

# Blotting

Trasferimento di macromolecole su una membrana

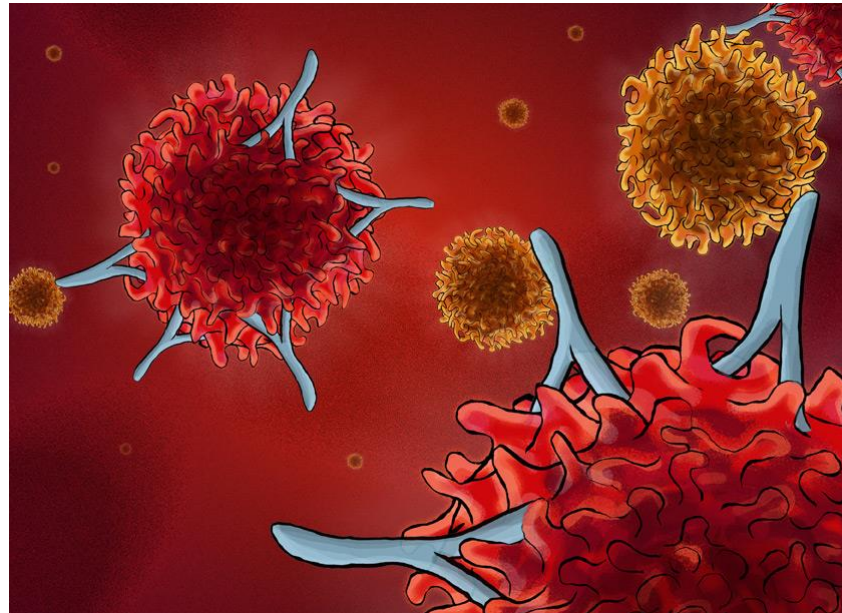
**DNA: Southern blot** (Edwin Southern, 1975)

**RNA: Northern blot** (James Alwine, David Kemp e George Stark, 1977)

**Proteine: Western blot** (Neal Burnette, 1979)

# Tecnica Immunologica

Mediante anticorpi (immunoglobuline) è possibile rilevare la quantità di antigene (proteine, polisaccaridi e acidi nucleici) sfruttando il riconoscimento specifico di un determinante antigenico (epitopo).



# Cosa è un Western Blot?

È una tecnica in cui le proteine sono, inizialmente, separate mediante elettroforesi su gel e successivamente trasferite su un supporto (membrana o filtro). Questa tecnica si usa per rilevare e quantificare proteine che reagiscono con un anticorpo specifico.

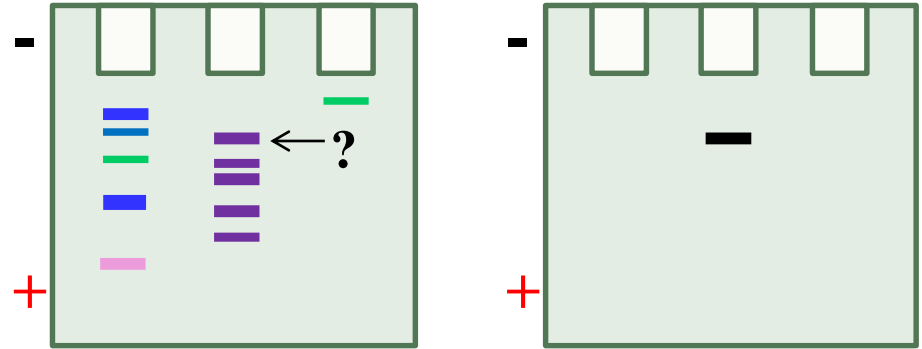
Questo sistema unisce:

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

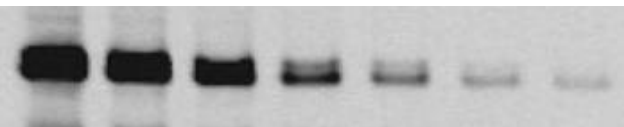
# A cosa serve il Western Blot?

## Qual è la proteina che mi interessa?

Tecnica che consente di individuare una proteina tra milioni, grazie all'utilizzo di anticorpi

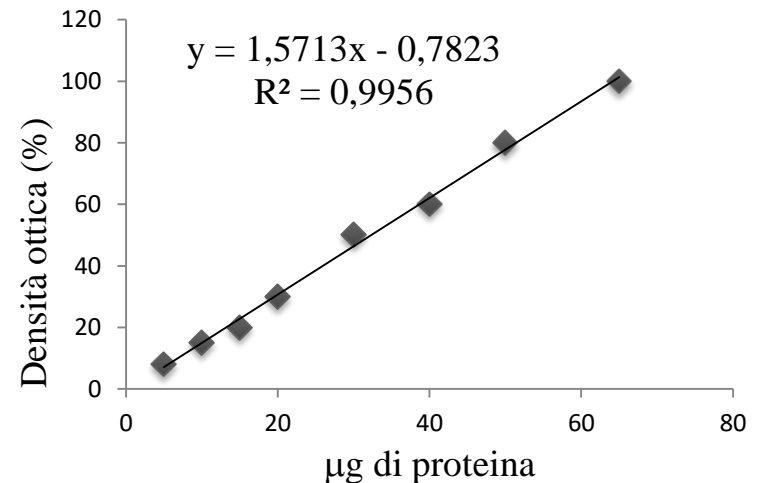


## Quanta proteina di interesse c'è?

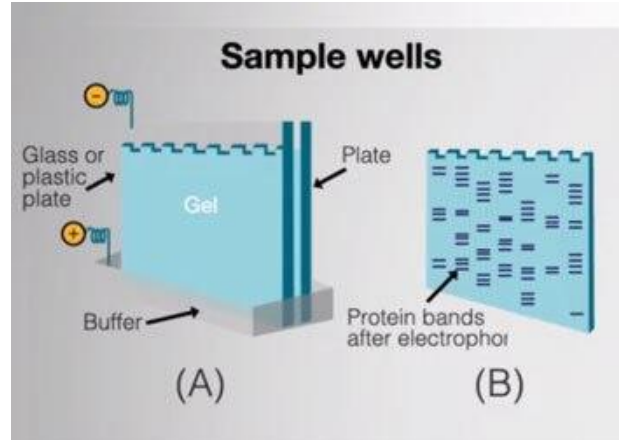


*µg di proteina*

µg	Densità ottica %
5	8
10	15
15	20
20	30
30	50
40	60
50	80
65	100

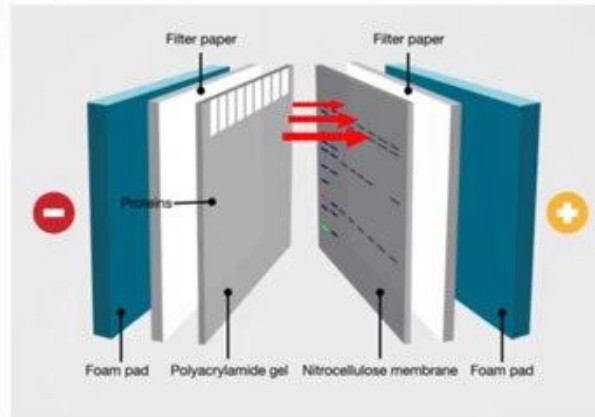


# Fasi del western blot



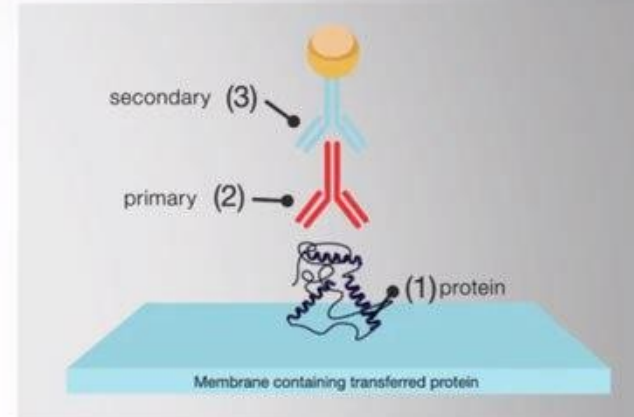
## 1. Separate

proteins by gel electrophoresis



## 2. Transfer

proteins from the gel to a solid support



## 3. Detect

Where we use antibodies specific to the target protein to visualize the protein of interest.

