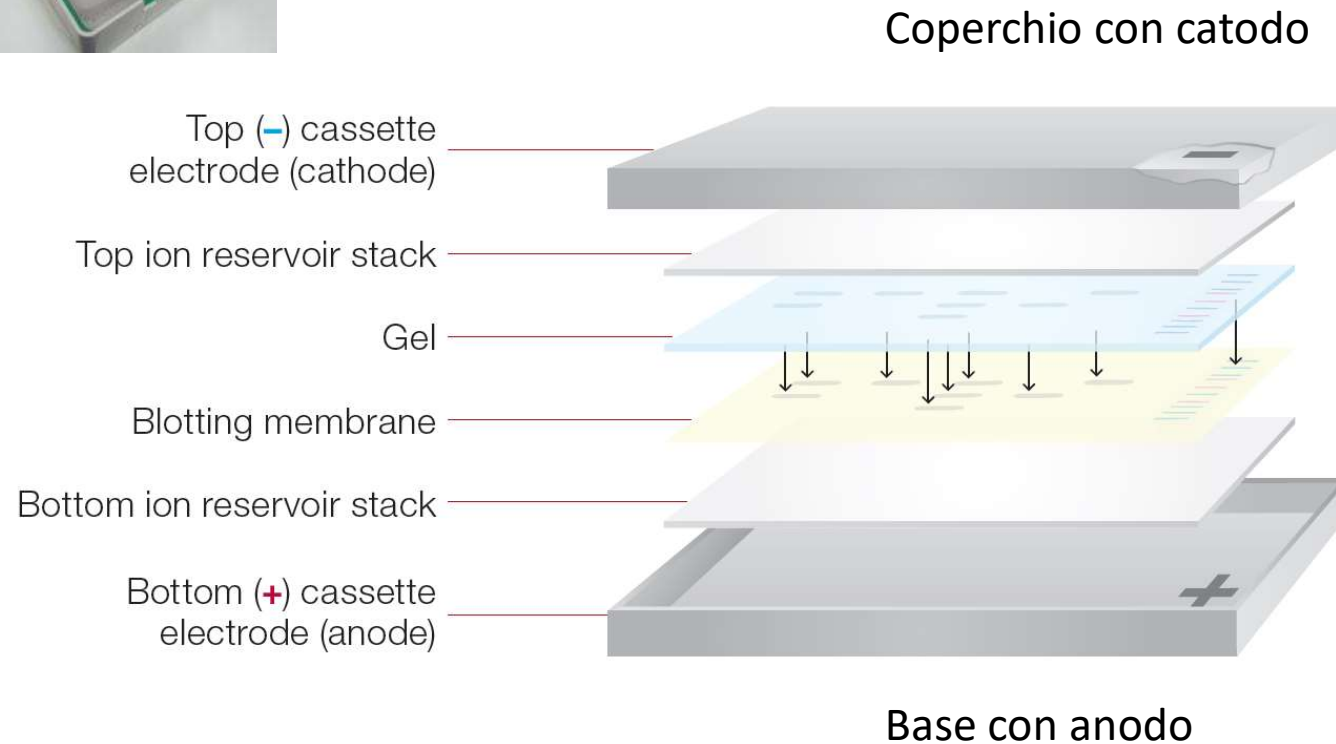
Cassette bay A (upper)

Cassette bay B (lower)

Possibilità di effettuare 2 trasferimenti contemporaneamente o sfasati nel tempo.

