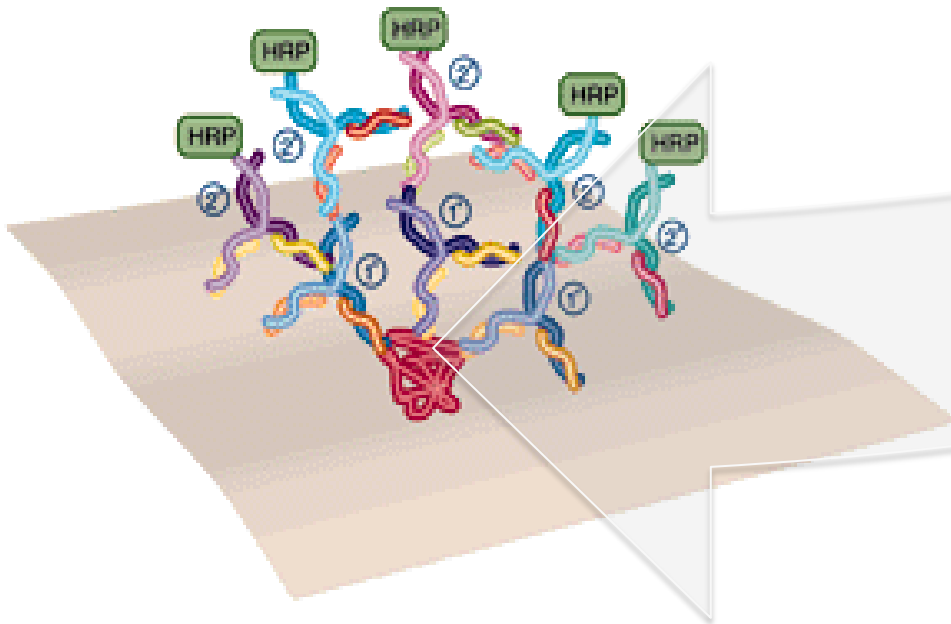
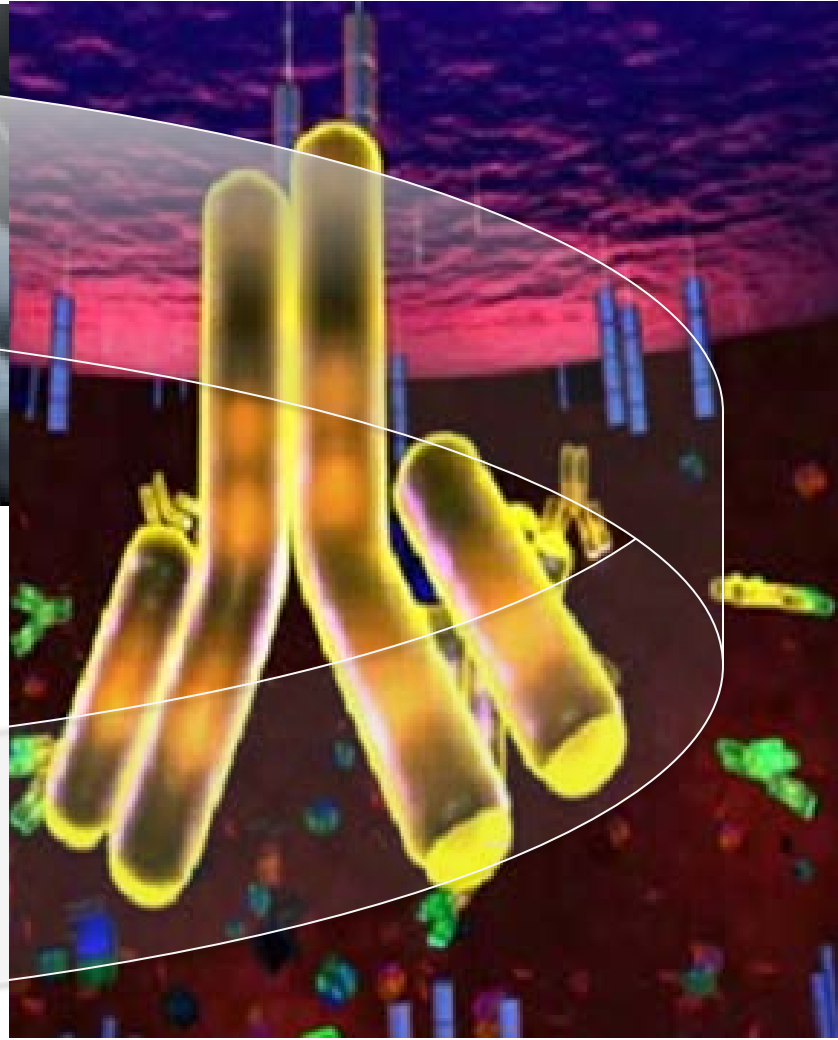
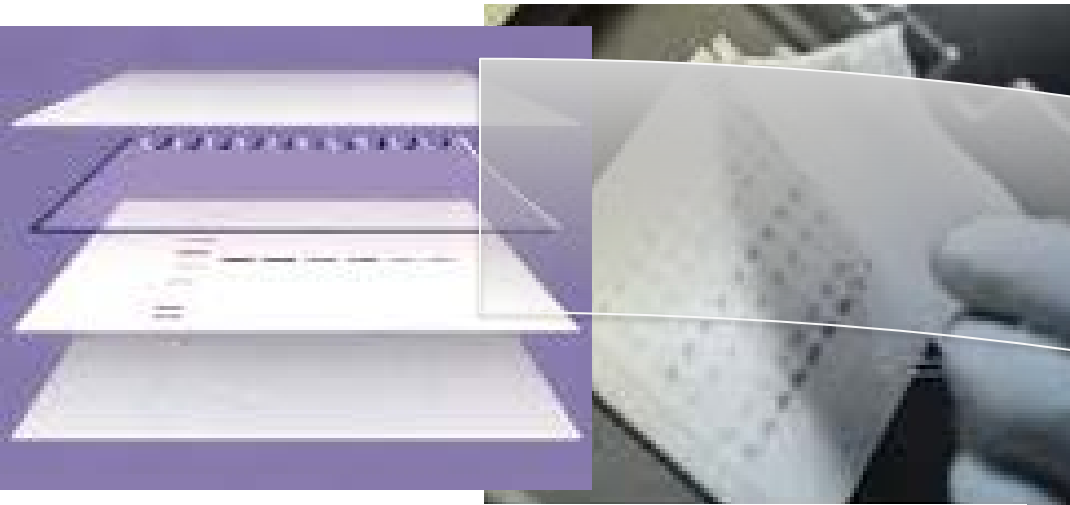
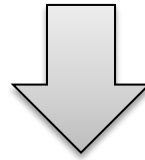


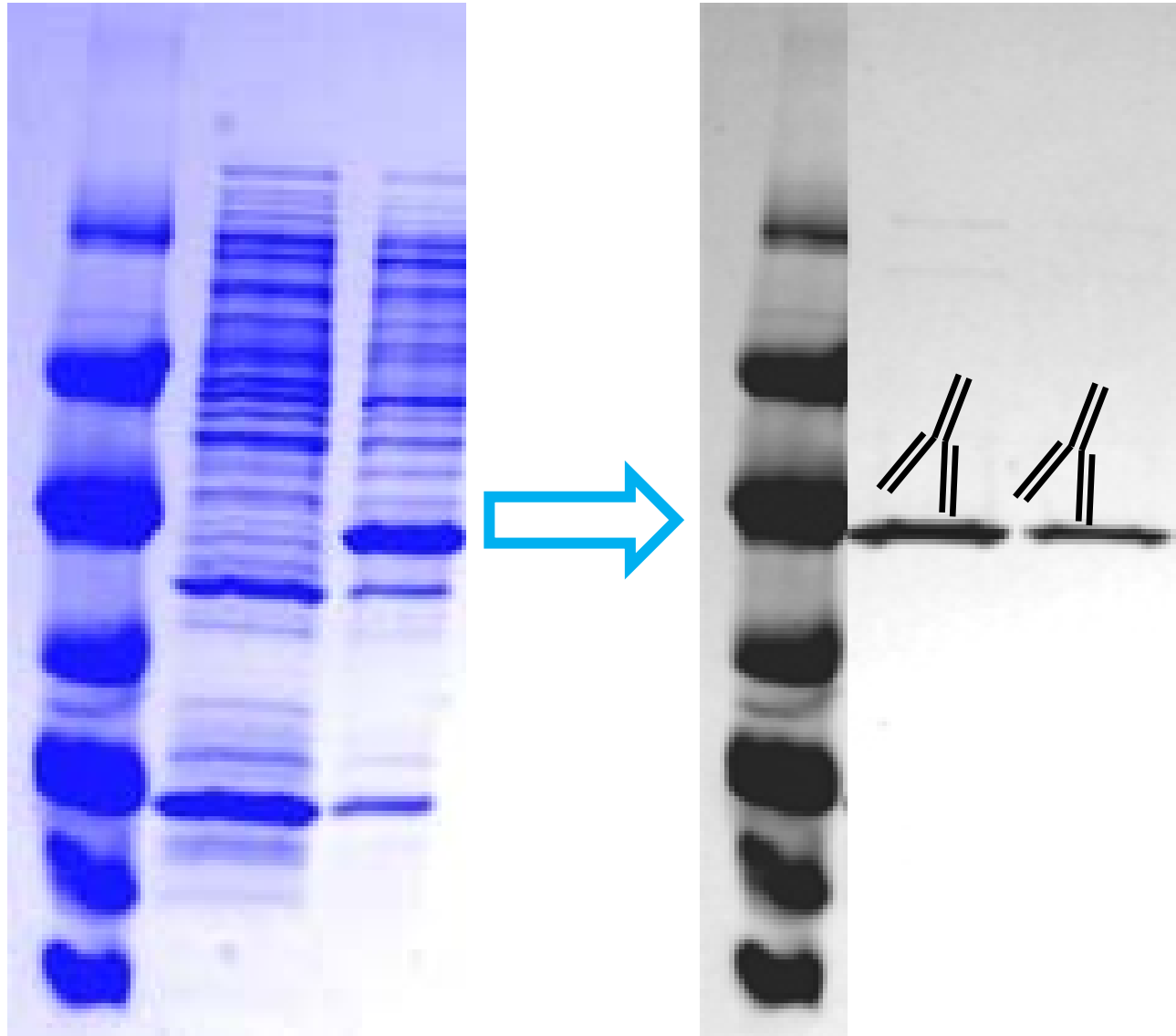
WESTERN BLOTTING



SCOPO DEL WESTERN BLOTTING



SCOPO DEL WESTERN BLOTTING



SCOPO DEL WESTERN BLOTTING

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

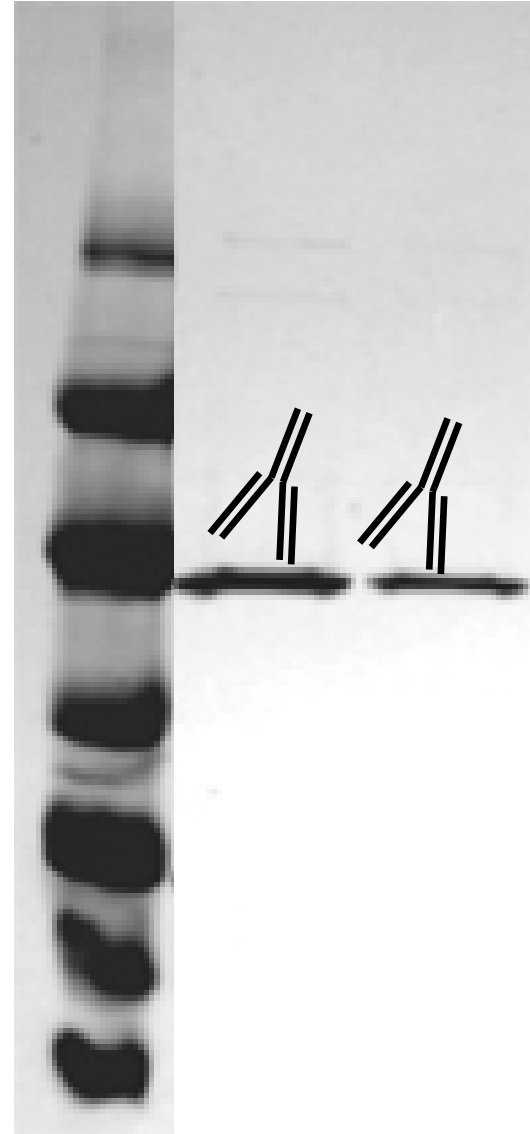


Consente la ricerca dell'ago nel pagliaio!

SCOPO DEL WESTERN BLOTTING



Perché non si addiziona
l'Ab direttamente al gel?