1. Elettroforesi

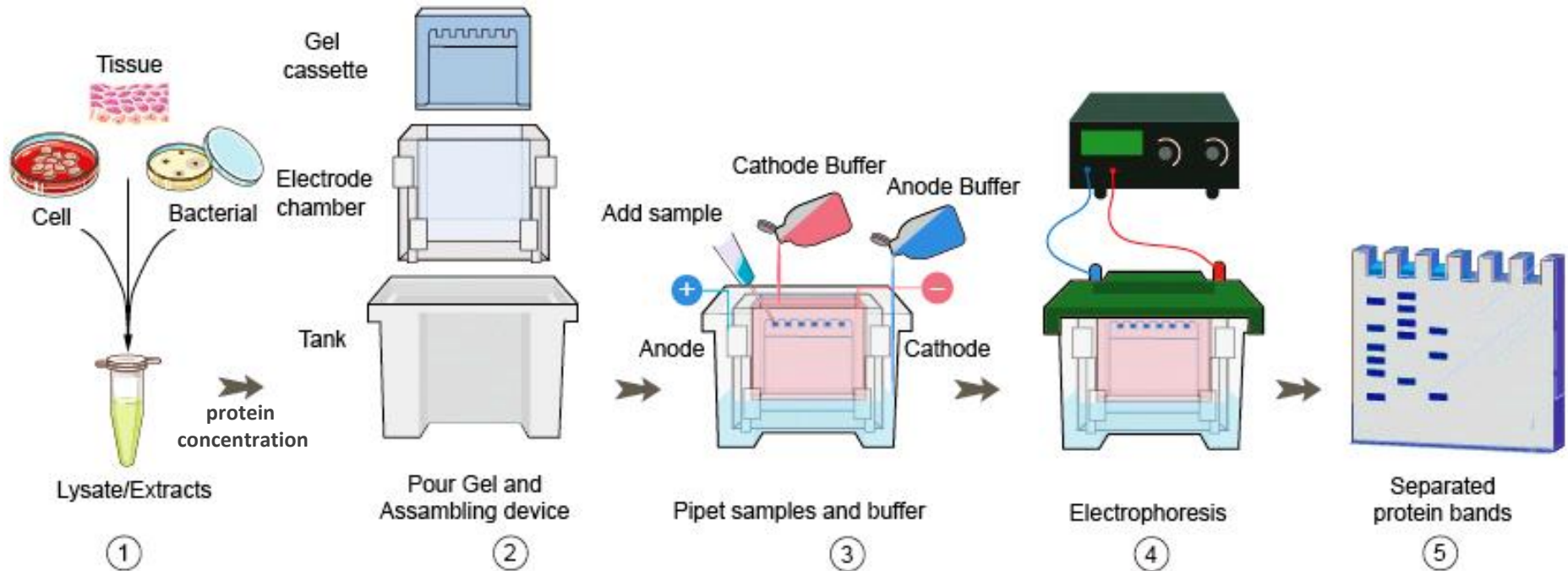
2. Trasferimento

3. Saturazione della membrana  
e blocco dei siti aspecifici

. Anticorpo I e II

. Rivelazione

# 1 fase: Elettroforesi

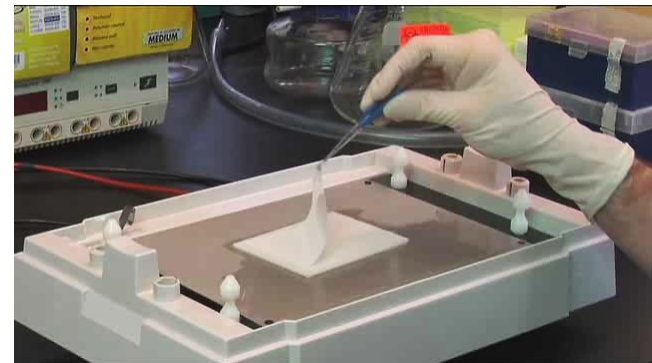


# 2 fase: trasferimento (Tipologie di Blotting)

- Wet Transblot system



- Semidry system



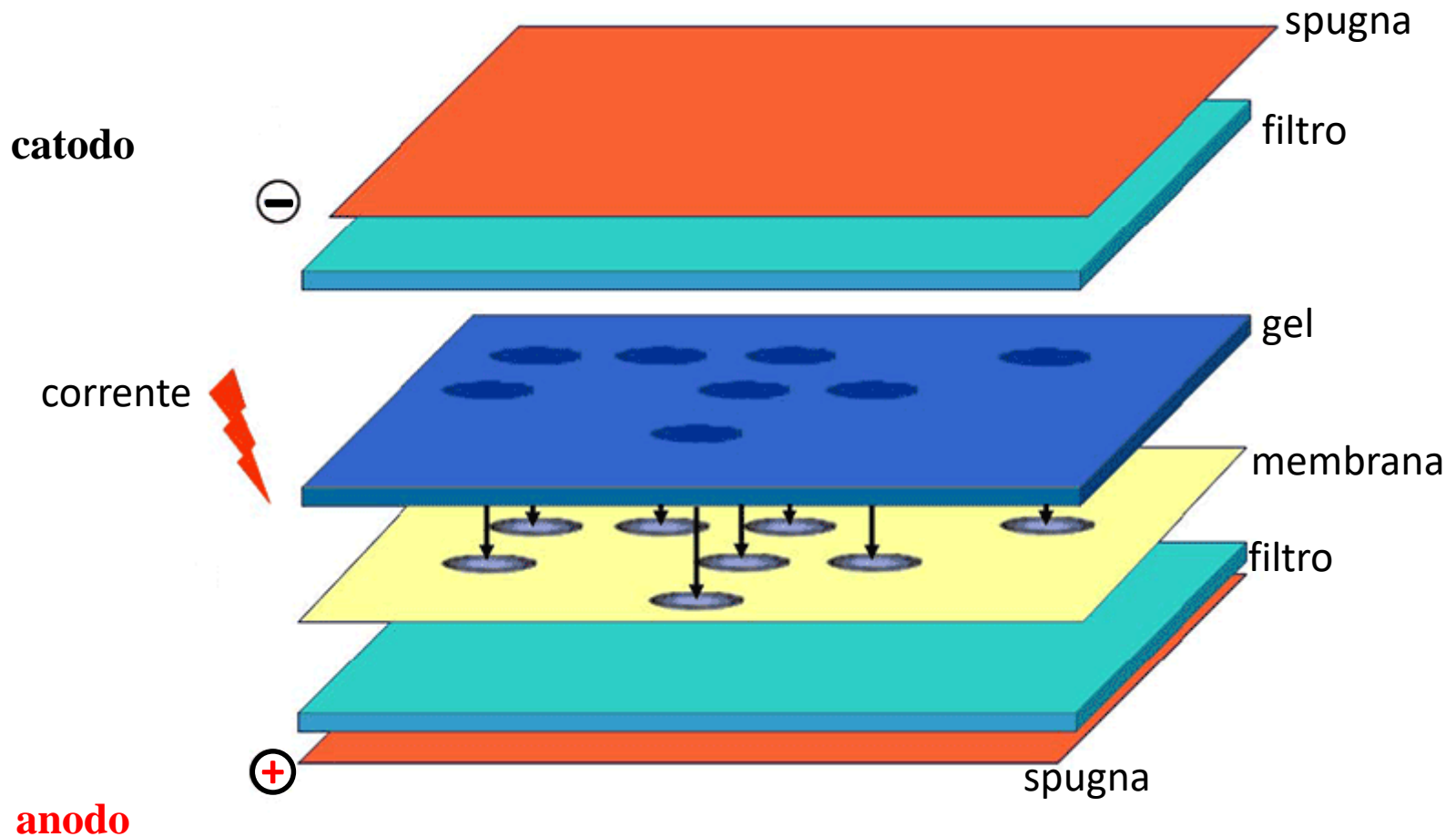


# Come preparare il sandwich





# Come preparare il sandwich

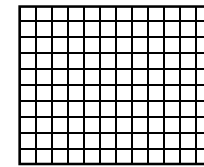


# Apparato WET TransBlot

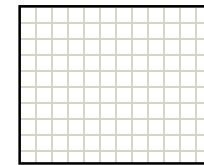