Trans-Blot Turbo

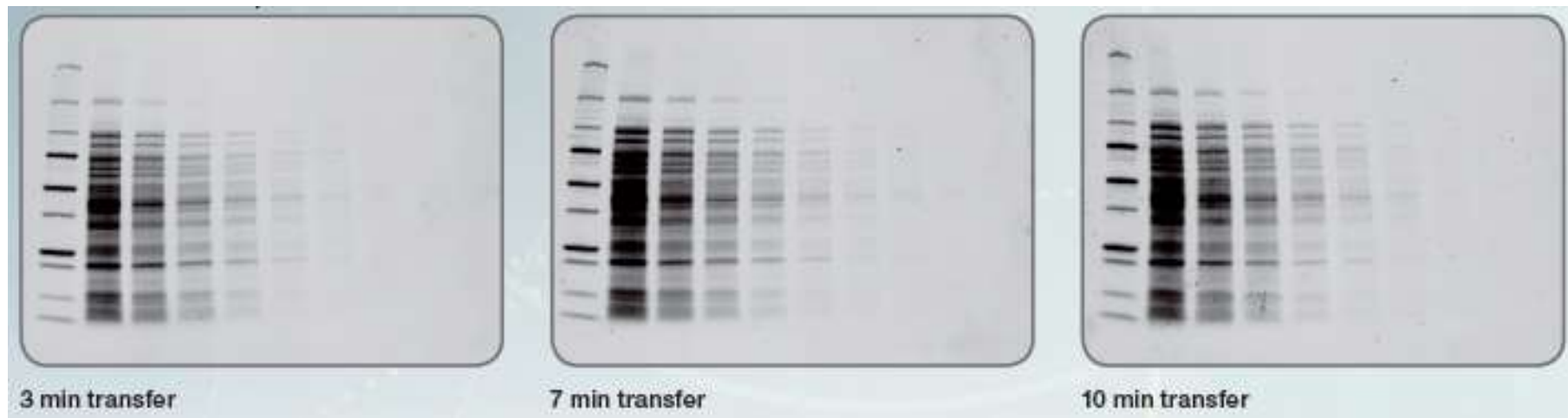
Sistema elettroforetico



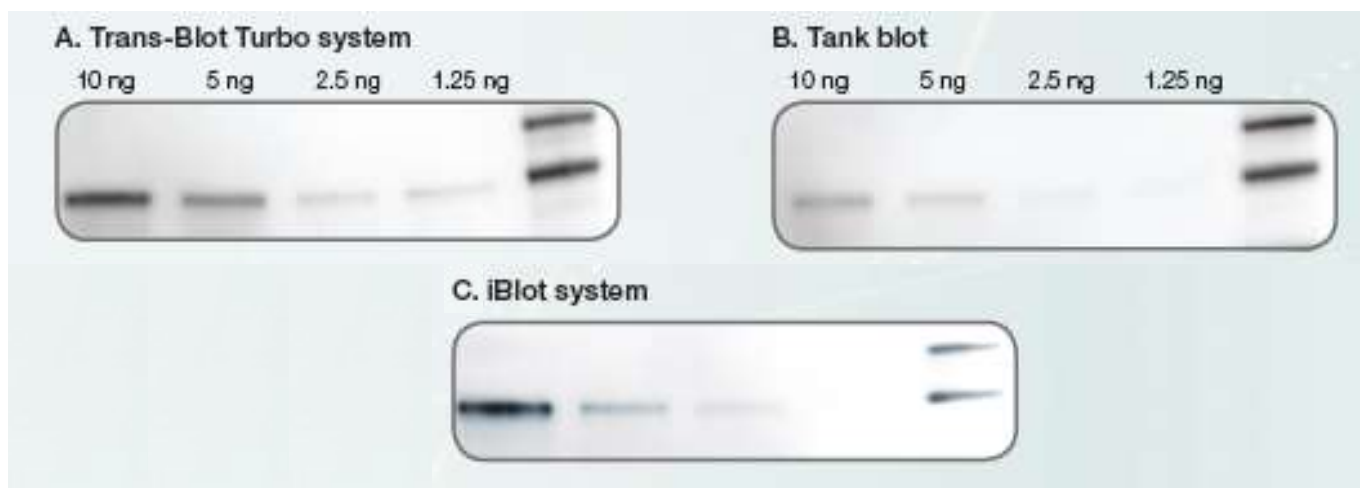
Serbatoi di ioni consentono il trasferimento dal gel alla membrana
Anodo e catodo sono costituiti dalle pareti delle due cassette

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).

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

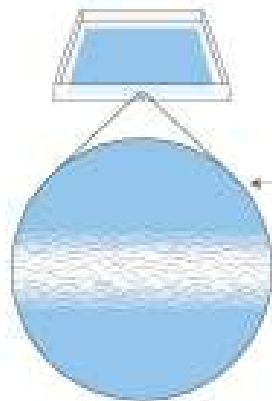
Tempistiche

		SISTEMA CLASSICO	SNAP
Transfer			
Block unbound membrane sites	Saturazione (Blocking)	1-8h	20 secondi
Incubate wth primary antibody	Ab 1 ^{ario}	≥1 h	10 min
Wash	Lavaggio	20 min	1 min
Incubate wth conjugated secondary antibody or ligand	Ab 2 ^{ario}	~1 h	10 min
Wash	Lavaggio	20 min	1 min
Develop signal based on color or chemiluminescence		8-12 h	Max 30 min

Funzionamento dello SNAP

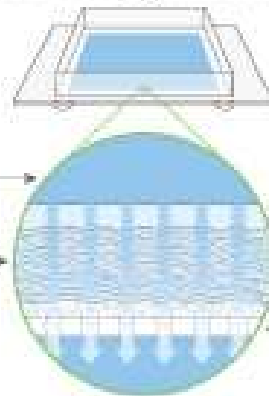
Fase di Blocking

TRADITIONAL WESTERN BLOT
(Passive reagent transport)



DIFFUSION

SNAP i.d. System
(Active reagent transport)

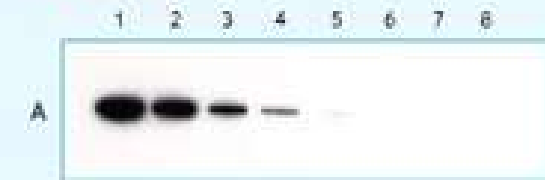


VACUUM



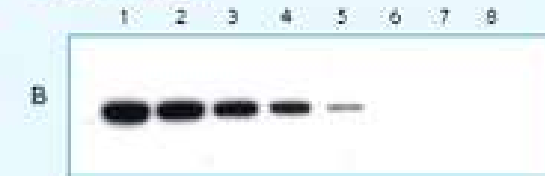
Lo SNAP garantisce che i pori della membrana siano adeguatamente bloccati e lavati

Standard Western Blot
5% NFDN (Nonfat Dry Milk)