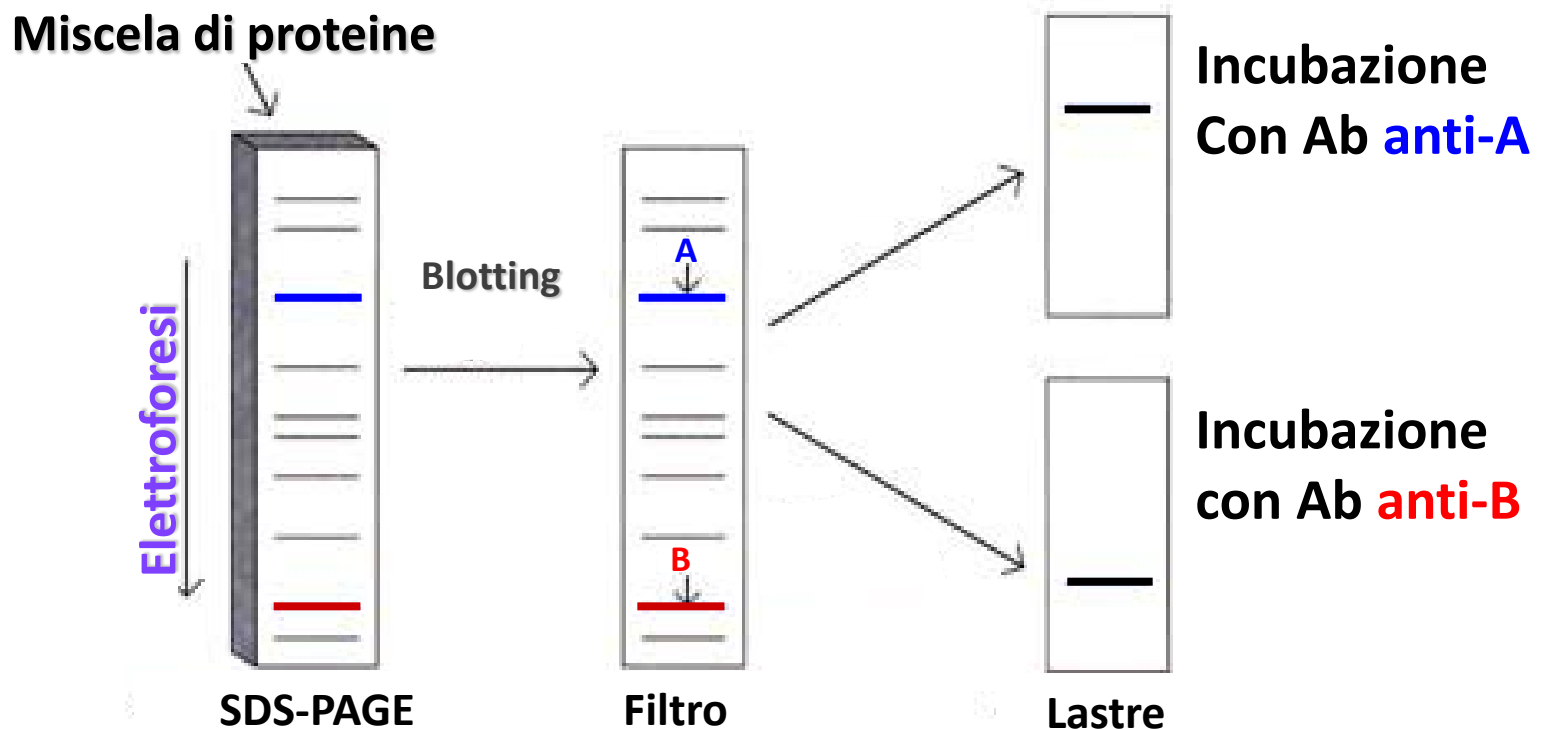


WESTERN BLOTTING (WB)

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



BLOTTING

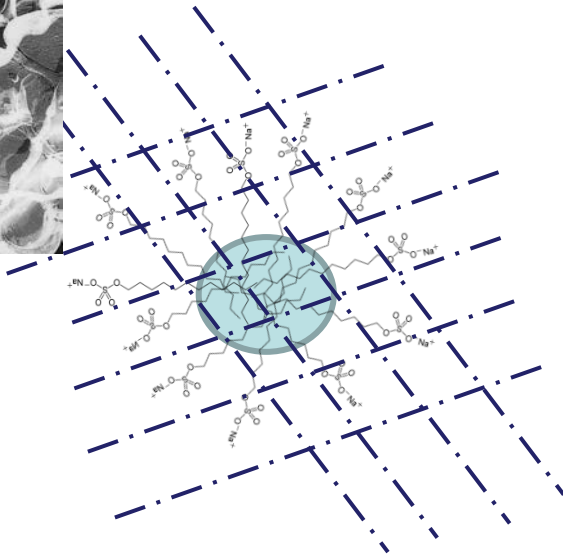
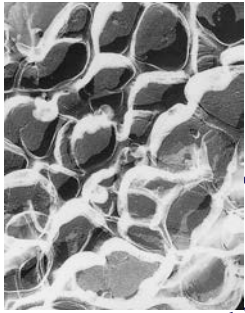
Trasferimento di macromolecole su una membrana immobilizzante.

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

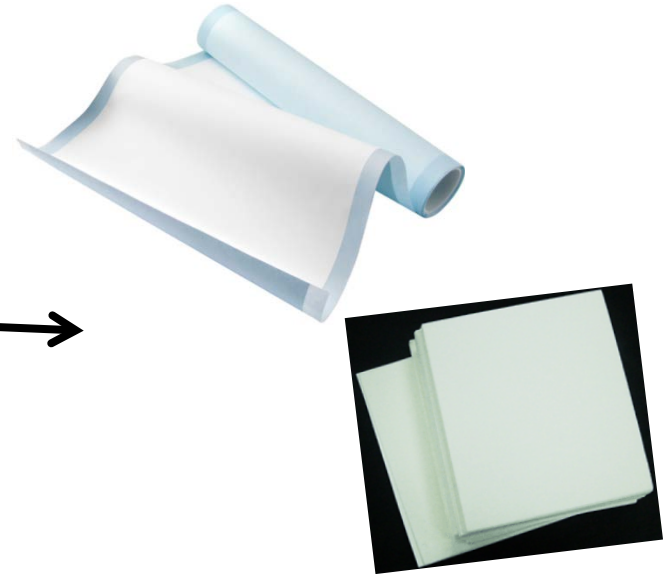
WESTERN BLOTTING – MEMBRANE IMMOBILIZZANTI

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'Ag all'Ab



Gel di poliacrilamide

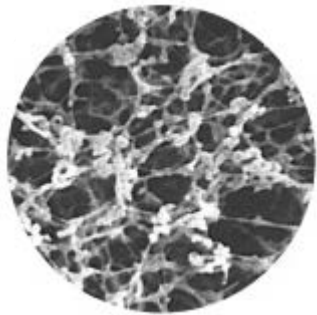
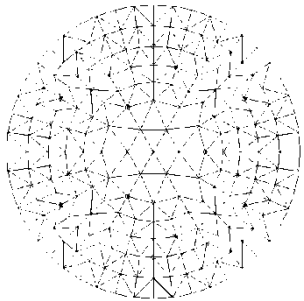


Membrana immobilizzante

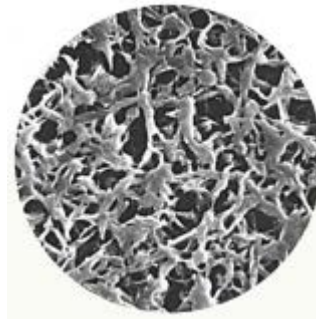
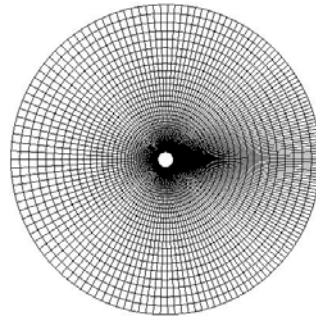
WESTERN BLOTTING – MEMBRANE IMMOBILIZZANTI

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

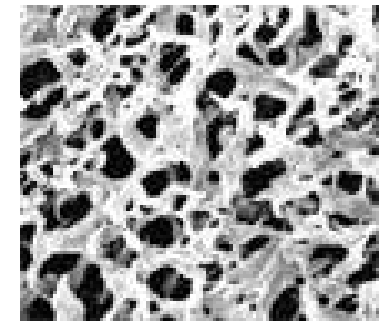
- **Blocca** la **diffusione** delle proteine
- Rende più **accessibili** gli **EPITOPPI** dell'Ag all'Ab



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

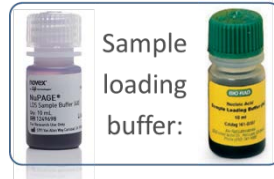
Tris-HCl a pH 6.8

SDS

addensante

riducente

traccianti

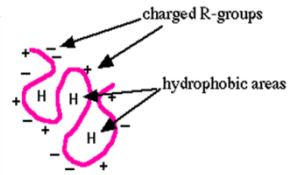
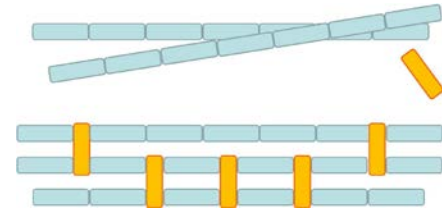


Sample loading buffer:

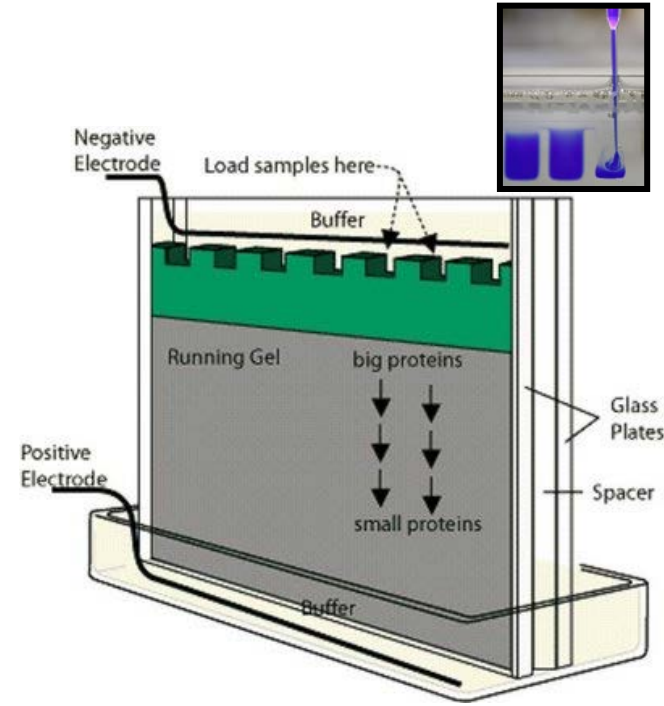
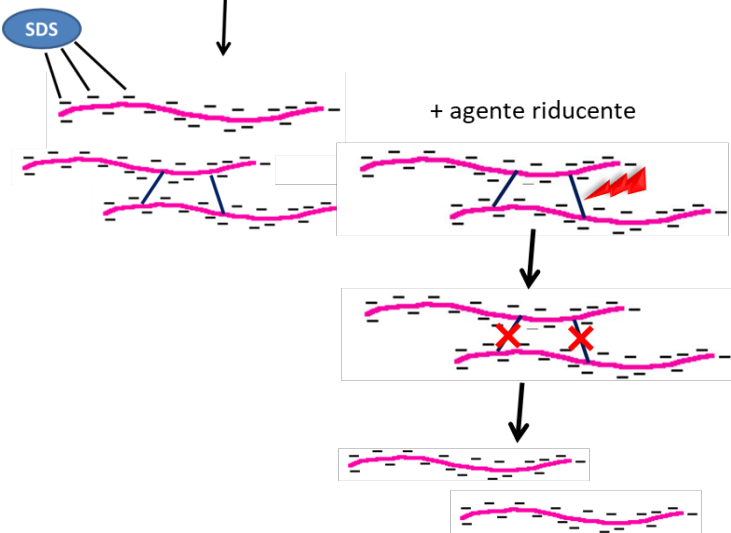
[Saccarosio o glicerolo]

[β -mercaptoetanol]

[Xilene Cianolo-Blu di Bromofenolo]



Calore + SDS



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

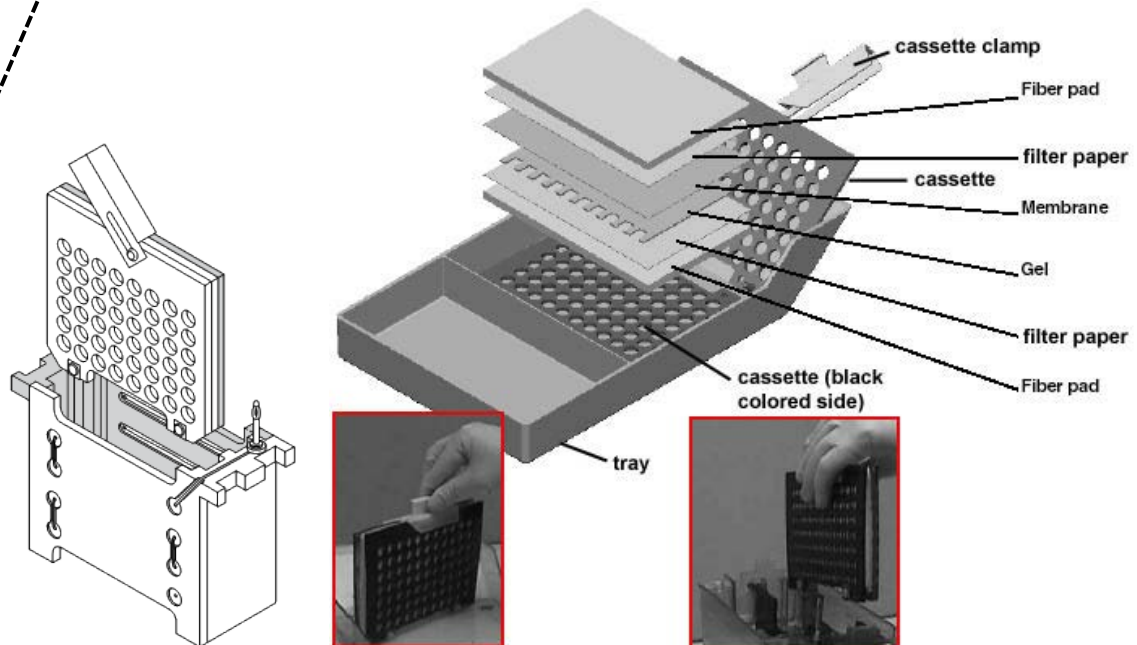
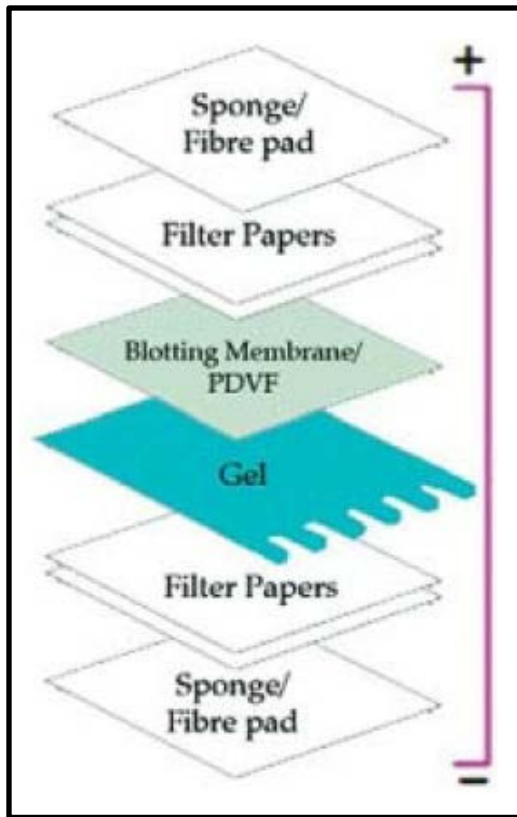
STEP SPERIMENTALI