Trasferimento su carta

Casting  
nero



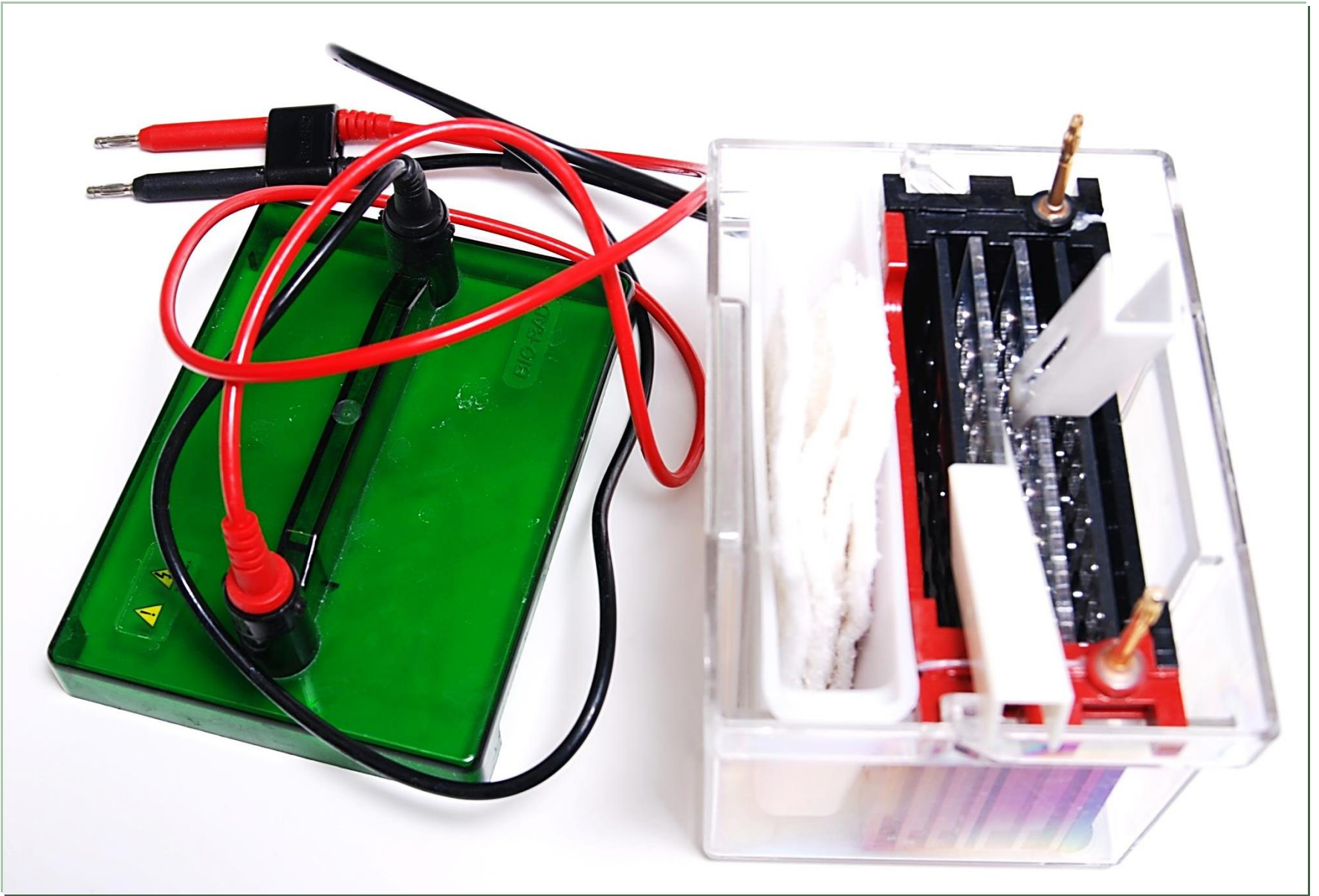
Casting  
bianco



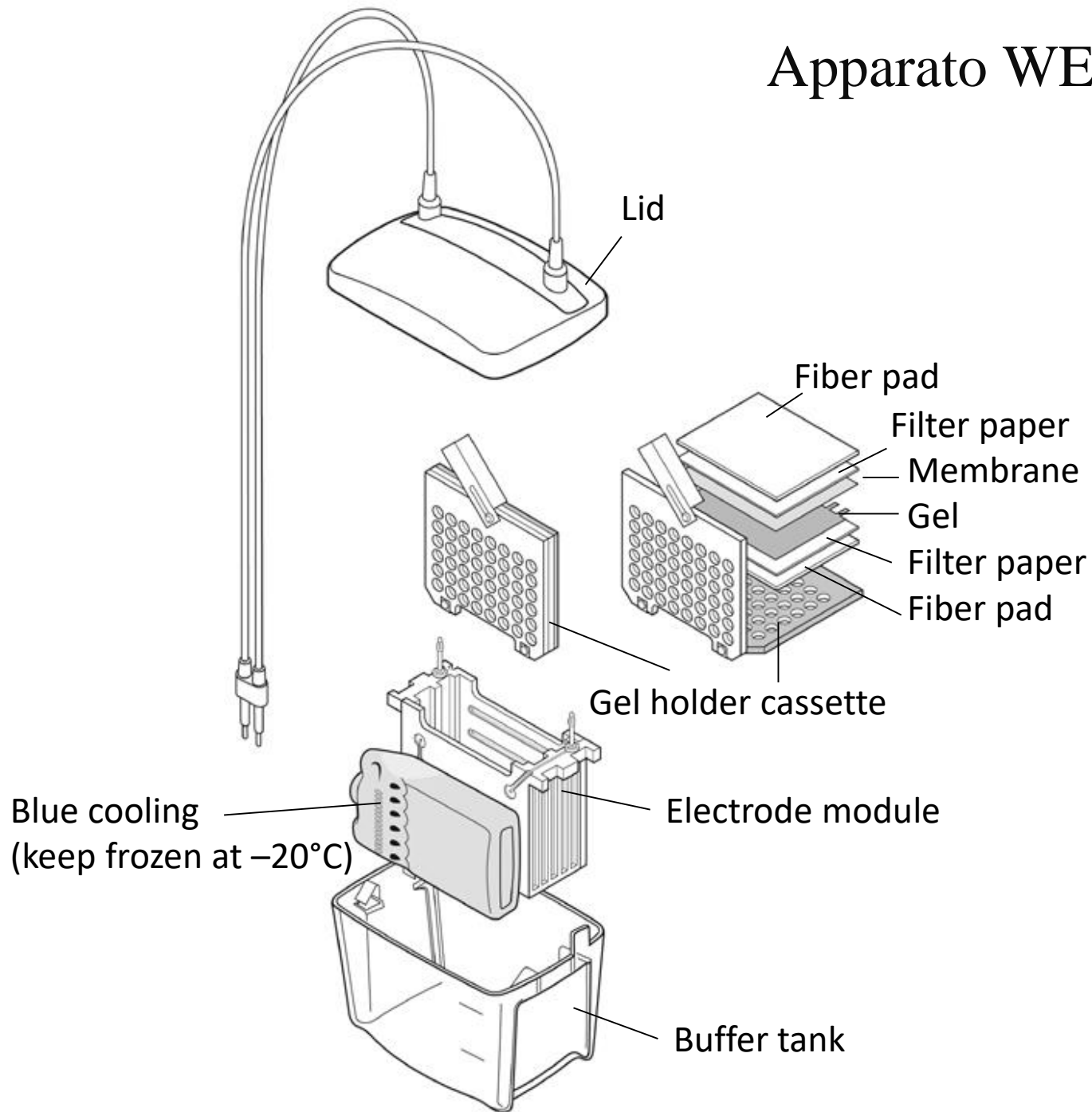
Partendo dal  
casting nero:

- 1 spugna
- 2 fogli di carta
- Gel
- Membrana
- 2 fogli di carta
- 1 spugna

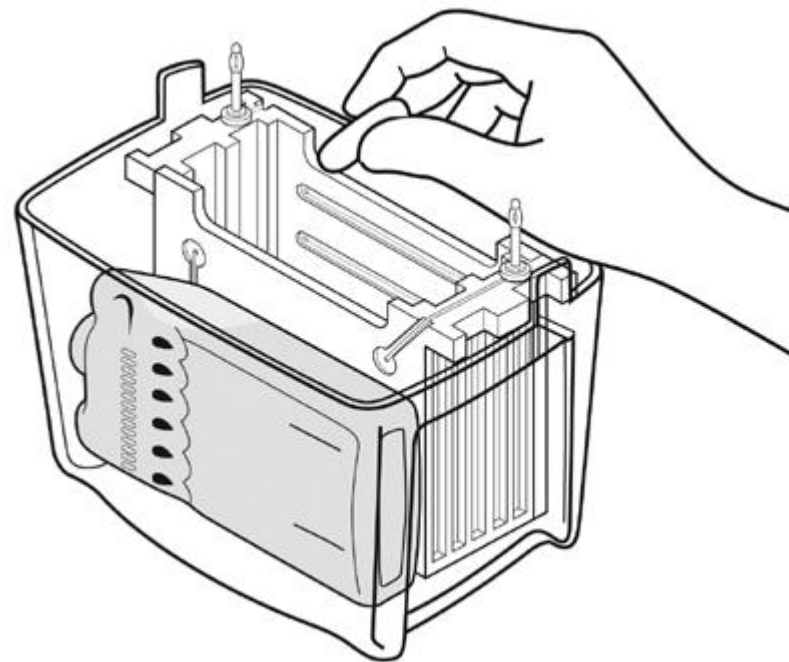
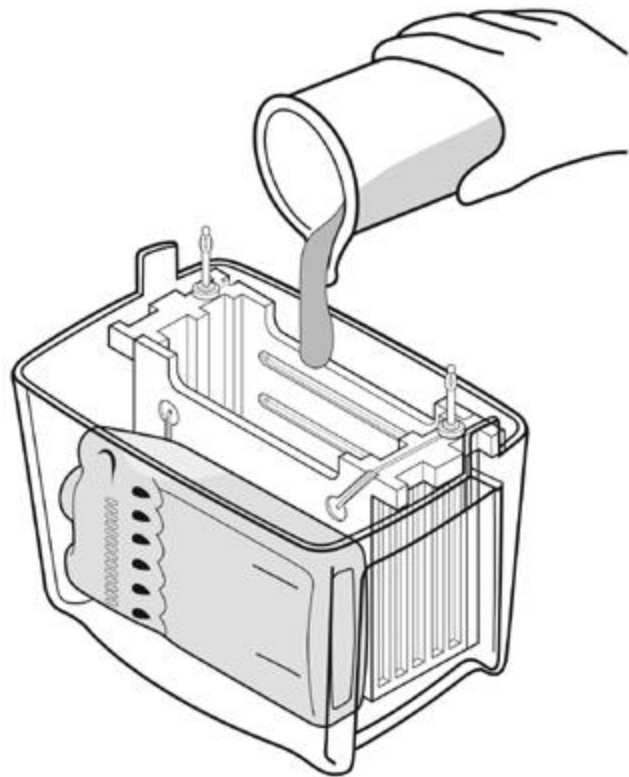
Nell'assemblaggio si colloca nero nella direzione del nero, bianco nella direzione del rosso. Le proteine, cariche negativamente, corrono verso il **polo positivo**