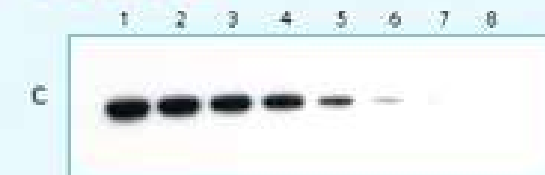


SNAP i.d. Protein
Detection System

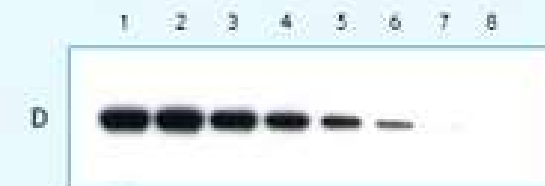
0.5% NFDN



0.1% NFDN

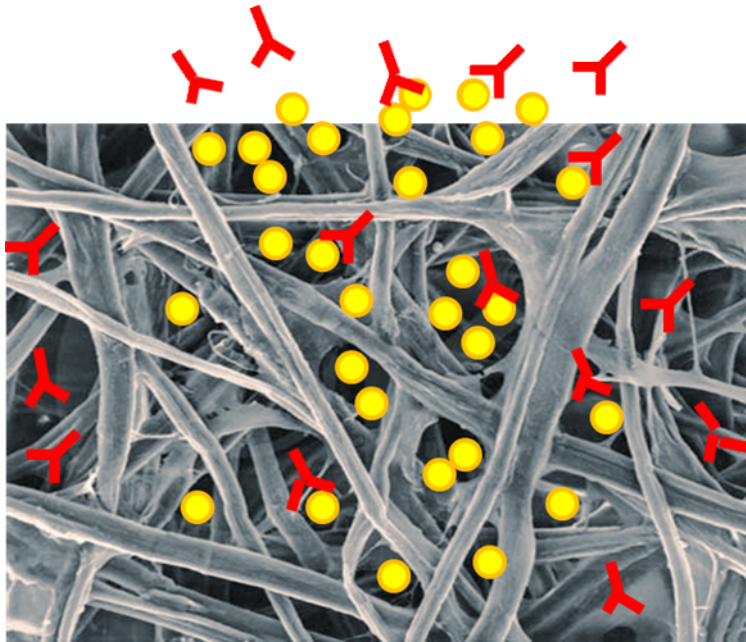


0.05% NFDN

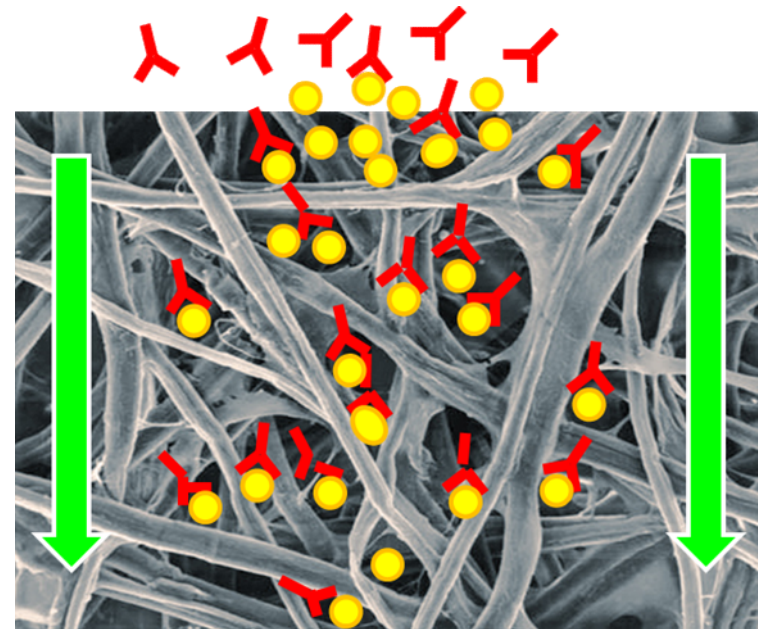


Funzionamento dello SNAP

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**.

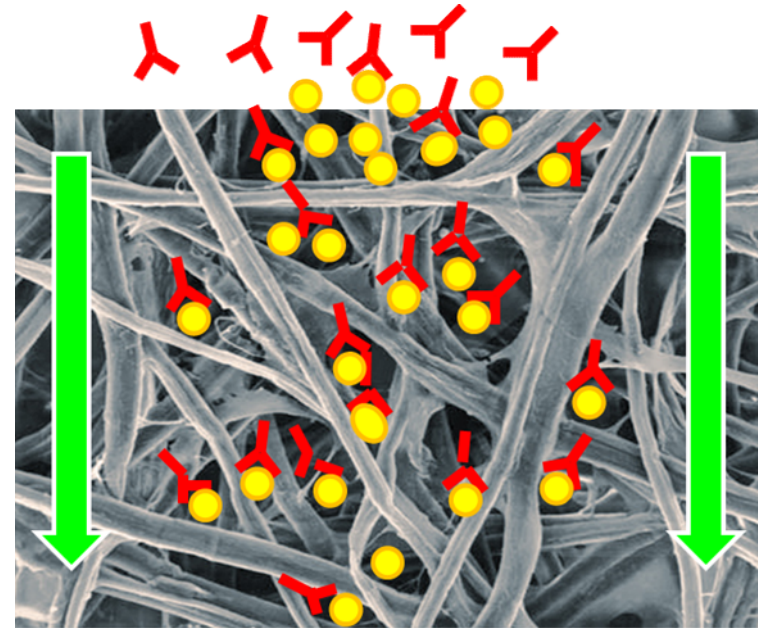
Funzionamento dello SNAP

Incubazione con gli anticorpi

Gli anticorpi possono essere recuperati

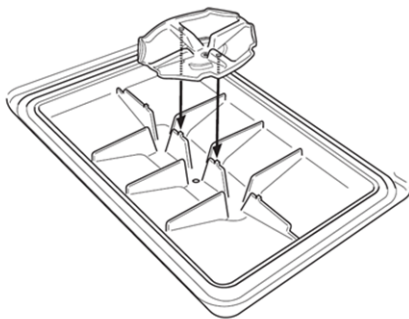


Vassoio per il recupero degli anticorpi.