- 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)

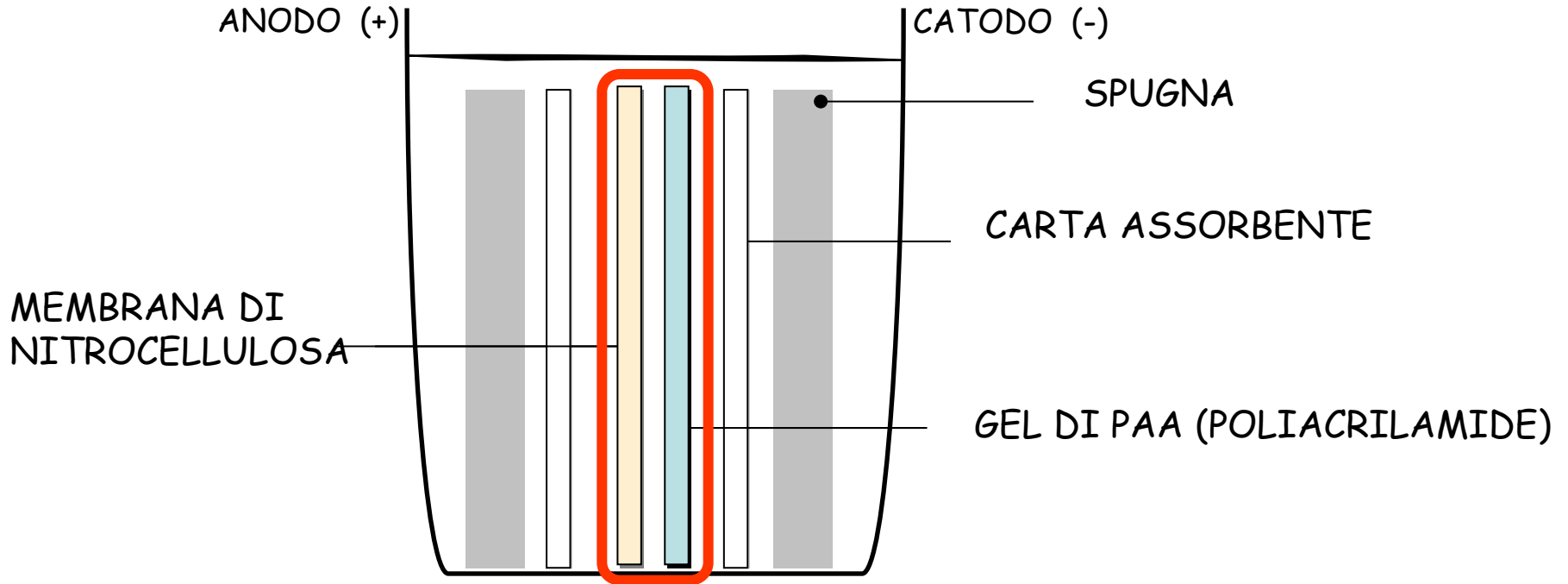
Spostamento delle proteine dal gel alla membrana immobilizzante

Preparazione del "sandwich"

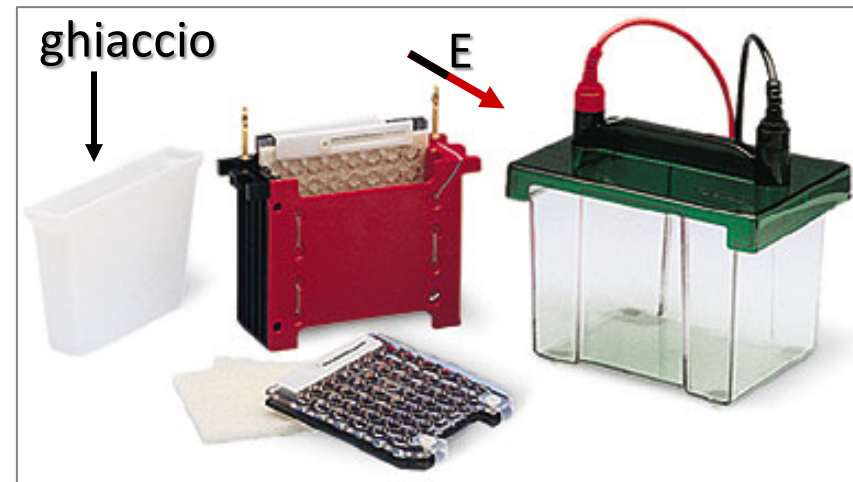


FASE DI TRASFERIMENTO (BLOTTING)

ELETTROBLOTTING



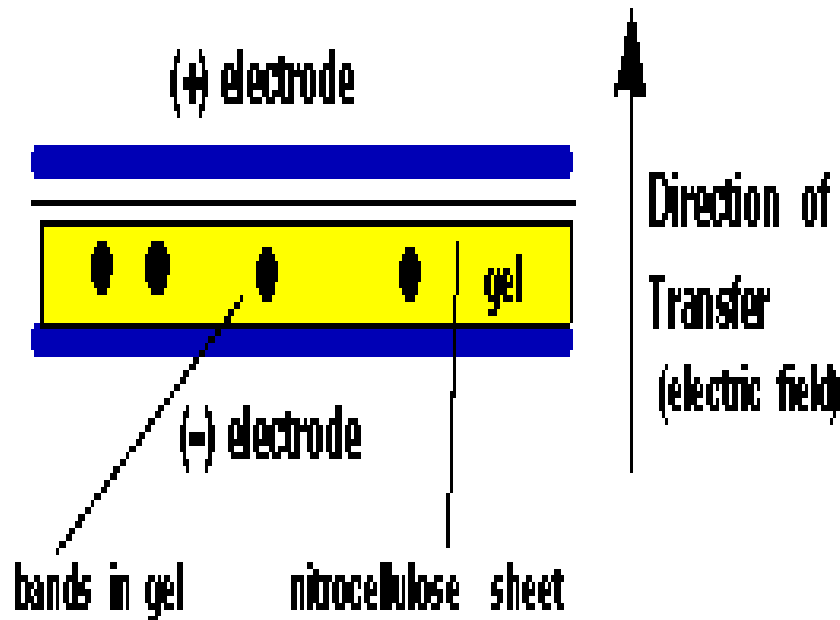
Trasferimento delle proteine dal gel alla membrana di nitrocellulosa mediante un **CAMPO ELETTRICO ORTOGONALE AL GEL**



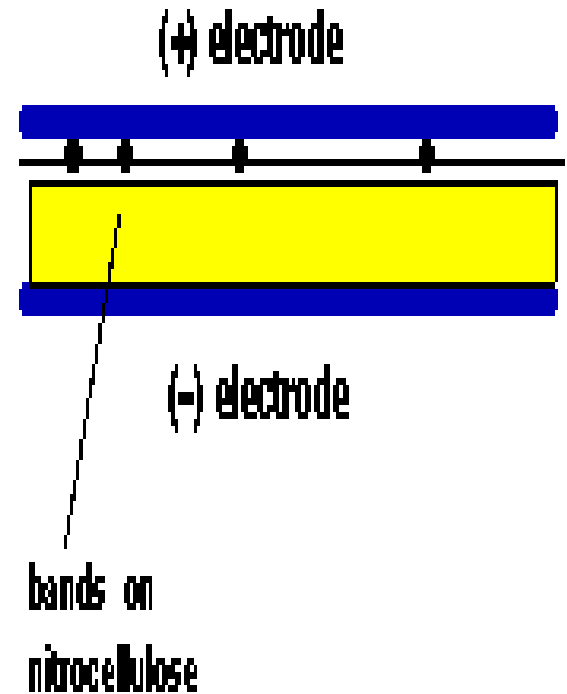
FASE DI TRASFERIMENTO (BLOTTING)

ELETTROBLOTTING

Before Transfer:



After Transfer:



Note: All the layers are pressed tightly together.

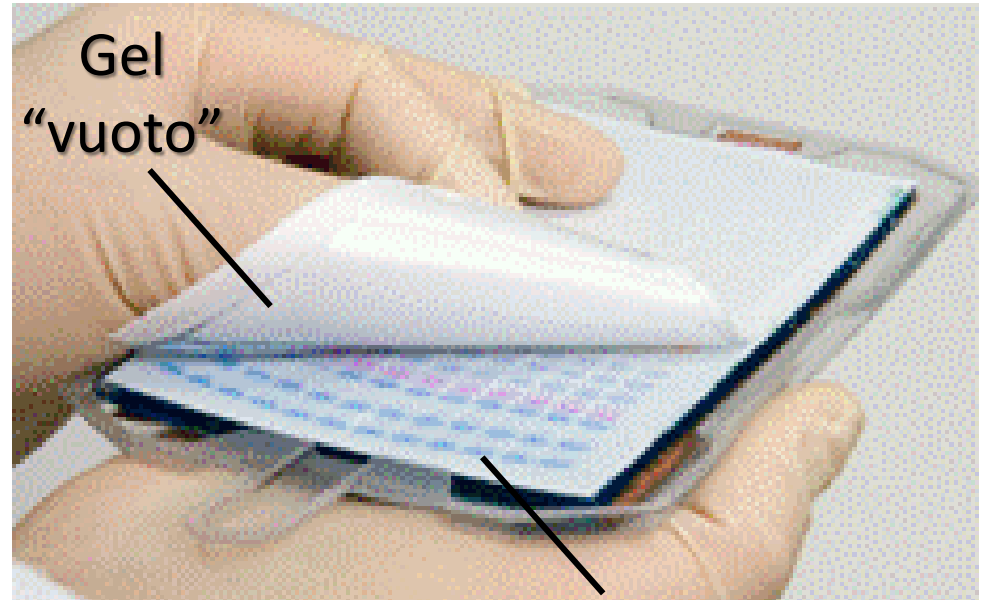
FASE DI TRASFERIMENTO (BLOTTING)

ELETTROBLOTTING

Vista di lato del
supporto completo:



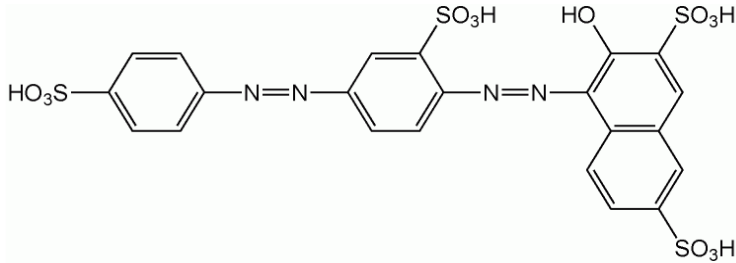
Risultato



Le proteine sono state trasferite??

Dal Gel??? Sulla Membrana???

PONCEAU S

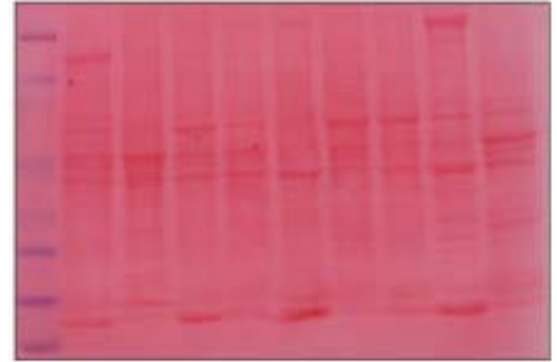


Produce un vivido colore **rosso**.
Colorazione semplice, **reversibile**,
molto rapida ed economica.

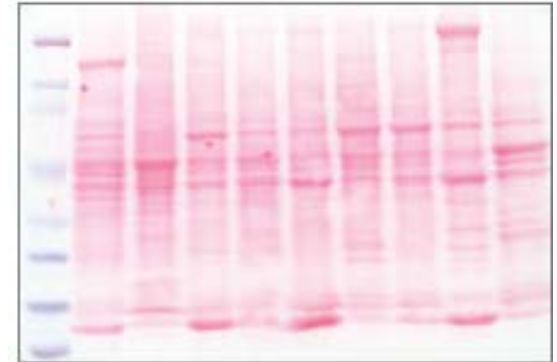
Frequente uso su nitrocellulosa.