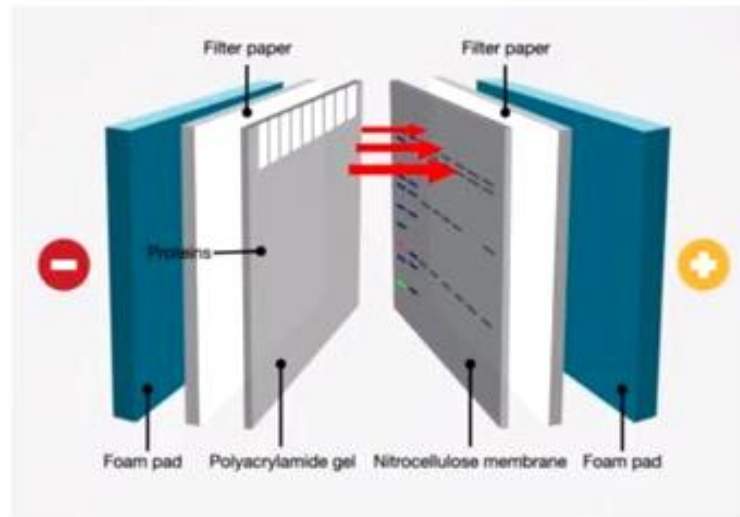
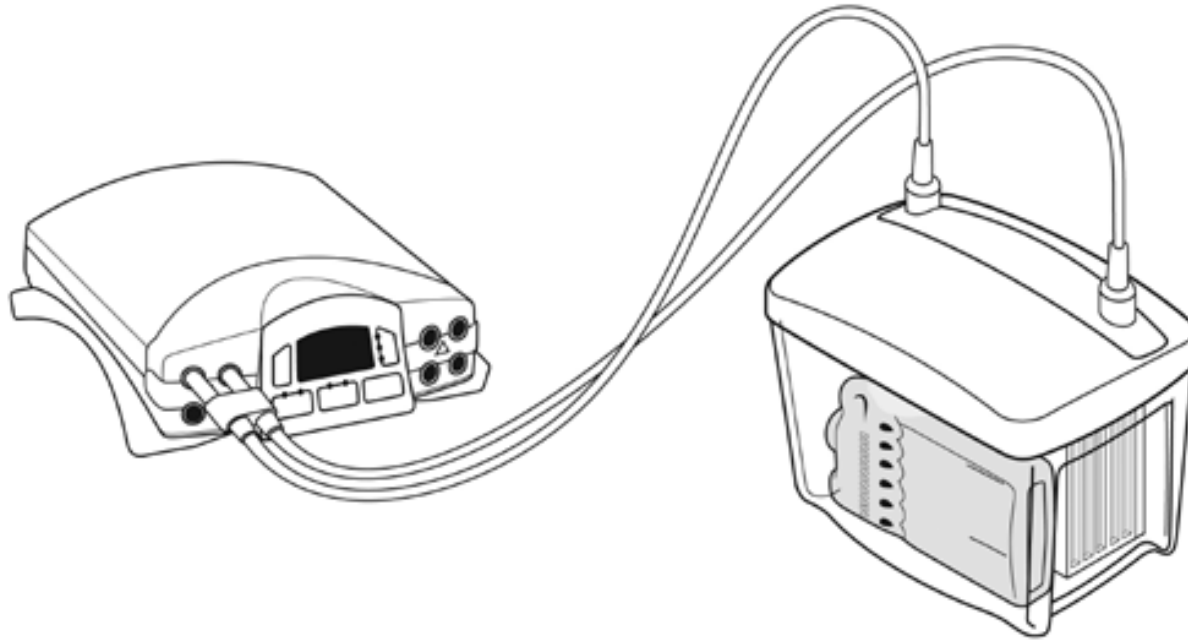
# Apparato WET TransBlot



# Apparato WET TransBlot

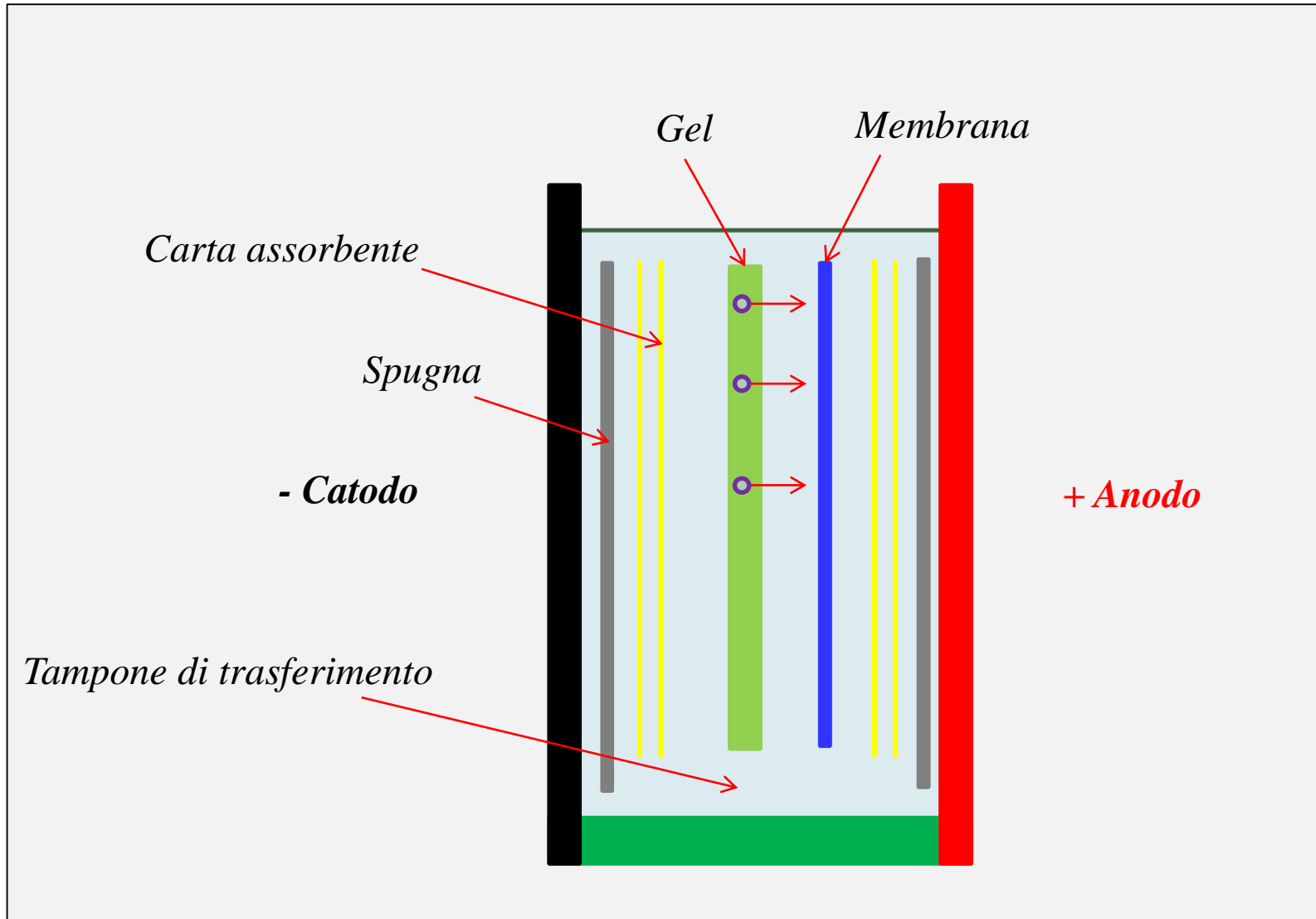


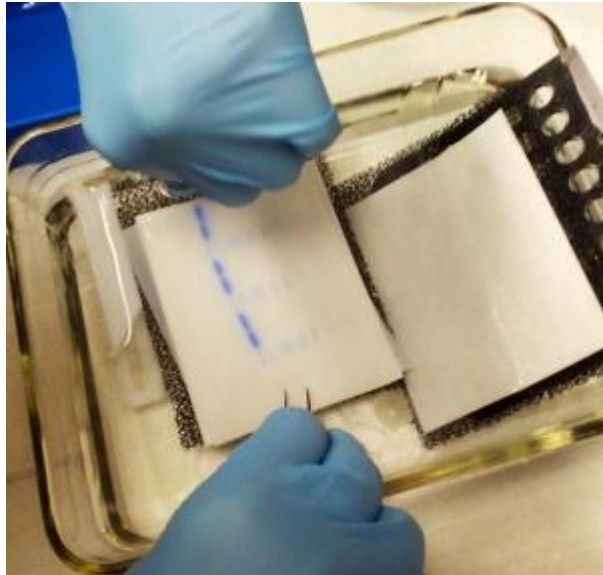
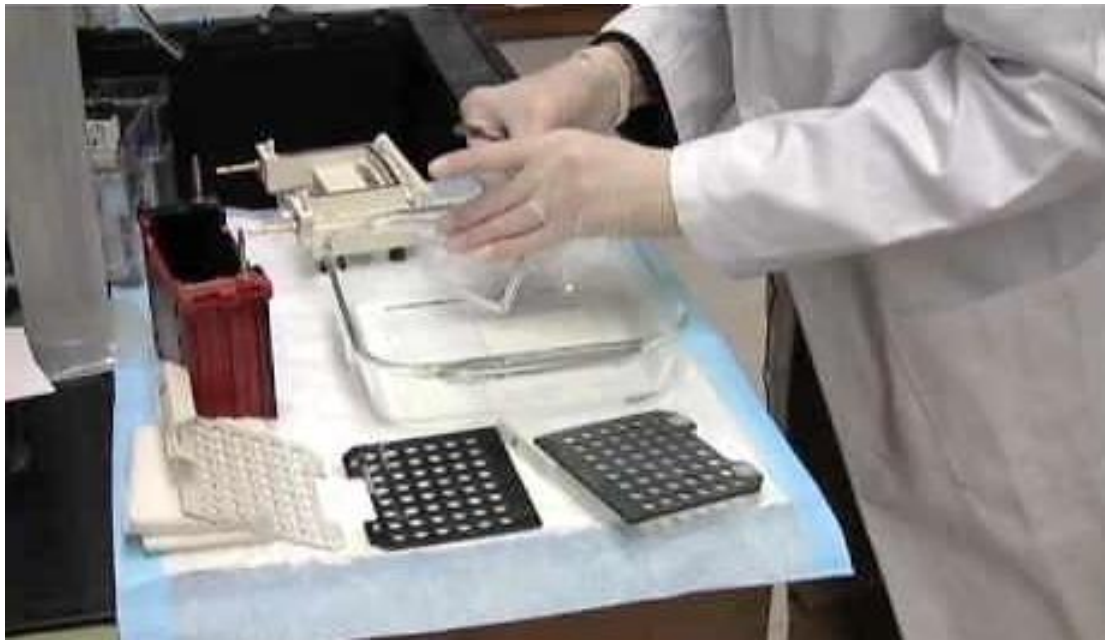
# Apparato WET TransBlot