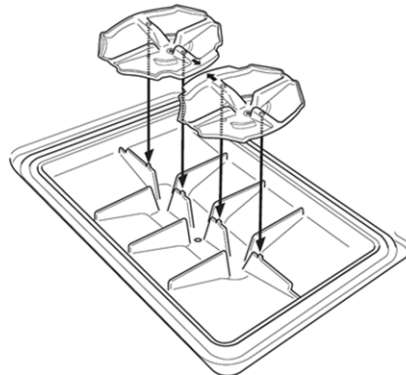


Lo **SNAP** aumenta
l'esposizione delle proteine
intrappolate nella membrana
L'anticorpo in eccesso viene
spinto all'esterno della
membrana con
riduzione del **background**

Position of antibody tray
for single well blot holder:



Position of antibody trays
for double well blot holder:



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.



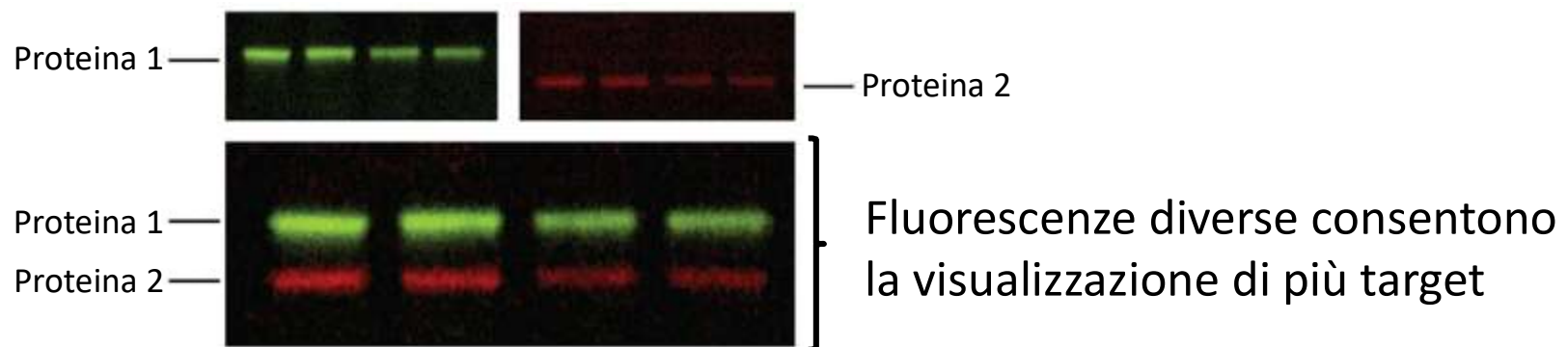
Anticorpi marcati con cianine

- 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.



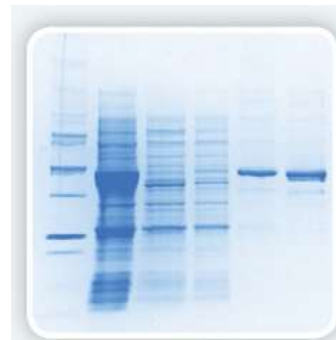
ChemiDoc XRS

BIO-RAD

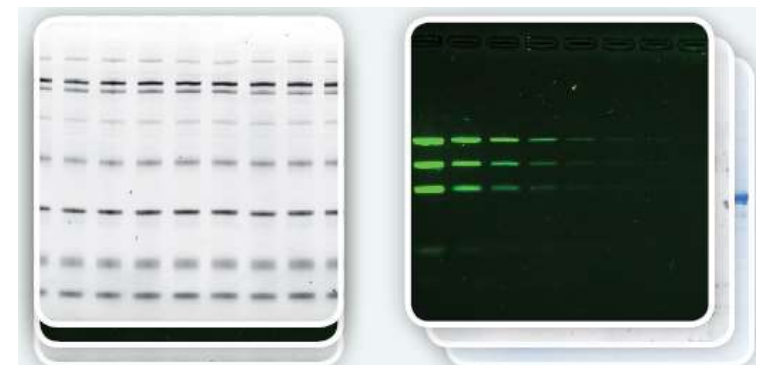
Opportune combinazioni di lampade e filtri permettono di lavorare nell'UV, Visibile, e IR.