Pochi minuti di incubazione,
poi rimozione con tampone o
H₂O distillata.

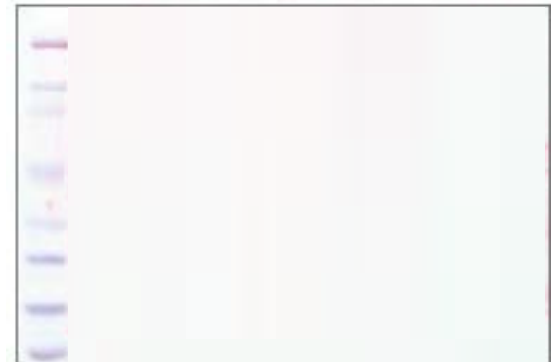
Colorazione



Rimozione eccesso



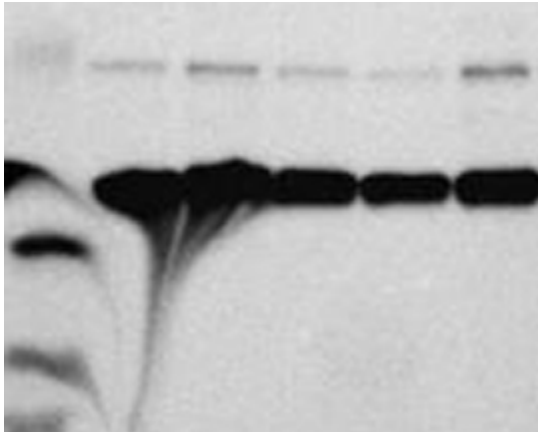
Decolorazione



FASE DI TRASFERIMENTO (BLOTTING)

Alcuni problemi che si possono incontrare.....

Presenza di bolle



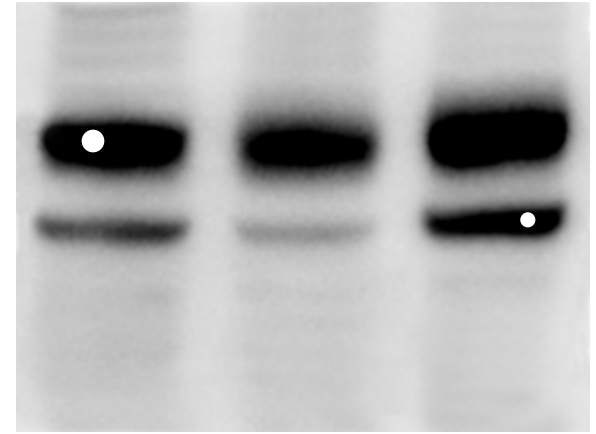
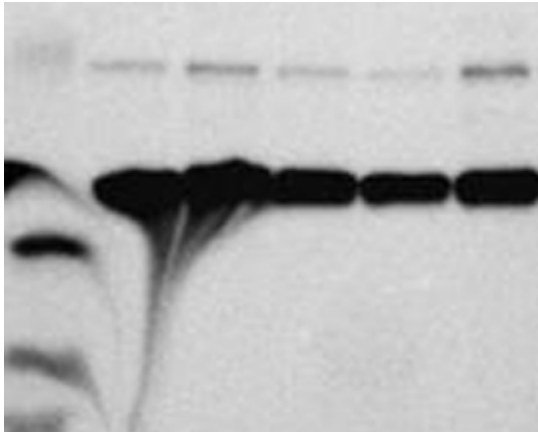
Basso contatto tra
gel e membrana



FASE DI TRASFERIMENTO (BLOTTING)

Alcuni problemi che si possono incontrare.....

Presenza di bolle



Basso contatto tra
gel e membrana



Rimuovere le bolle durante la
preparazione del sandwich

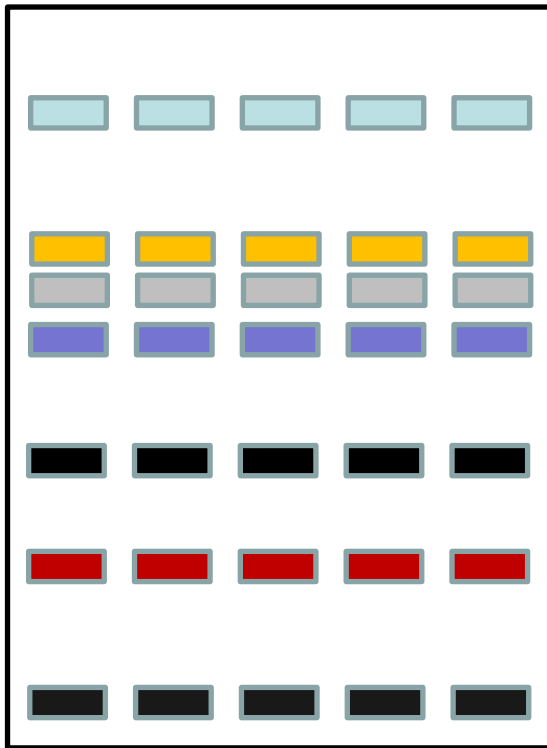
STEP SPERIMENTALI

- 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

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)



"Blocking" buffers:

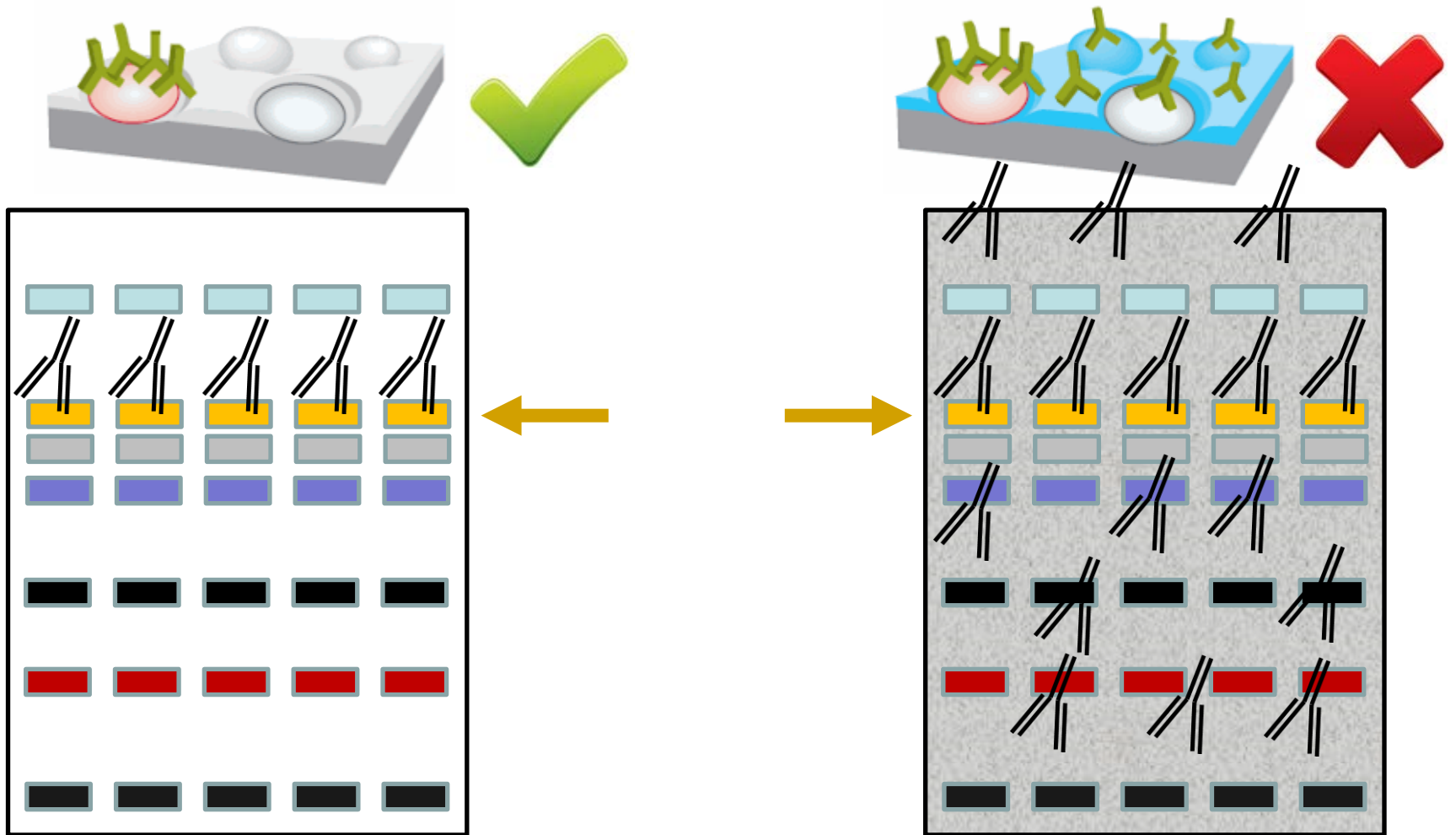
Tamponi a base di **PBS** o **TBS**

+

- **Non-Fat Dry Milk** (0.5-5% p/v)
Mix di proteine del latte privo di grassi
- **BSA (Bovine Serum Albumin)** (1-5% p/v)
Albumina di siero bovino

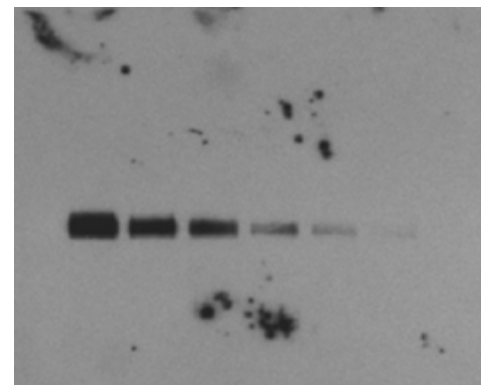
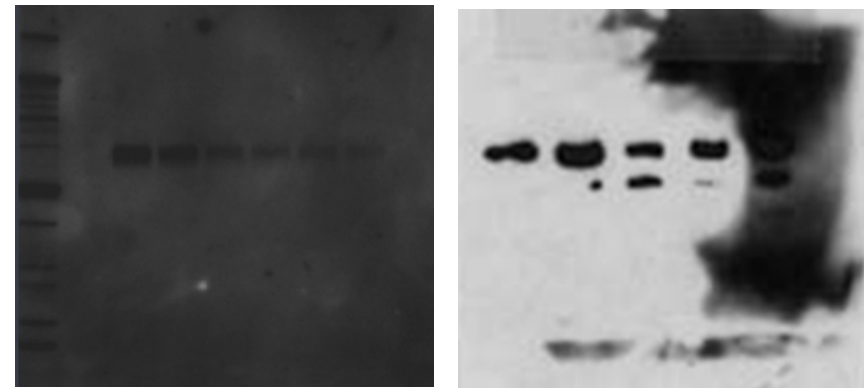
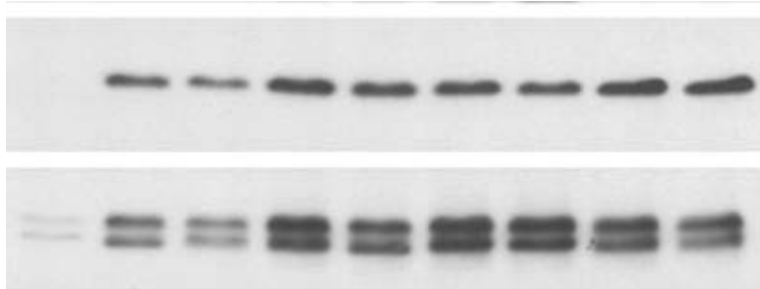
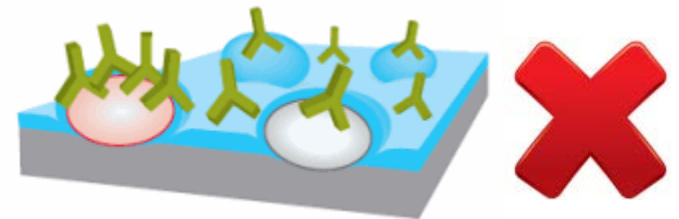
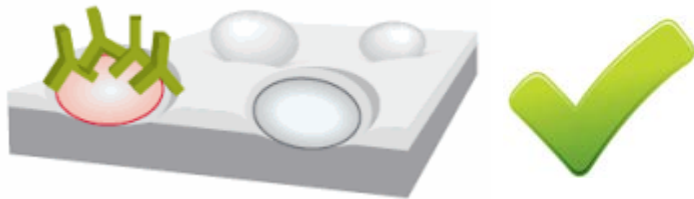
SATURAZIONE DELLA MEMBRANA

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



SATURAZIONE DELLA MEMBRANA

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



STEP SPERIMENTALI

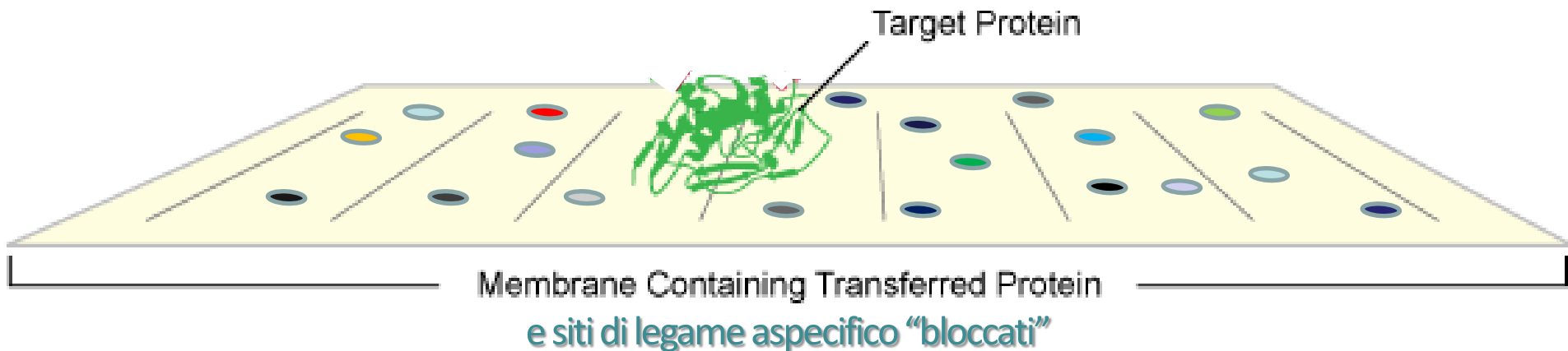
- Preparazione del campione
 - Separazione elettroforetica
- } come per SDS-PAGE
- **Trasferimento** delle proteine dal gel alla membrana immobilizzante, tramite un campo elettrico perpendicolare al gel.
 - **Saturazione** della membrana con una soluzione proteica (BSA o caseina del latte)
 - Aggiunta 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.)