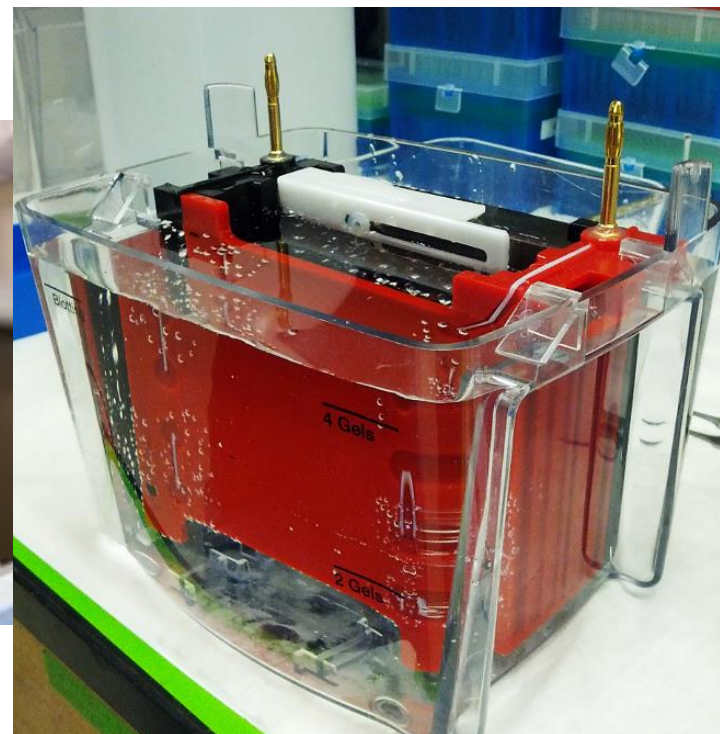
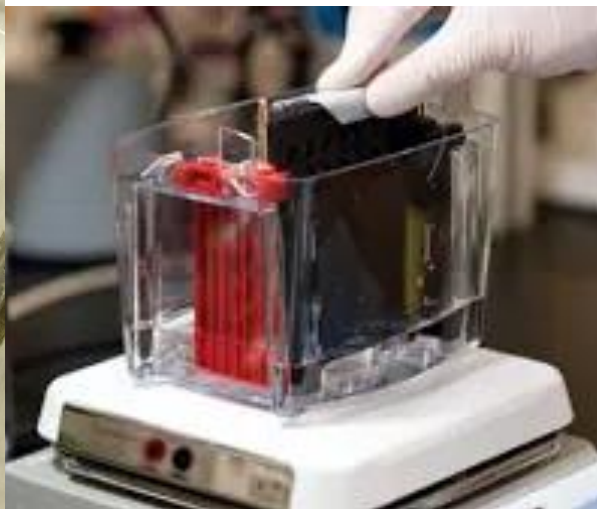
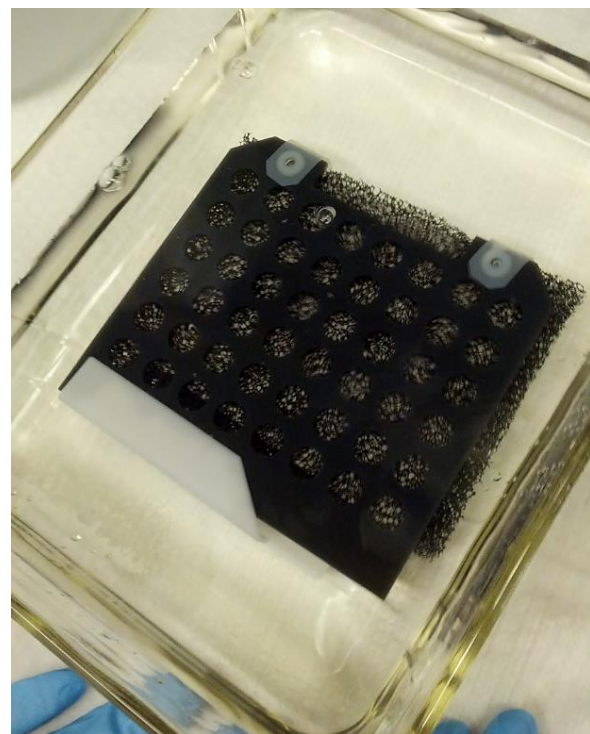
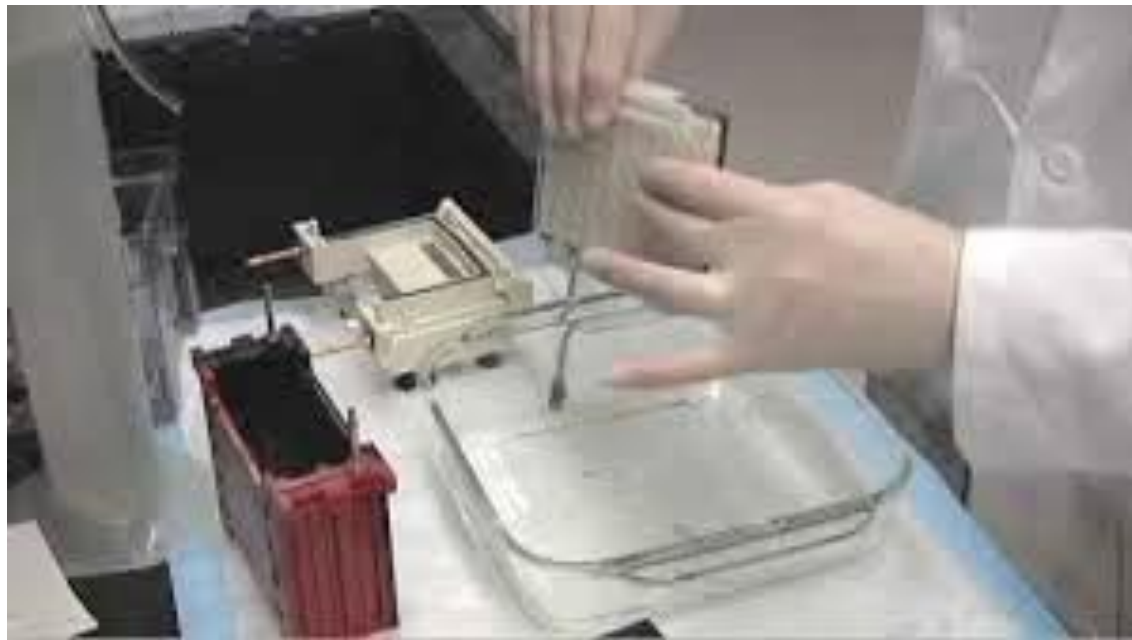