Intercalanti DNA



Blue Coomassie



Stain-free

Ab fluorescenti

Applications

Chemiluminescence

Fluorescence*

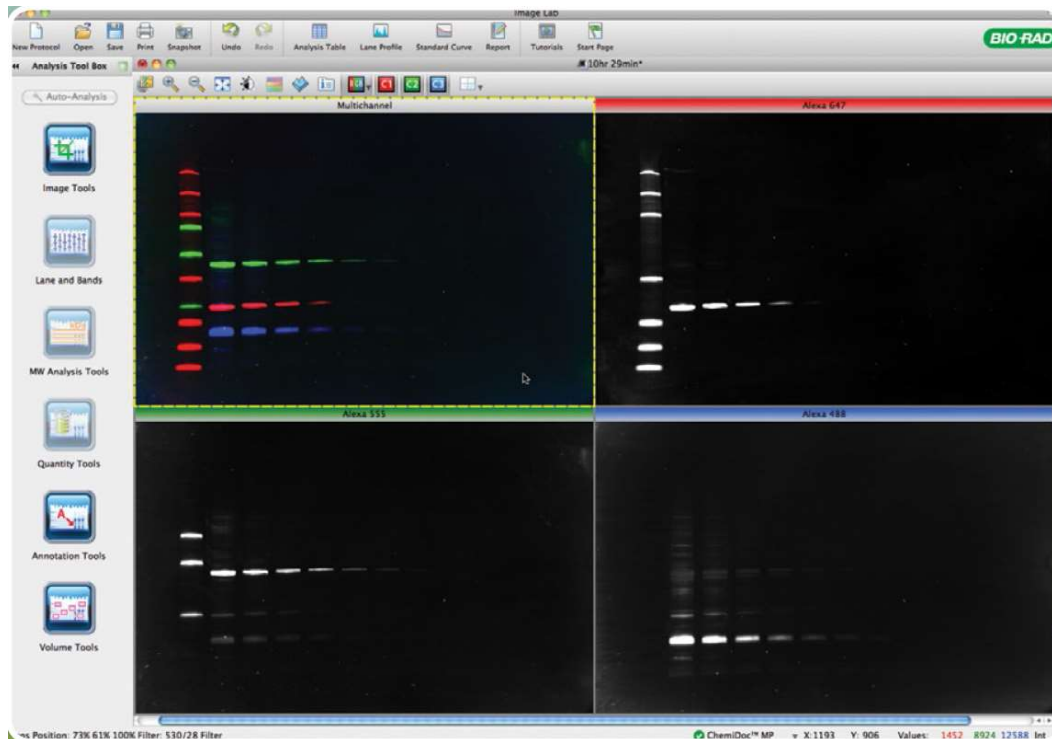
Colorimetry/densitometry

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

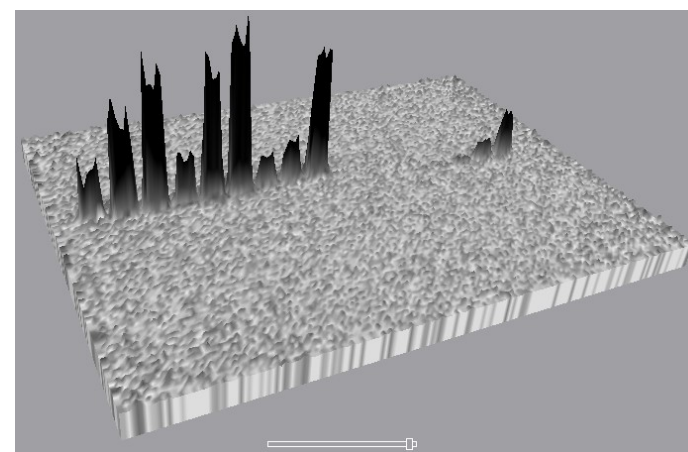
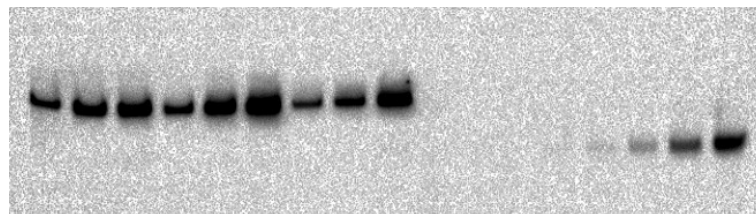
BIO-RAD

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



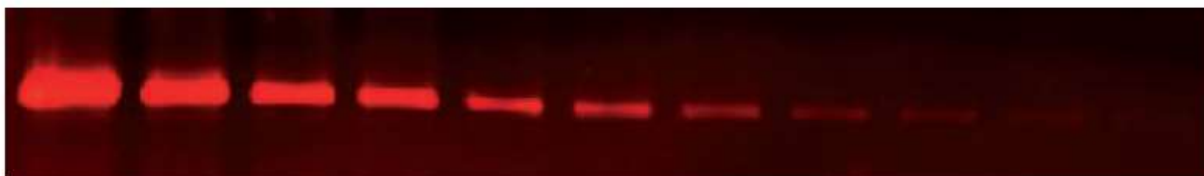
ImageQuant™ LAS 4000 biomolecular imager

Esempio di rilevazione in fluorescenza (1)