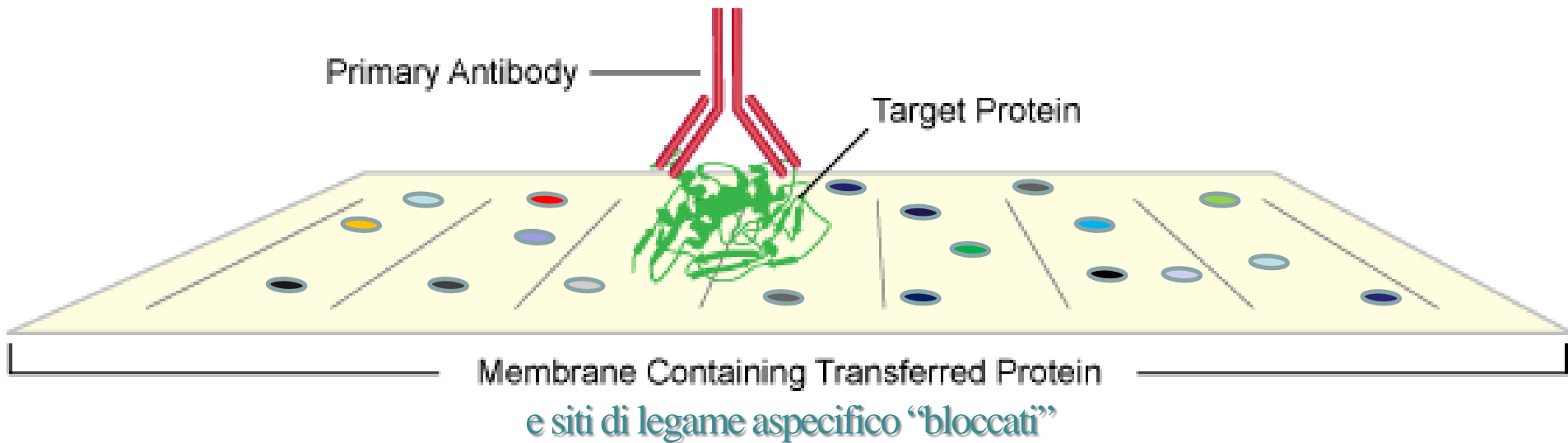


Serve uno strumento altamente **SPECIFICO** per quella proteina



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



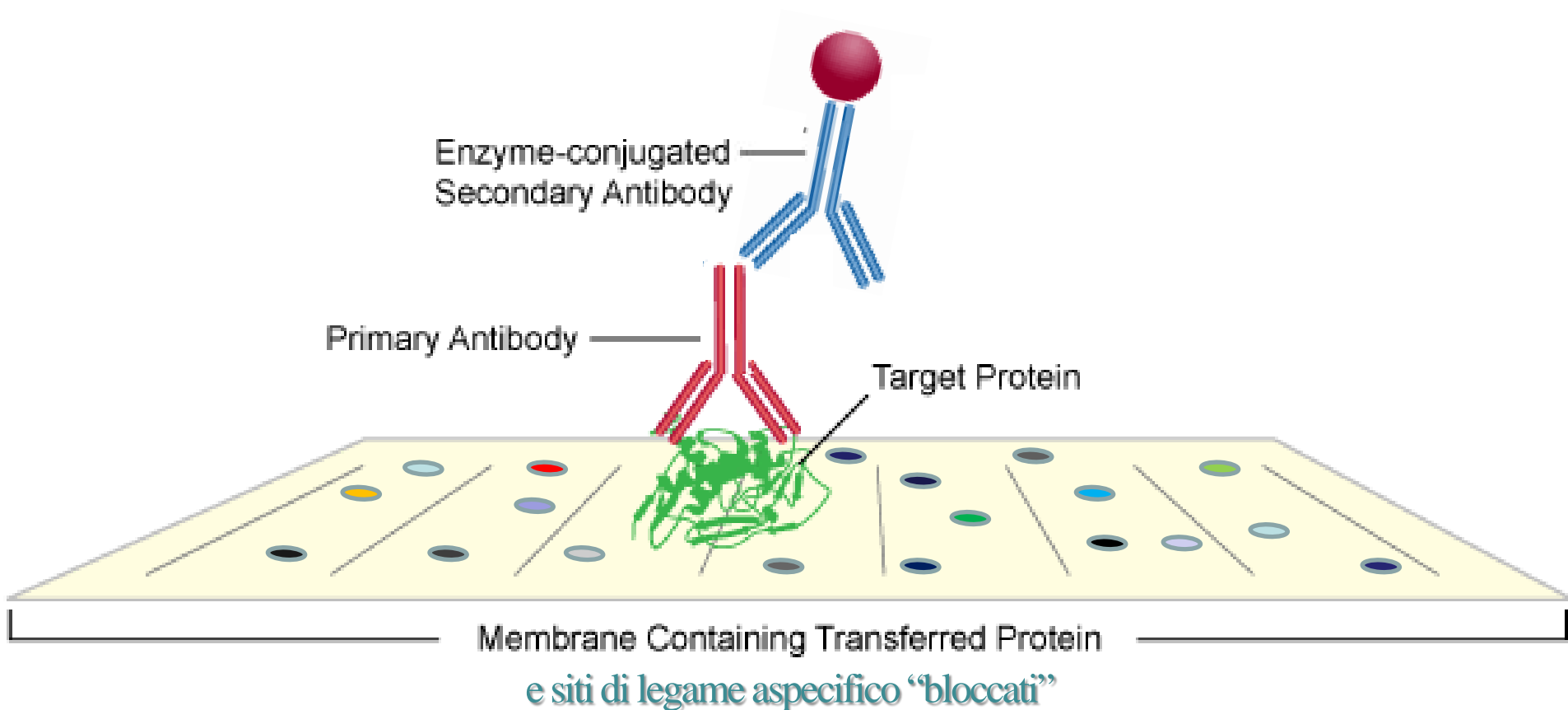
STEP SPERIMENTALI

- 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)

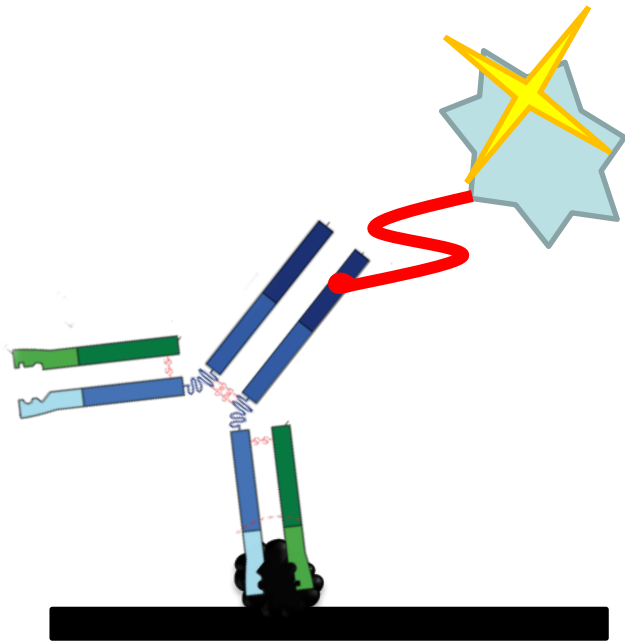
AGGIUNTA DELL'ANTICORPO SECONDARIO

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**)

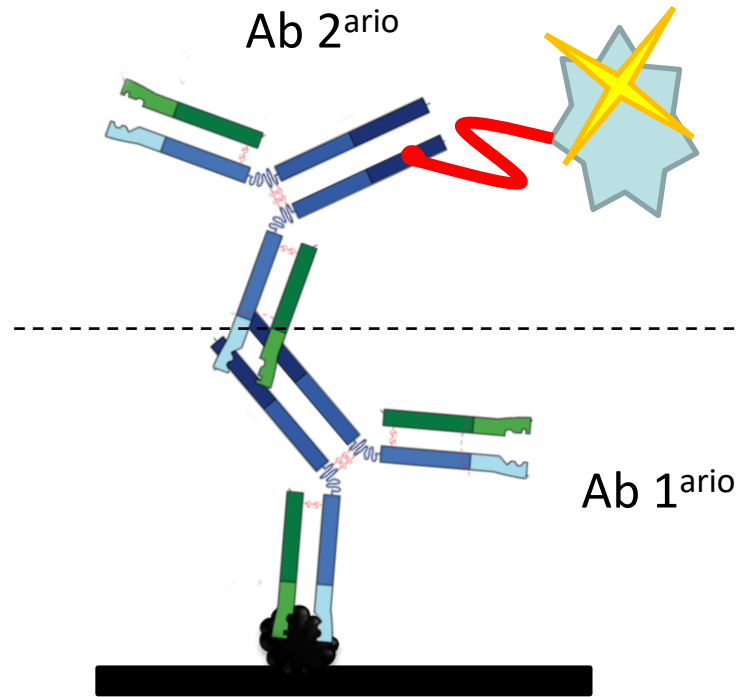


IL RICONOSCIMENTO MEDIANTE Ab PUÒ ESSERE DIRETTO O INDIRETTO



Riconoscimento diretto

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



Riconoscimento indiretto

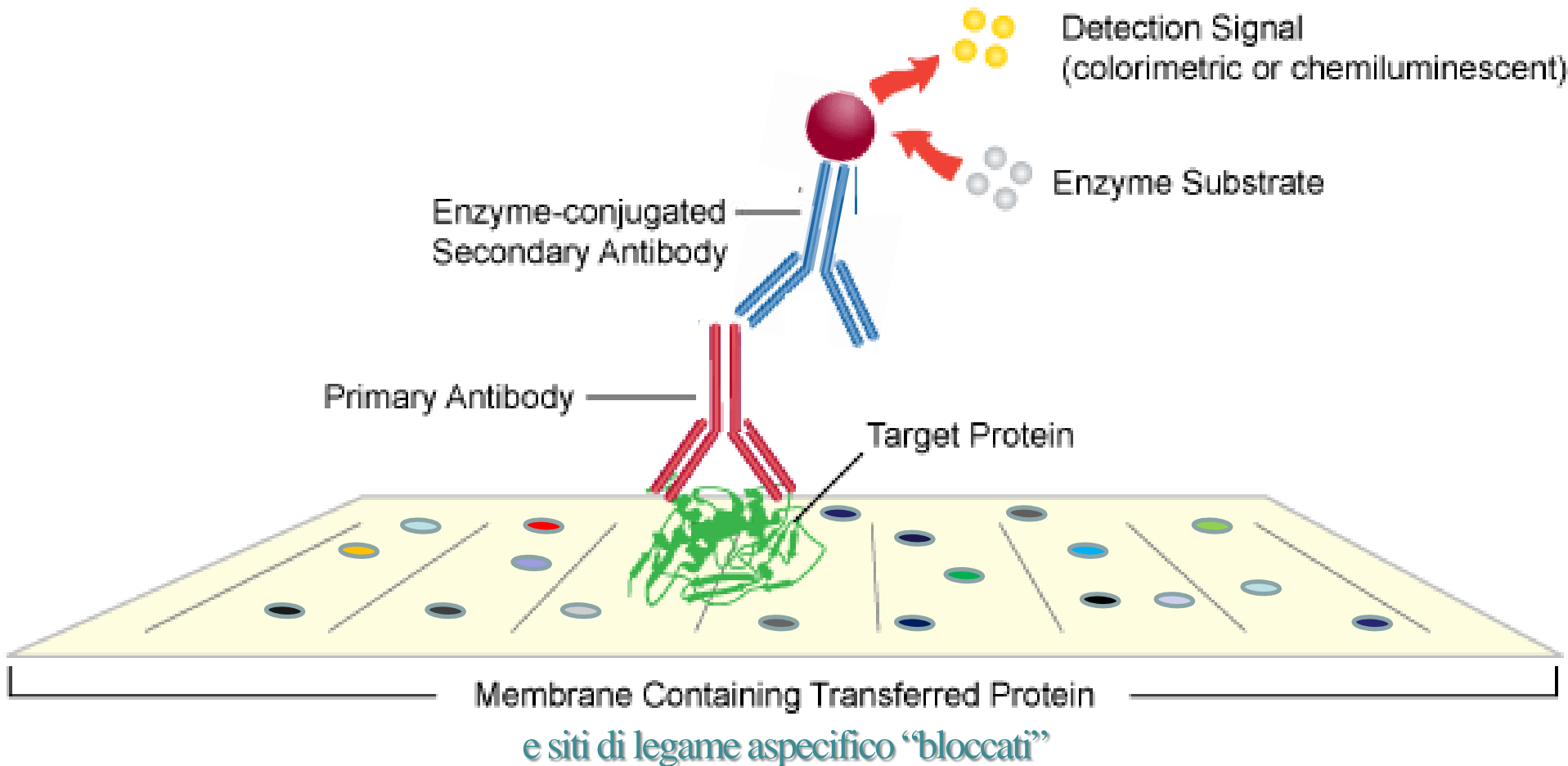
Il riconoscimento avviene mediante due anticorpi. L'epitopo è riconosciuto da un primo anticorpo, a sua volta riconosciuto e legato dal secondo anticorpo coniugato con il sistema di rilevazione