# Trasferimento nell'apparato WET TransBlot

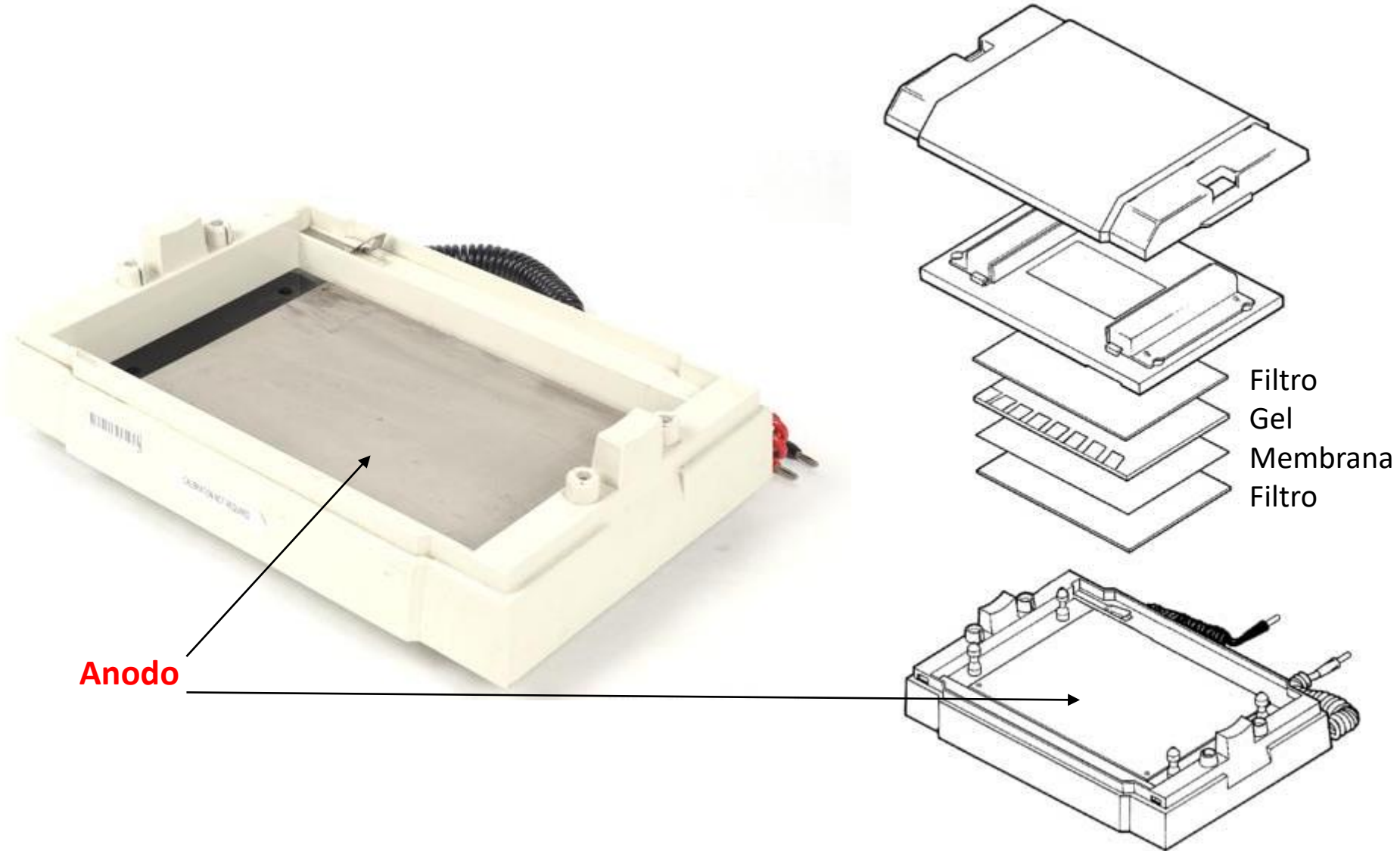




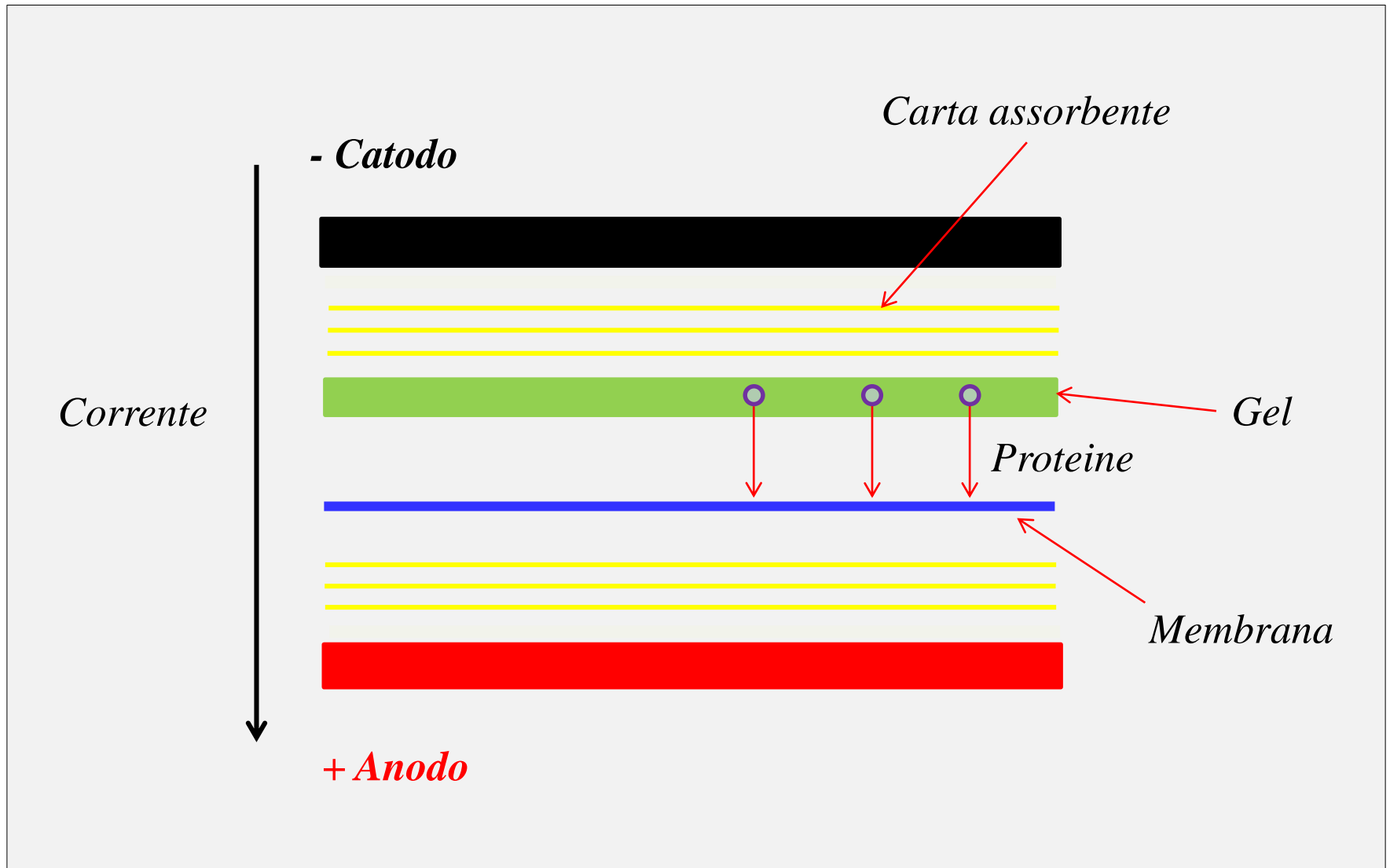




# Trasferimento nell'apparato Semidry system



# Trasferimento nell'apparato Semidry system

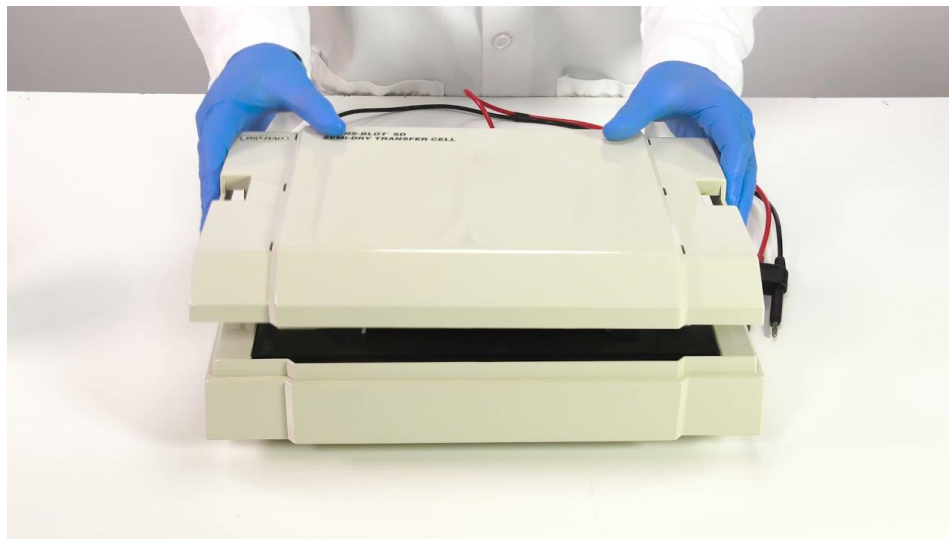
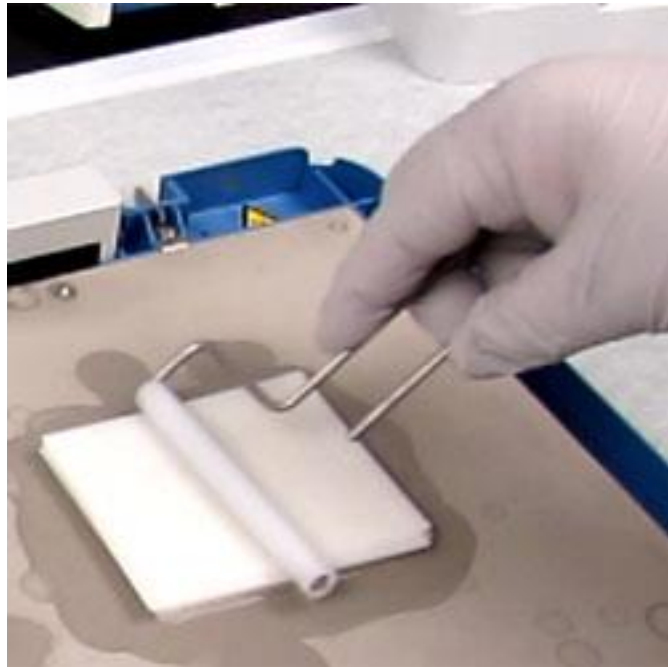