Transferrin

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

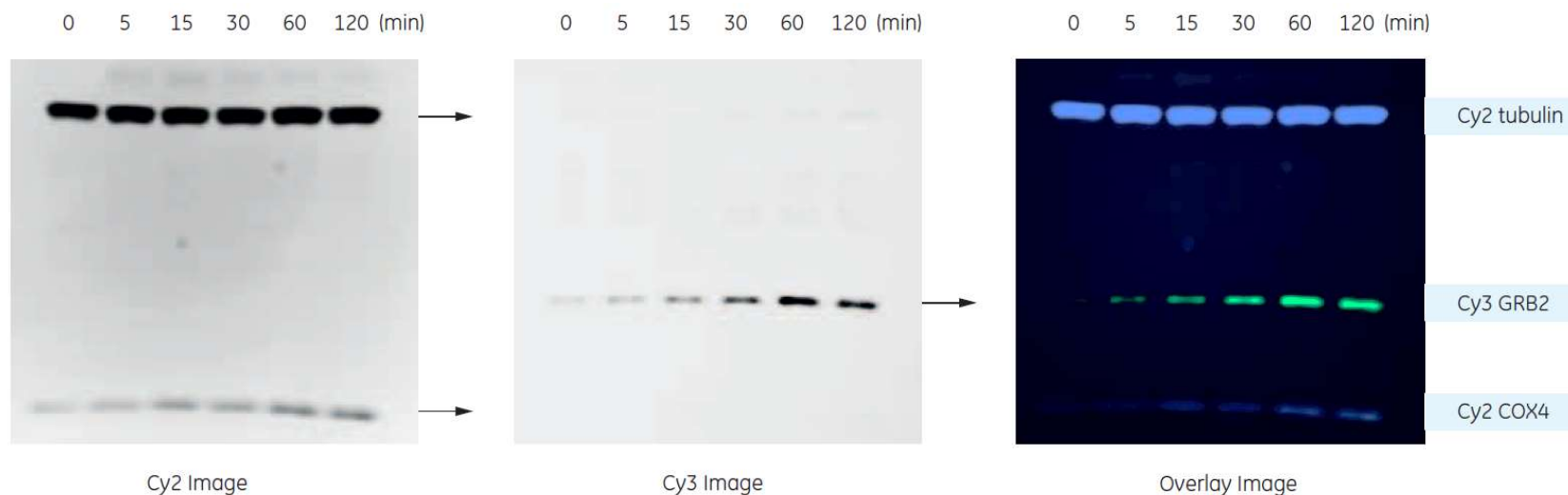


Sample: Transferrin
Membrane: Hybond LFP
Detection: Primary antibody: Rabbit anti-transferrin
Secondary antibody: Amersham ECL Plex goat anti-rabbit IgG-Cy5
Imaging: Excitation Emission filter
Epi-red (630 nm) R670
Exposure time: 17 s
LOD: 4.9 pg transferrin
DR: 2.7 orders of magnitude
L: $R^2 = 0.994$

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** **Emission filter**
 Epi-blue (Cy2), Y515 BP (Cy2),
 epi-green (Cy3) 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"