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**

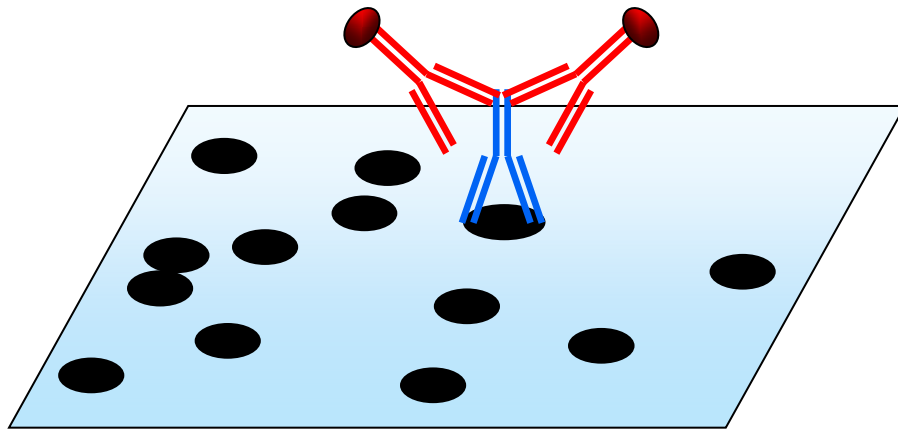
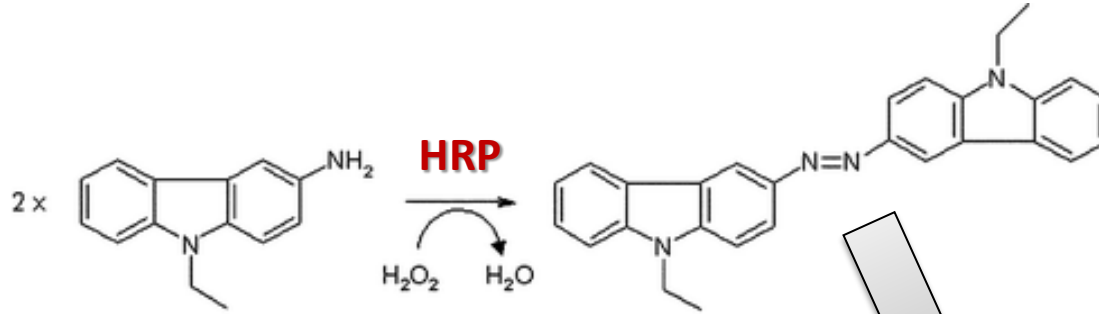
conversione di un substrato in
precipitato (prodotto) colorato

Rilevazione in

chemiluminescenza

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

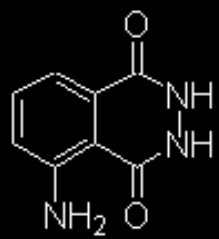
RILEVAZIONE COLORIMETRICA



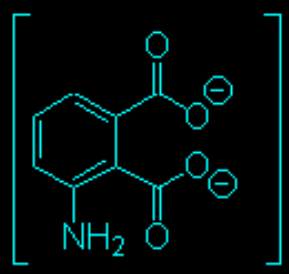
● **Perossidasi** = usando H_2O_2 come substrato, **ossida** il

3-amino-9-etilcarbazolo

a prodotto insolubile e **marrone**.



luminol



+ N₂

3-aminophthalate* (3-APA*)

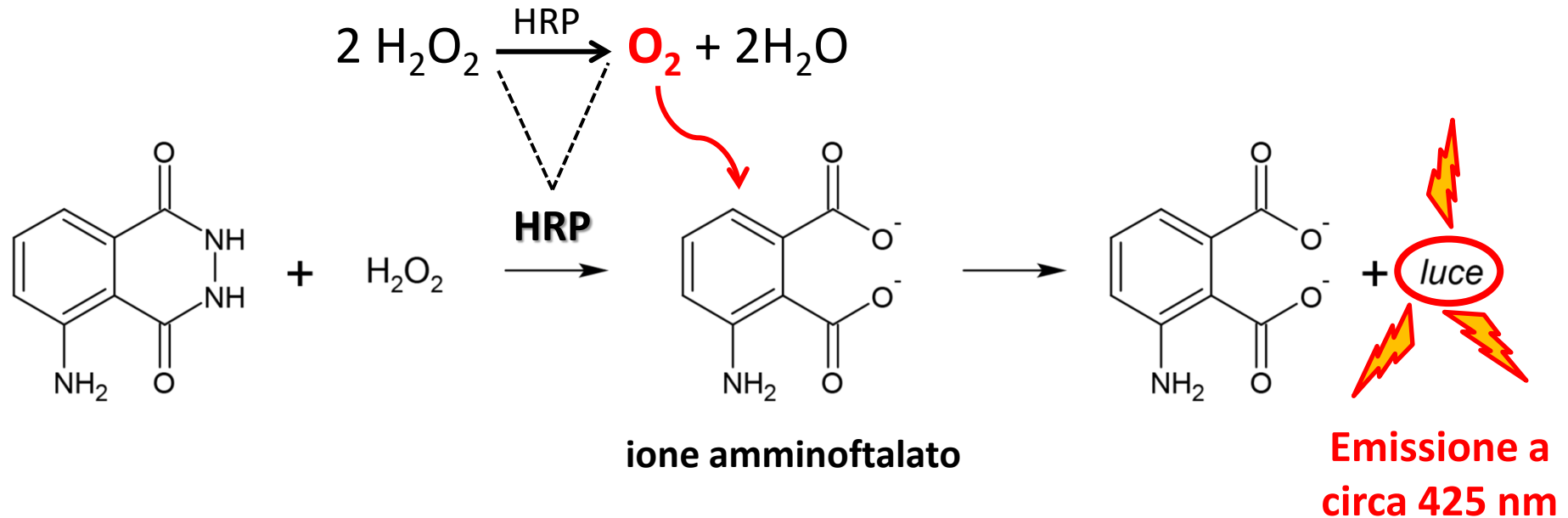
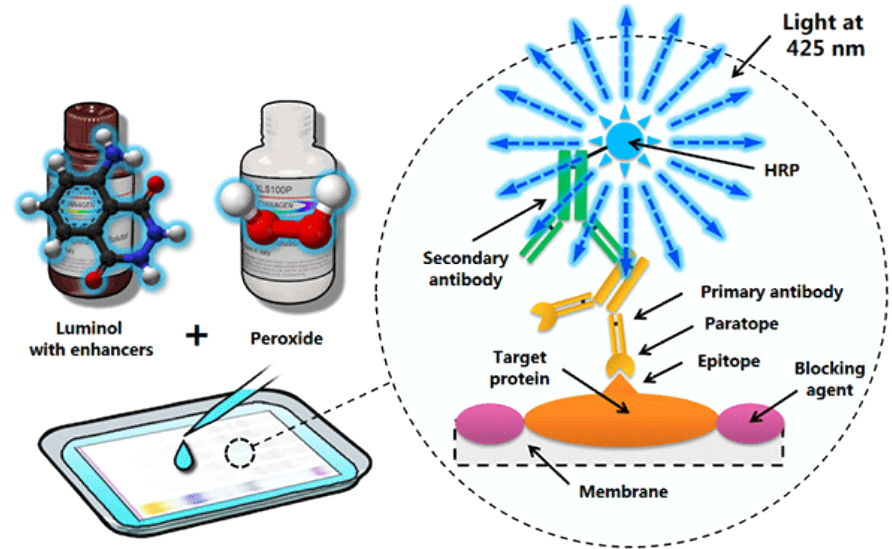
3-APA + LIGHT

Luminolo



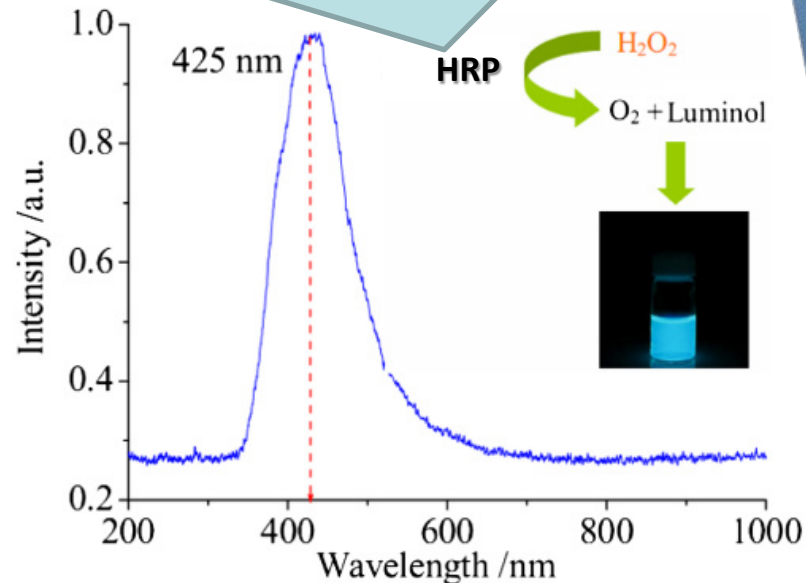
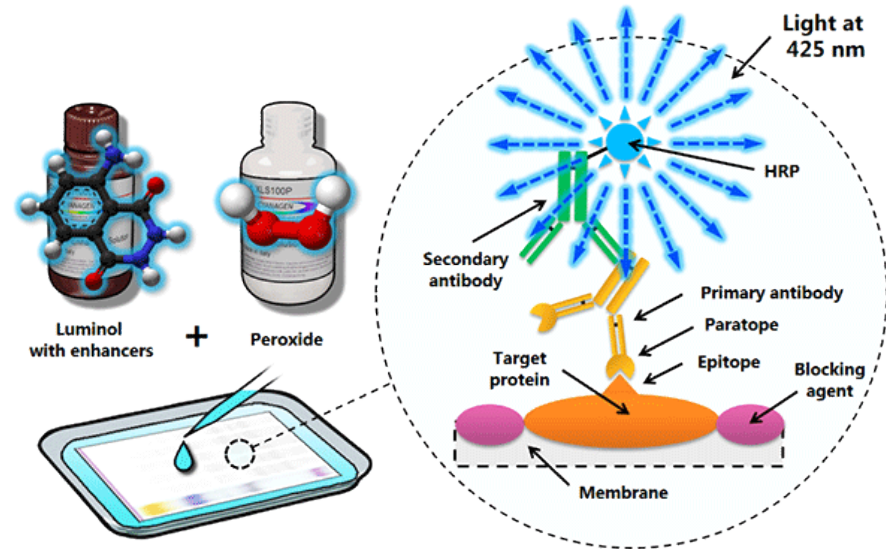
RIVELAZIONE IN CHEMILUMINESCENZA

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.

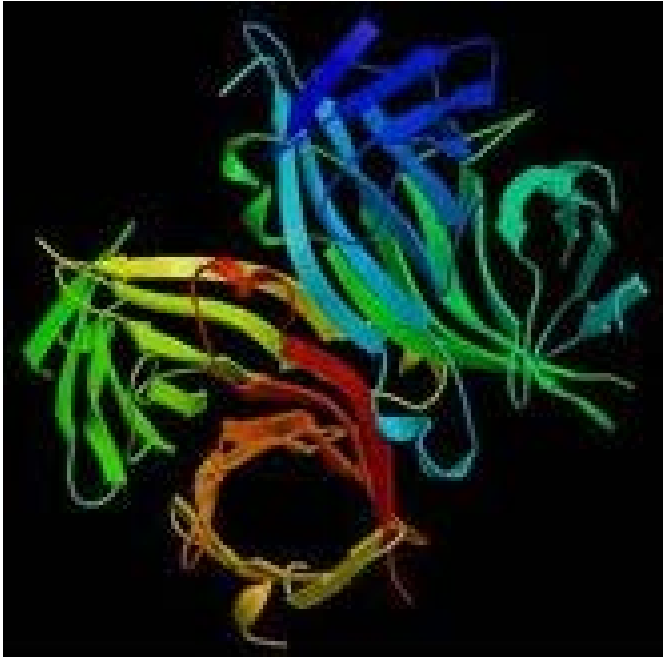


RIVELAZIONE IN CHEMILUMINESCENZA

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.