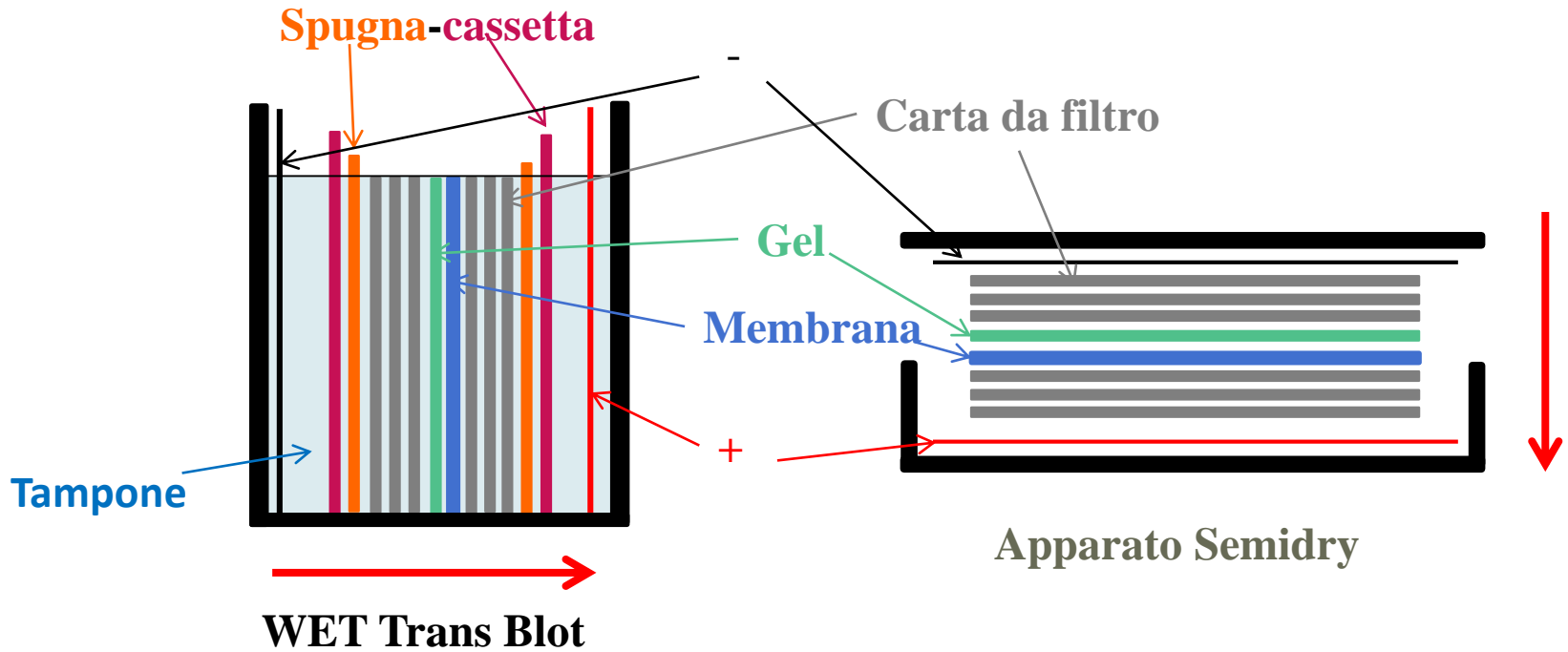




# Trasferimento nell'apparato Semidry system



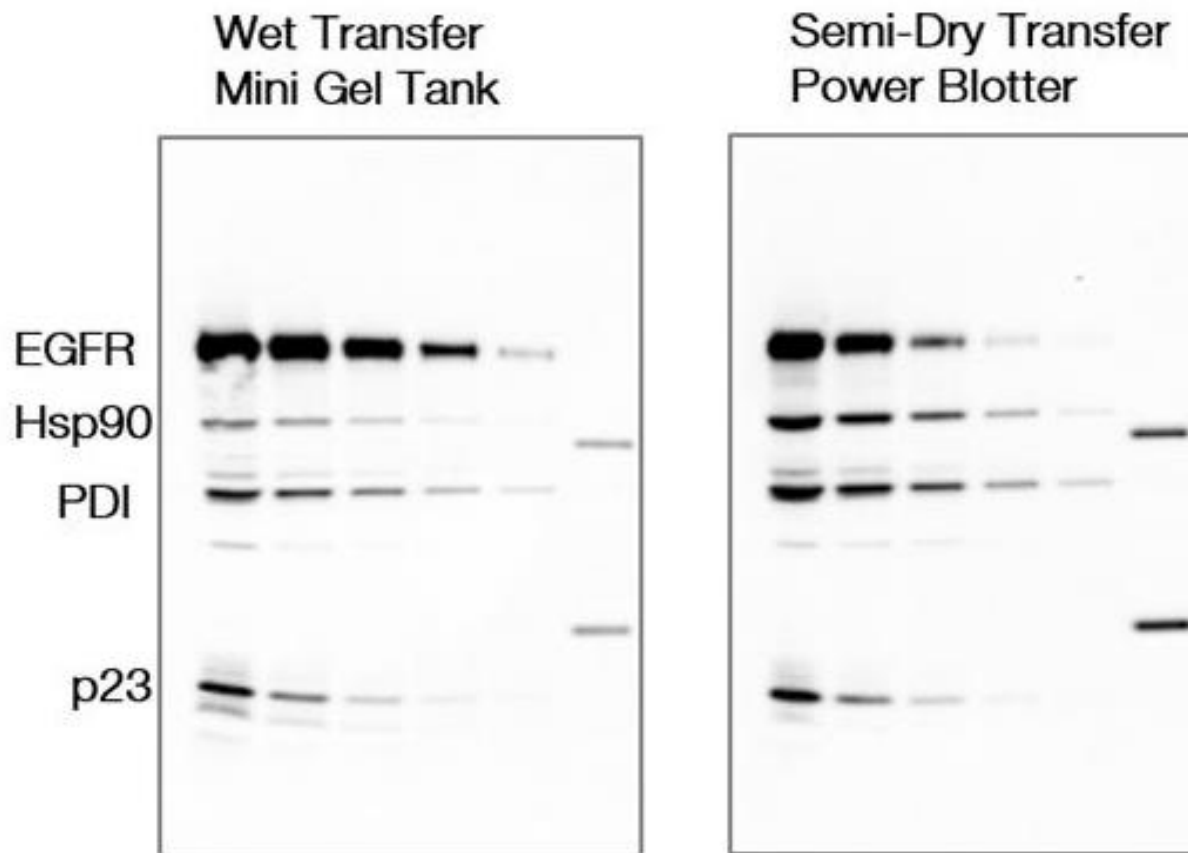
# Confronto tra i due sistemi



**Vantaggi:** veloce, economico (meno buffer)



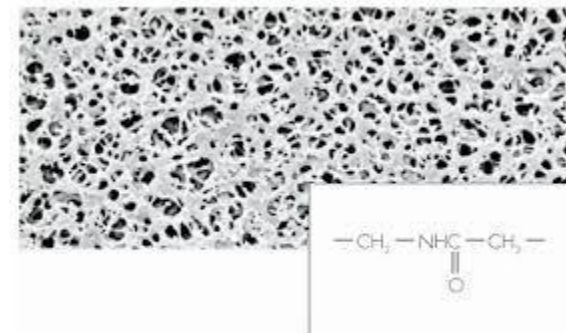
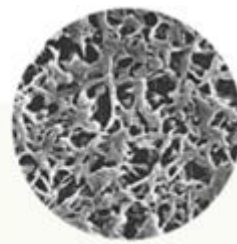
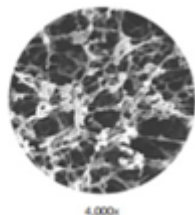
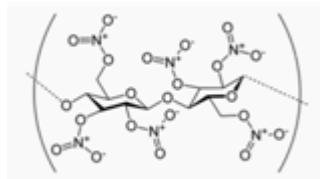
**Svantaggi:** efficienza di trasferimento limitata (dimensione gel, % acrilammide, peso molecolare)



Uno dei principali problemi del trasferimento è la quantità di proteine disperse nel buffer o rimaste intrappolate all'interno del gel.

Le proteine a bassa concentrazione potrebbero essere trasferite più diluite, rischiando di non vederle all'immunorivelazione (falsi negativi).

# Tipologie di membrane



**Nitrocellulose**

**PVDF**

(polivinilidenfluoruro)

**Nylon**

Membrane	Pore Size	Binding interactions	Binding Capacity ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	Reprobe Characteristics	Advantages	Disadvantages	Notes
<b>Nitrocellulose</b>	0.45 $\mu\text{m}$ -0.2 $\mu\text{m}$	Hydrophobic and electrostatic	80–100	Can be stripped and reprobed	Tendency to exhibit lower background	Can be brittle and fragile, which limits use in stripping and reprobings	General purpose protein blotting. Nucleic acids cannot be transferred to nitrocellulose by electrophoretic blotting membrane.
<b>PVDF</b>	0.45 $\mu\text{m}$ -0.2 $\mu\text{m}$	Hydrophobic	170–200	Can be stripped and reprobed	Tendency to be more durable than nitrocellulose	Must be pre-wetted with methanol or ethanol prior to use	High mechanical strength and chemical stability, used for protein sequencing and western blotting; enhanced binding in the presence of SDS.
<b>Nylon</b>	0.2 $\mu\text{m}$	Ionic, Hydrophobic and electrostatic	480	Can be stripped and reprobed	High durability	Higher nonspecific binding to strong anions	Recommended for nucleic acids.