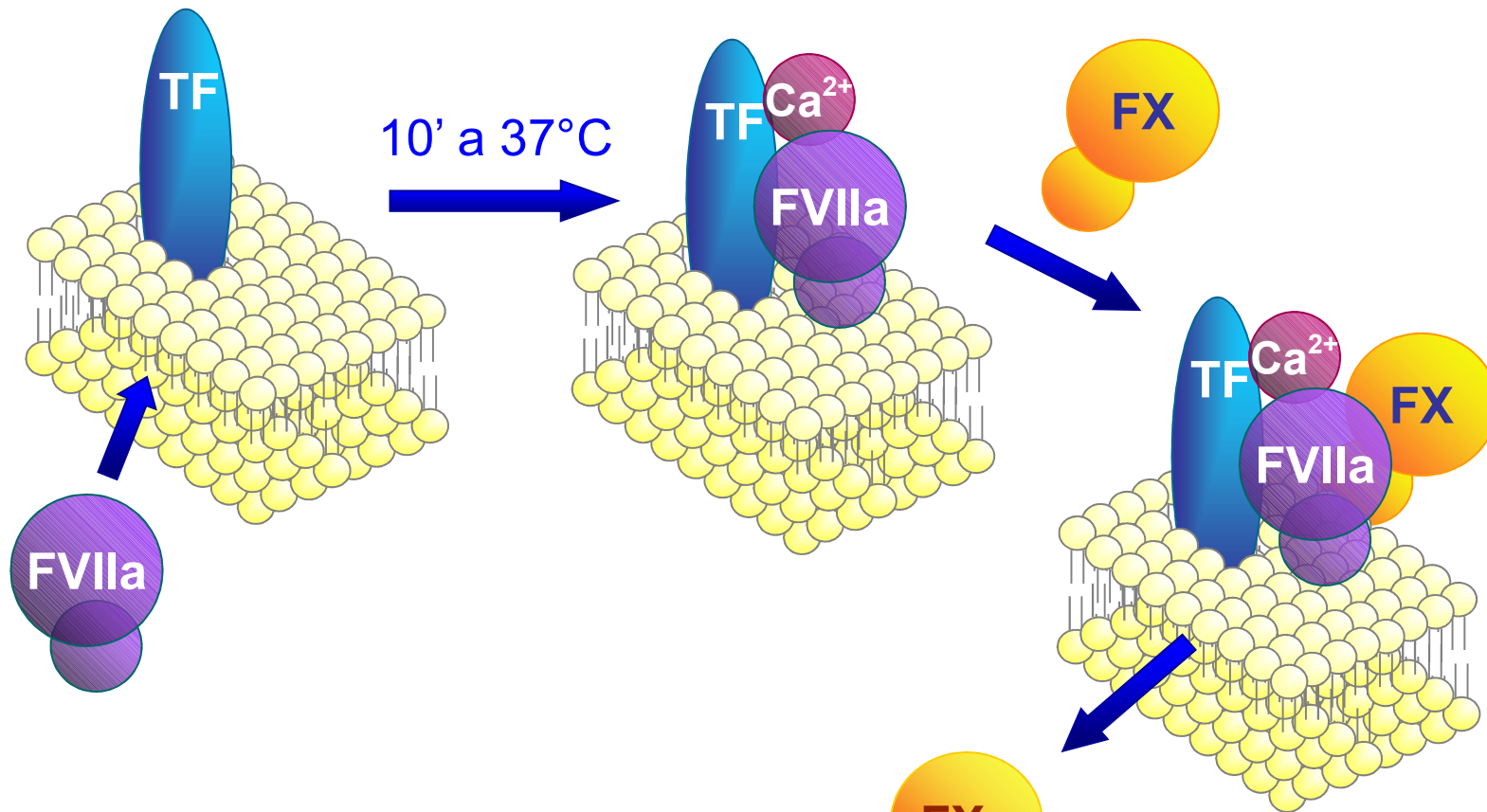
PREGI

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

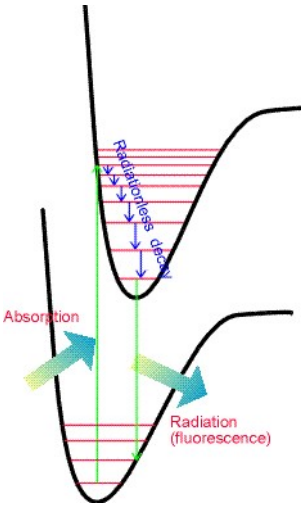
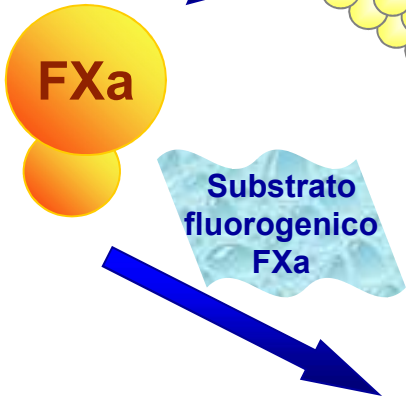
DIFETTI

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





**STUDIO ATTIVITÀ
ENZIMATICA
IN VITRO**



SUBSTRATI FLUOROGENICI

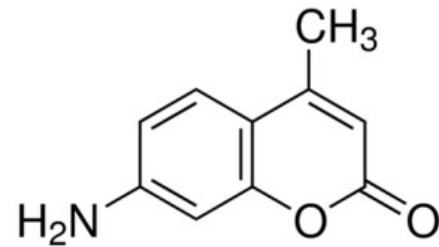
Studi funzionali di attività enzimatica

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

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

Molecular Weight: 679.8 D

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



7-amino-4-methylcoumarin

AMC

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: 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

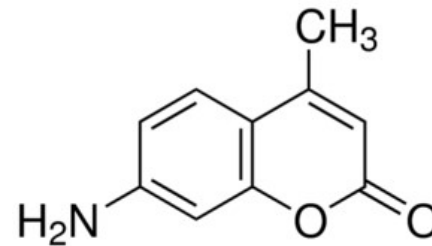
Solubility: ≥ 10 mM in distilled/deionized water

Optical Characteristics:

Absorption Maximum Wavelength, λ_{Abs} : 342 nm
Emission Maximum Wavelength, λ_{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 λ_{Em} 440 nm.



7-amino-4-methylcoumarin

AMC

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

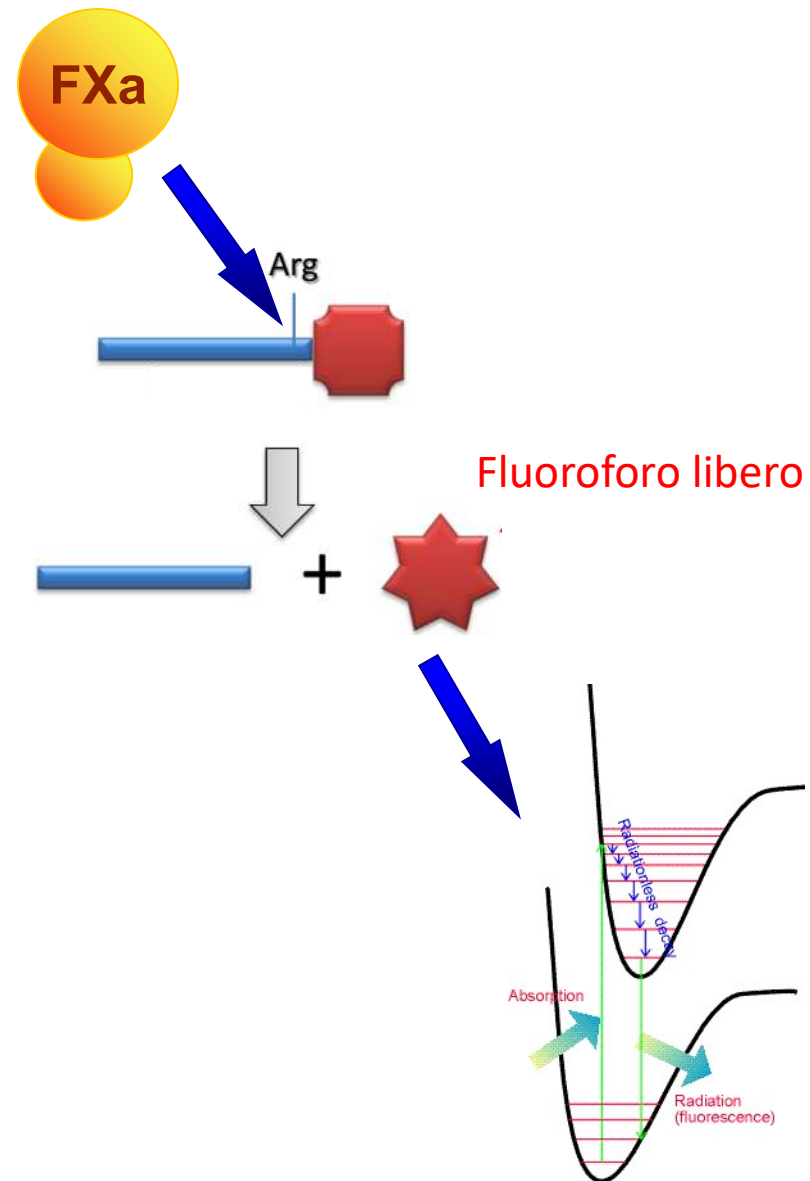
Solubility: ≥ 10 mM in distilled/deionized water