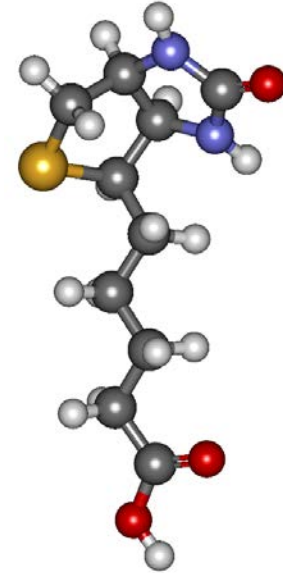


STREPTAVIDINA E BIOTINA



La **STREPTAVIDINA**

è una proteina (MW 60 kDa) isolata dal batterio *Streptomyces avidinii*.

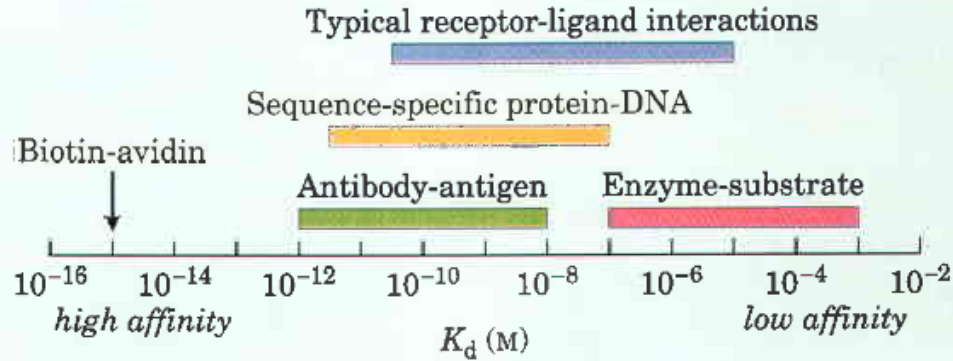


La **BIOTINA**

è una vitamina idrosolubile.

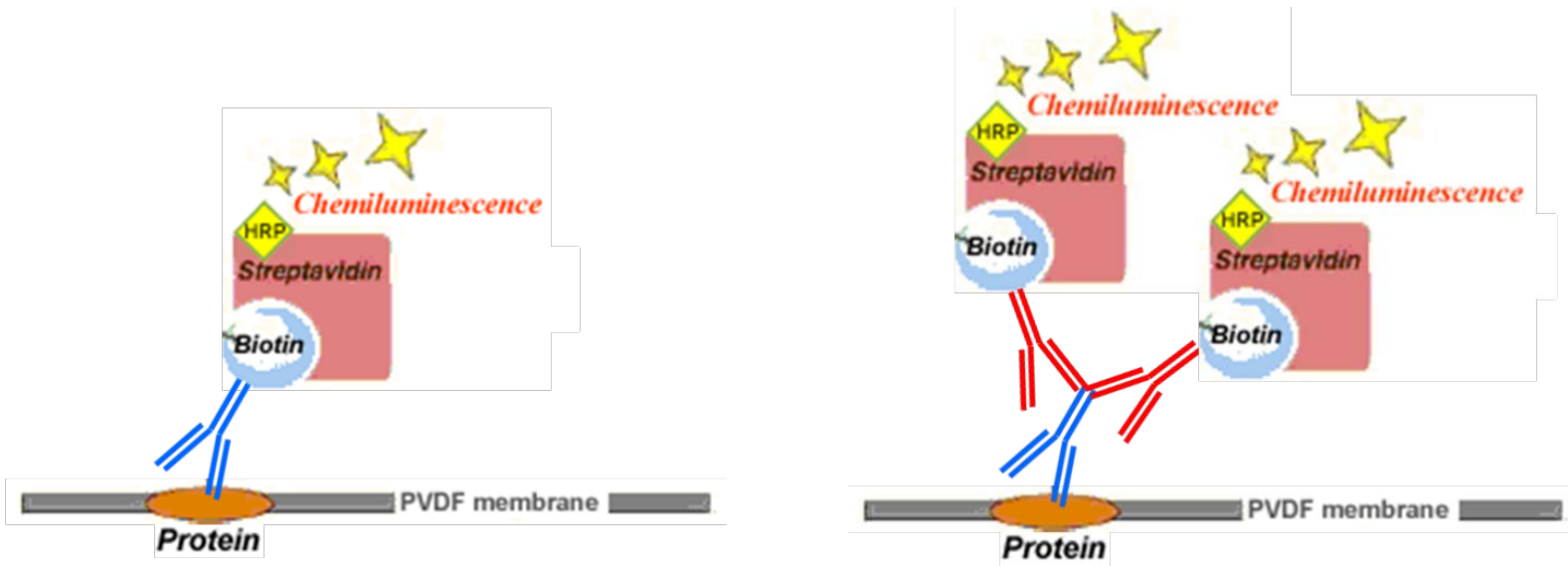
La loro interazione viene sfruttata come sistema di rilevazione con anticorpi

K_d STREPTAVIDINA E BIOTINA



Color bars indicate the range of dissociation constants typical of various classes of interactions in biological systems. A few interactions, such as that between the protein avidin and the enzyme cofactor biotin, fall outside the normal ranges. The avidin-biotin interaction is so tight it may be considered irreversible. Sequence-specific protein-DNA interactions reflect proteins that bind to a particular sequence of nucleotides in DNA, as opposed to general binding to any DNA site.

È l'interazione non covalente più forte conosciuta ($K_d = 10^{-15}$ M)



TAMPONI NEL WESTERN BLOTTING

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

TAMPONI NEL WESTERN BLOTTING

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

Transfer buffer

Tris 25 mM

Glicina 192 mM

metanolo 20% (v/v)

(SDS 0.025-0.1%)

pH 8.3

TAMPONI NEL WESTERN BLOTTING

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

"Blocking" buffers:

Tamponi a base di **PBS** o **TBS**

+

- **Non-Fat Dry Milk** (0.5-5% p/v)
Mix di proteine del latte privo di grassi
- **BSA (Bovine Serum Albumin)** (1-5% p/v)
Albumina di siero bovino

TAMPONI NEL WESTERN BLOTTING

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

Tamponi a base di **PBS** o **TBS**

+

1-2.5% Non-Fat Dry Milk

oppure

0.5-1% BSA

Per mantenere capacità bloccante anche durante l'incubazione con gli anticorpi e ridurre le interazioni aspecifiche (background)

TAMPONI NEL WESTERN BLOTTING

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

Fase di lavaggio per eliminare l'eccesso di Ab non legati e quindi rimasti in soluzione

TAMPONI NEL WESTERN BLOTTING

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

Fase di lavaggio per eliminare l'eccesso di Ab non legati e quindi rimasti in soluzione

+

Riduzione del "background" grazie all'utilizzo di un **detergente a bassa []** che **elimina le interazioni deboli**

Es. Soluzione tampone per lavaggi:

TBS (Tris 25 mM, NaCl 150 mM)

+

Tween-20 0.03-0.3% (p/v)



Carico + o carico -??

TAMPONI NEL WESTERN BLOTTING

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

Fase di lavaggio per eliminare l'eccesso di Ab non legati e quindi rimasti in soluzione

+

Riduzione del "background" grazie all'utilizzo di un **detergente a bassa []** che **elimina le interazioni deboli**

Es. Soluzione tampone per lavaggi:

TBS (Tris 25 mM, NaCl 150 mM)

+

Tween-20 0.03-0.3% (p/v)

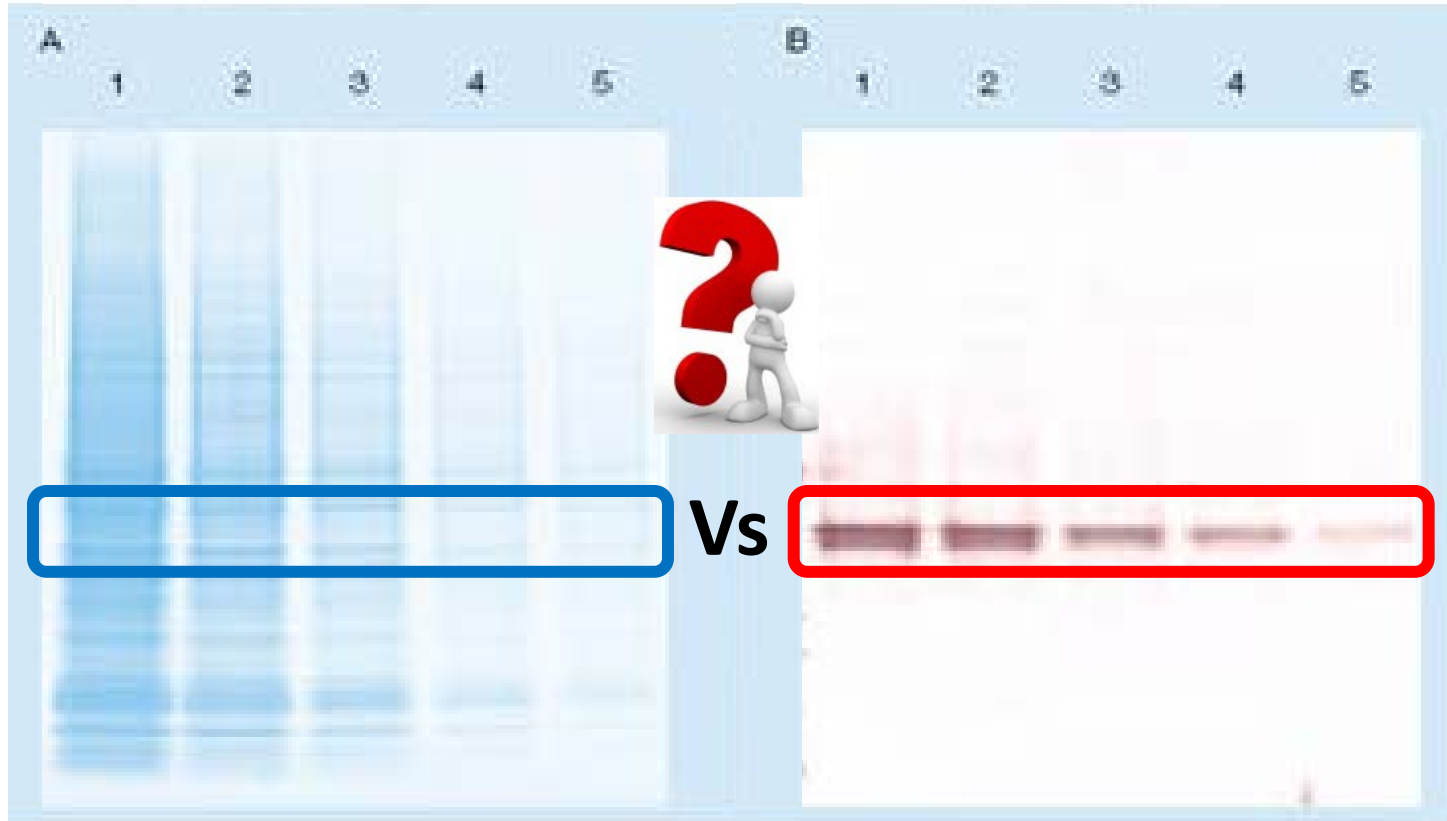
Anche in **blocking buffer** e nei tamponi per l'**incubazione** con gli **anticorpi**

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

Colorazione

Western Blotting

Marcatore
PM



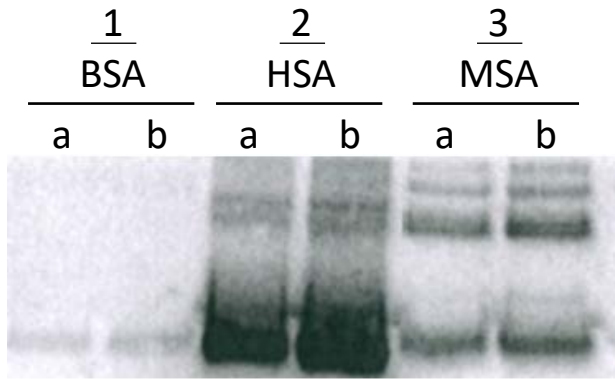
ASPECIFICA

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

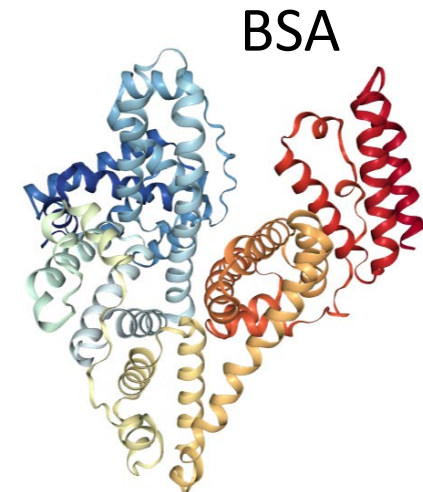
SPECIFICO

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

Esempio di protocollo di Western Blotting (e di cross-reattività)



Bovine Mouse Human
Serum
Albumin



Protocollo Western Blotting:

Campioni preparati come diluizioni 1:500.000 (a) e 1:1.000.000 (b) di:

- 1) Siero fetale bovino (FBS; 40-50 mg/ml)
- 2) Plasma umano (35-45 mg/ml)
- 3) Plasma di topo (30-35 mg/ml)

Preparazione: denaturazione a 95°C in presenza di SDS

Blocking buffer: PBS-NFDM 5% (w/v), 0.1% Tween-20 (v/v)