Optical Characteristics:

Absorption Maximum Wavelength, λ_{Abs} : 342 nm
Emission Maximum Wavelength, λ_{Em} : 440 nm

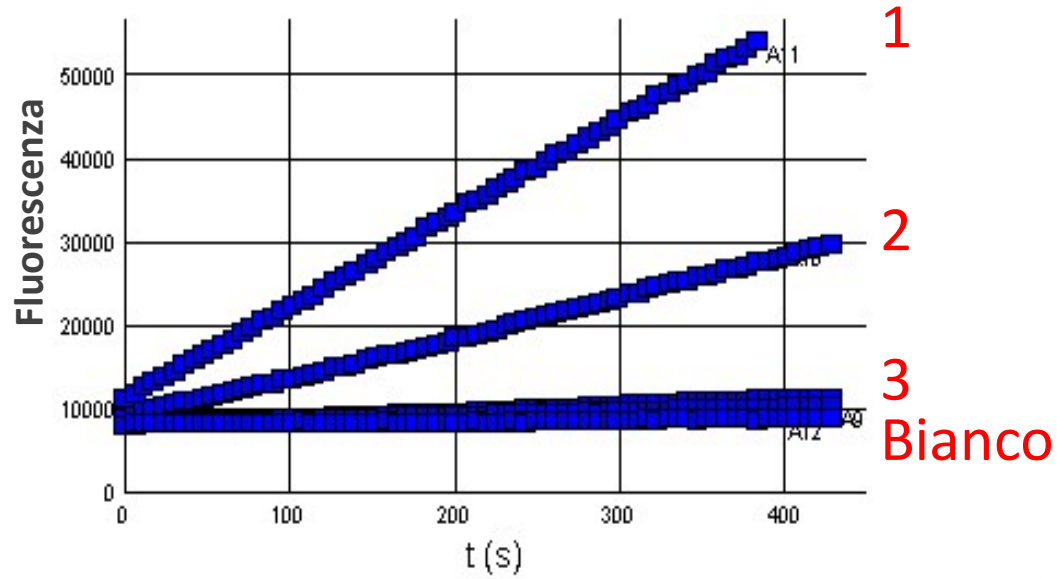
Assay Conditions/Substrate Kinetics

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 λ_{Em} 440 nm.

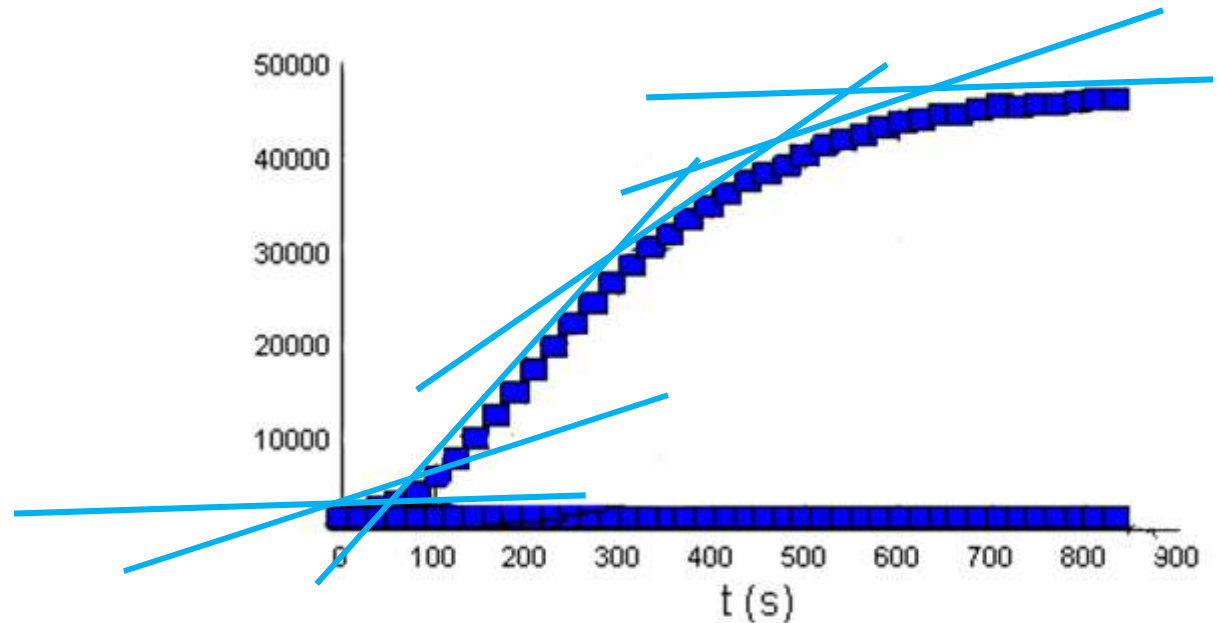


APPLICAZIONE DELLA FLUORIMETRIA

Risposta lineare



Risposta sigmoideale



Fluorimetro

SUBSTRATI FLUOROGENICI

Studi funzionali di attività enzimatica

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