Anticorpo primario: goat polyclonal anti-human albumin

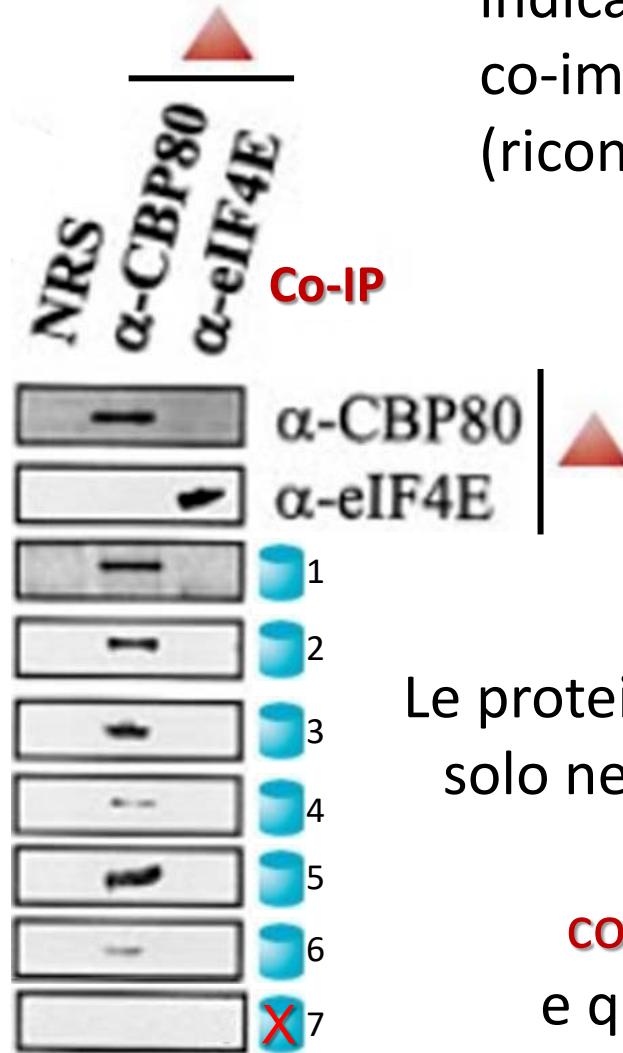
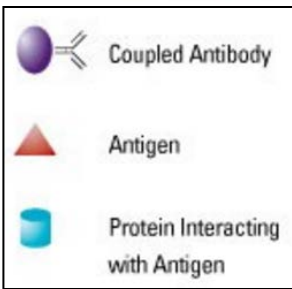
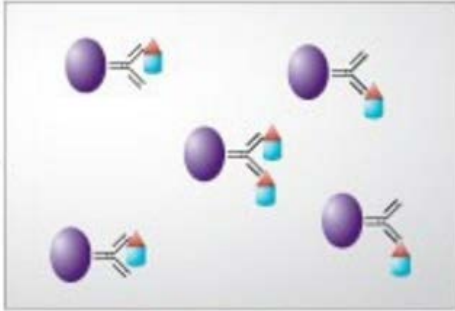
Anticorpo secondario: donkey polyclonal anti-goat IgG HRP-conjugated

Anticorpi diluiti in PBS-NFDM 2.5% (w/v), 0.1% Tween-20 (v/v)

Lavaggi: PBS, 0.1% Tween-20 (v/v)

Esempio di applicazione: **CO-IMMUNOPRECIPITAZIONE E WB**

Co-IP



Anticorpi specifici anti-■ indicano in WB quali proteine co-immunoprecipitano con ▲ (riconosciuto da ●)

Risultato:

Le proteine ■₁₋₆ vengono rilevate solo nella colonna di ▲ CBP80



co-immunoprecipitano,
e quindi interagiscono,
solo con la proteina ▲ **CBP80**

OTTIMIZZAZIONE

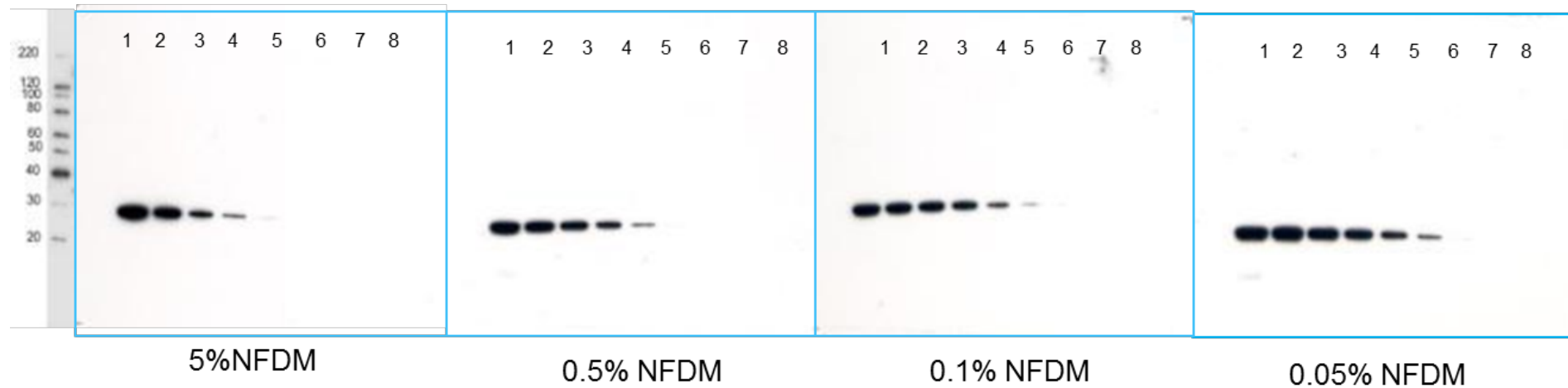


OTTIMIZZARE UN WESTERN BLOT

FASE DI BLOCKING

Talvolta il blocking buffer può mascherare il segnale di Ag poco presenti

Necessità di **ridurre** la % di agente bloccante (es. NFDM) per **aumentare** l'**accessibilità dell'Ag** e quindi il **segnale** rilevato







NFDM = Non-Fat Dry Milk

Segnale

OTTIMIZZARE UN WESTERN BLOT

CONCENTRAZIONE (DILUIZIONE) DEGLI ANTICORPI

Problema	Concentrazione anticorpo PRIMARIO	Concentrazione anticorpo SECONDARIO
Elevato Background		
Bassa specificità Bande flebili o assenza di bande		

Le concentrazioni di anticorpo **primario** e **secondario** devono essere ottimizzate in modo da avere alta specificità e minimo background

OTTIMIZZARE UN WESTERN BLOT

CONCENTRAZIONE (DILUIZIONE) DEGLI ANTICORPI

Problema	Concentrazione anticorpo PRIMARIO	Concentrazione anticorpo SECONDARIO
Elevato Background		

Diluizione Ab 2^{ario}

1/200



1/500



1/1000



ECCESSO DI Ab 2^{ario}

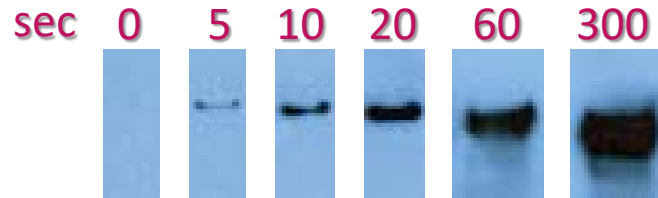
Background



OTTIMIZZARE UN WESTERN BLOT

RILEVAZIONE DEL SEGNALE

TEMPI DI ESPOSIZIONE



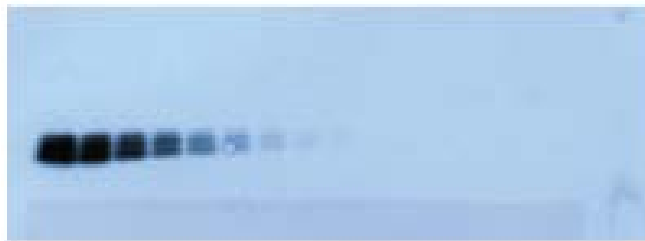
TIPO DI ENZIMA CONIUGATO ALL'ANTICORPO (es. AP, HRP)

TIPO DI SUBSTRATO O CON DIVERSA SENSIBILITÀ

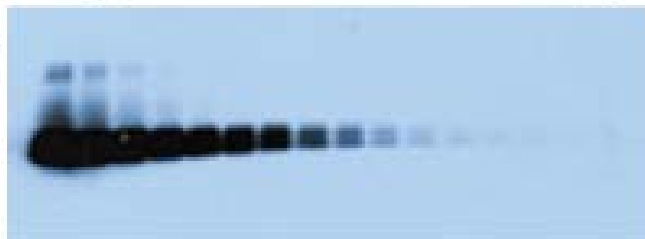
1 minute exposure

50 ng → 3 pg

GE Healthcare
Amersham ECL
Substrate



Thermo Scientific
SuperSignal West Pico
Substrate



Sensibilità

Sensibilità crescente in funzione
del tipo di intensificatore
(enhancer) chimico

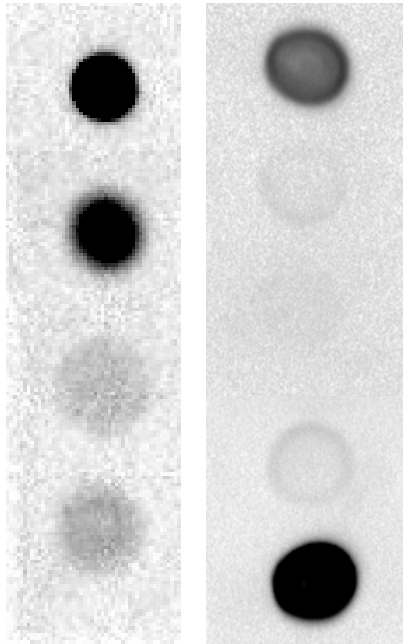


Sensibilità anche fino ai
picogrammi (10^{-12})
o **femtogrammi** (10^{-15})

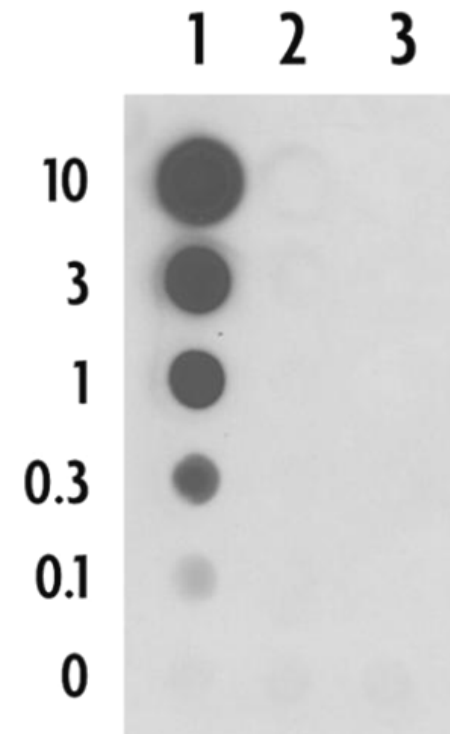
DOT BLOT

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

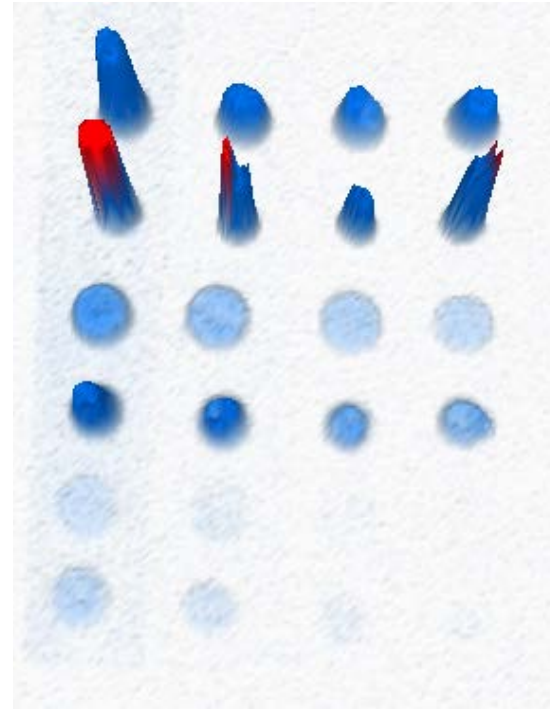
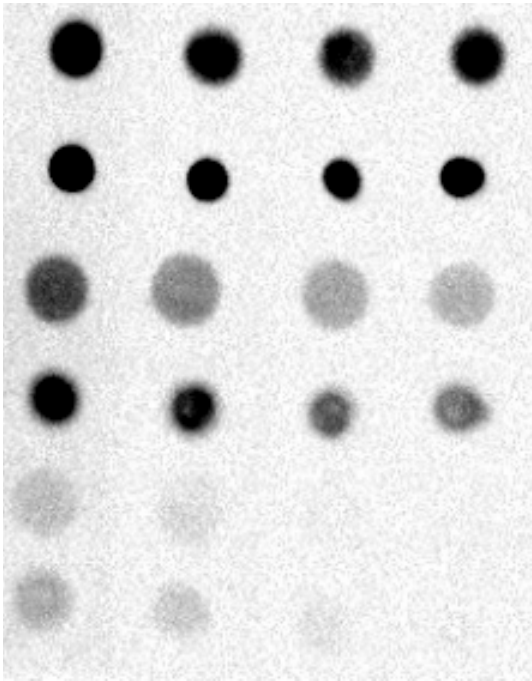
Identificazione della presenza di un Ag in miscele complesse



Ottimizzazione delle concentrazioni di Ab



DOT BLOT



SVANTAGGI

Riconoscimento e legame più difficili.

VANTAGGI

Rapidità e semplicità di esecuzione.