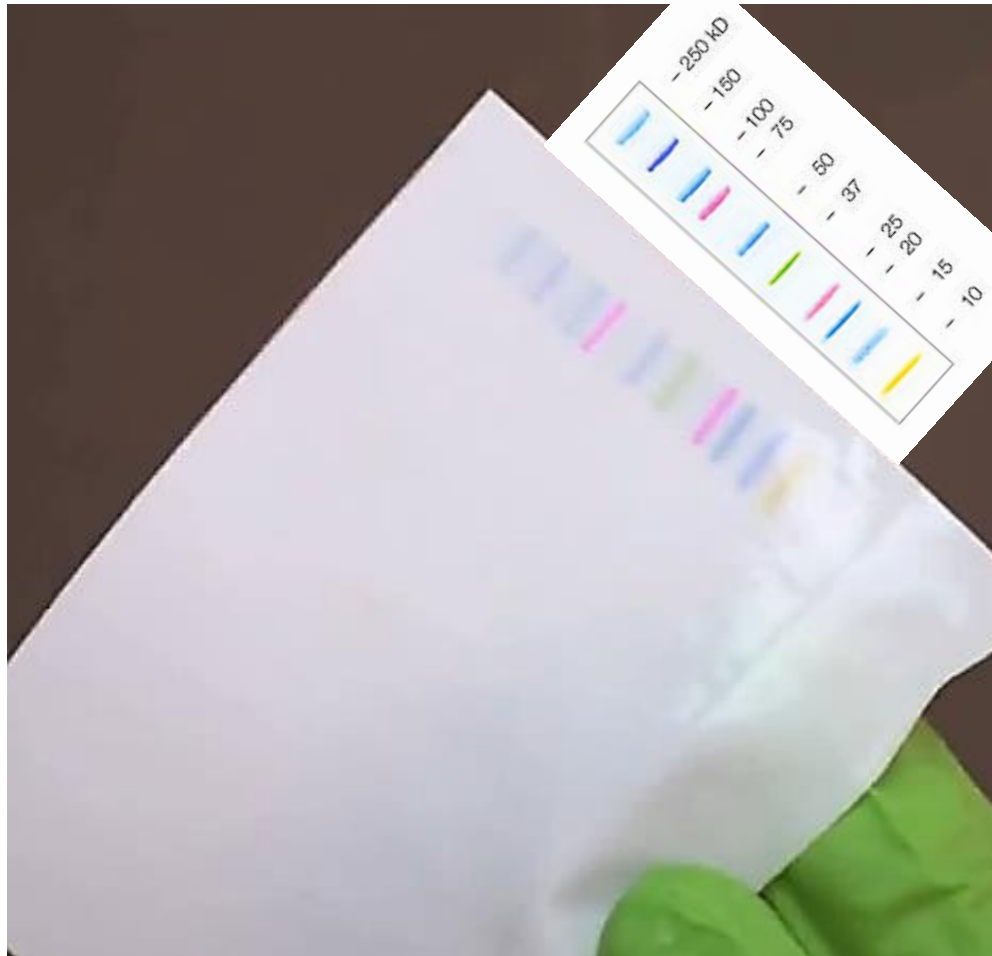
# Soluzioni utilizzate



- Tampone di trasferimento
- Rosso Ponceau: 0,1 % di rosso ponceau in acido acetico al 1% (v/v)
- Tampone Tris salino (TBS) 10x: 24,2 g di Trizma base pH 8,5; 87,6 g di NaCl in 1L di H<sub>2</sub>O bd (pH 7,4)
- TBST: TBS 1x con l'aggiunta di 0,05% di Tween-20
- Soluzione Blocking: TBST contenente il 5% di latte in polvere non grasso oppure il 3% di BSA
- Anticorpi I e II: diluiti opportunamente nella soluzione TBST

<b>Buffer</b>	<b>Standard Field High Intensity Field Buffer Overnight Transfer</b>	<b>High Intensity Field 1 Hour Transfer</b>
<p><b>SDS-PAGE Gels</b></p> <p><b>A:</b> 25 mM Tris, pH 8.3, 192 mM glycine, with or without 20% MeOH and 0.025%–0.1% SDS</p> <p><b>B:</b> 48 mM Tris, pH 9.2, 39 mM glycine, with or without 20% MeOH and 0.025%–0.1% SDS</p> <p><b>C:</b> 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, 3 mM NaCO<sub>3</sub>, pH 9.9, with or without 20% MeOH and 0.025%–0.1% SDS</p>	<p>Buffer A or B or C</p> <p>30 V, constant 90 mA</p>	<p>Buffer A or B or C</p> <p>100 V, constant 350 mA</p>
<p><b>DNA and RNA</b></p> <p>TAE: 20 mM Tris, pH 7.8, 10 mM</p> <p>TBE: 50 mM Tris, pH 8.3, 50 mM sodium borate, 1.0 mM EDTA</p>	<p>30 V, constant 100 mA</p>	<p>80 V, constant 500 mA</p>
<p><b>Native Gels</b></p> <p>25 mM Tris, pH 8.3, 92 mM glycine. No methanol</p>	<p>30 V, constant 90 mA</p>	<p>100 V, constant 350 mA</p>
<p><b>Isoelectric Focusing, Native Gels</b></p> <p>0.7% acetic acid</p>	<p>30 V, constant 100 mA</p>	<p>100 V, constant 350 mA</p>

# Dopo trasferimento:



*Precision Plus  
Protein™  
Kaleidoscope™  
Standards,  
Bio Rad*

# Rosso Ponceau

La colorazione tramite rosso di ponceau è utilizzata per rilevare e colorare le proteine su acetato di cellulosa, PVDF e membrane di nitrocellulosa. La procedura è reversibile e non invasiva e permette ulteriori test di carattere immunologico sul campione. Il limite minimo per l'identificazione è di 250 ng di proteina in gel di poliacrilamide. Il colorante è fortemente elettronegativo e si lega ai gruppi amminici della proteina, oltre che alle regioni non covalenti e non polarizzate.

## ***Preparazione:***

*10 ml H<sub>2</sub>O distillata*

*0.3 ml acido acetico glaciale*

*0.033 g Ponceau S*

*Fino a 30 ml con H<sub>2</sub>O distillata*



Versare circa 5-10 mL di soluzione di **Rosso Ponceau** nella vaschetta messa su un agitatore oscillante per 5 min, recuperare il colorante e decolorare con acqua distillata fino a quando non siano visibili le bande.



## Rosso Ponceau: a cosa serve?

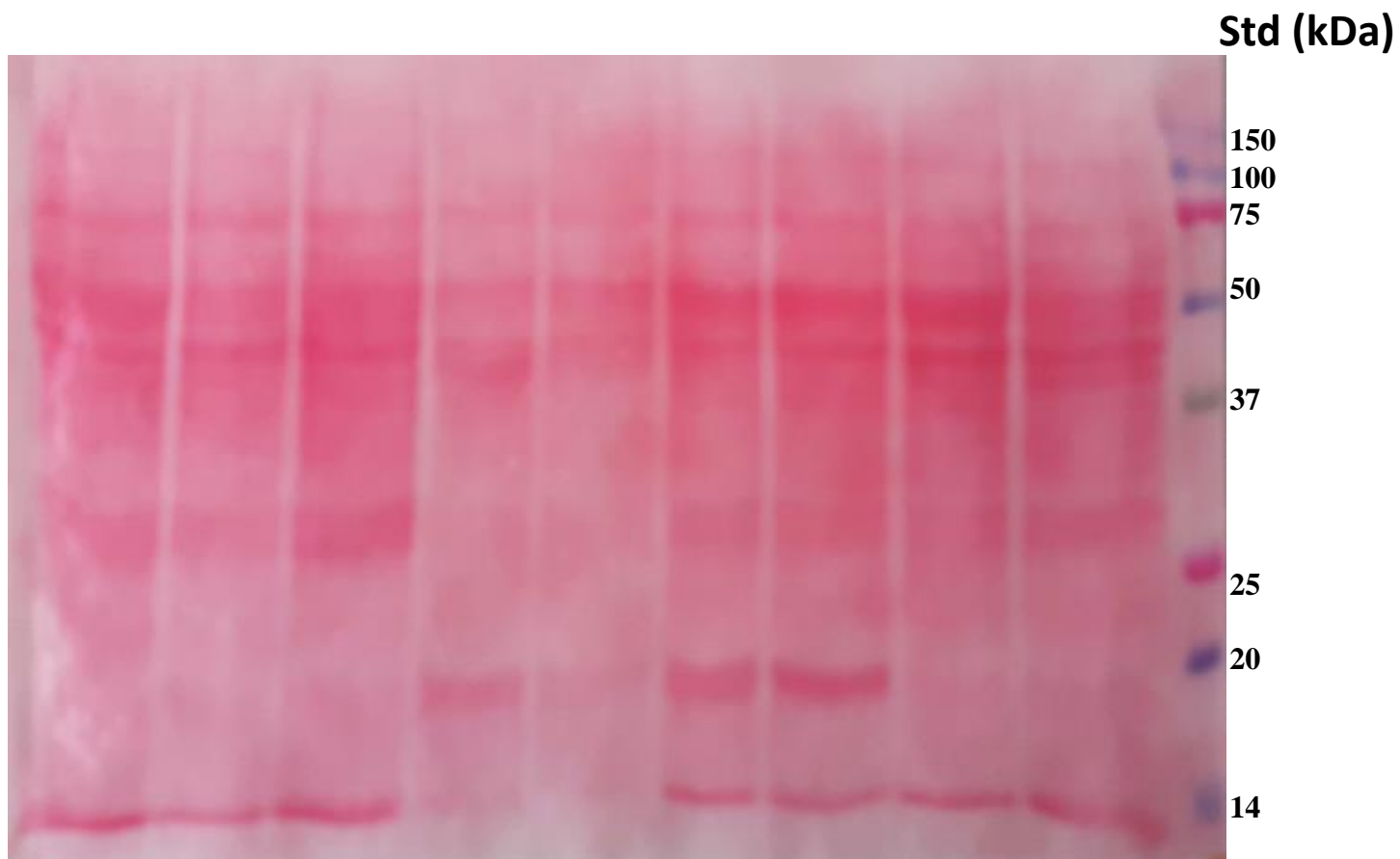


Questo passaggio serve per valutare l'efficienza del trasferimento, la presenza di bolle, evidenziare l'area di lavoro le linee di corsa. Queste informazioni sono utili per tagliare la membrana e ridefinire l'area utile, separare le varie linee o verticalmente o orizzontalmente, destinando a trattamenti diversi i vari pezzi.





# Membrana dopo trasferimento colorata con il Rosso Ponceau



3 fase:

Saturazione della membrana e blocco dei siti aspecifici

Incubazione con anticorpo I e II

Rivelazione

# Saturazione della membrana e blocco dei siti aspecifici

Le membrane per il trasferimento hanno un'elevata capacità di legare le proteine sull'intera superficie. Per impedire il legame non specifico degli anticorpi è necessario bloccare i siti aspecifici, ovvero tutta la superficie della membrana non occupata dalle proteine trasferite. Questa fase consente agli anticorpi di legarsi in maniera specifica alle proteine di interesse e non in maniera casuale alla superficie della membrana.

Il blocco previene solo il legame non specifico ma non riduce la reattività crociata (legame specifico degli anticorpi a proteine non bersaglio contenenti lo stesso epitopo presente sulla proteina bersaglio).

Le soluzioni di blocco comunemente utilizzate sono:

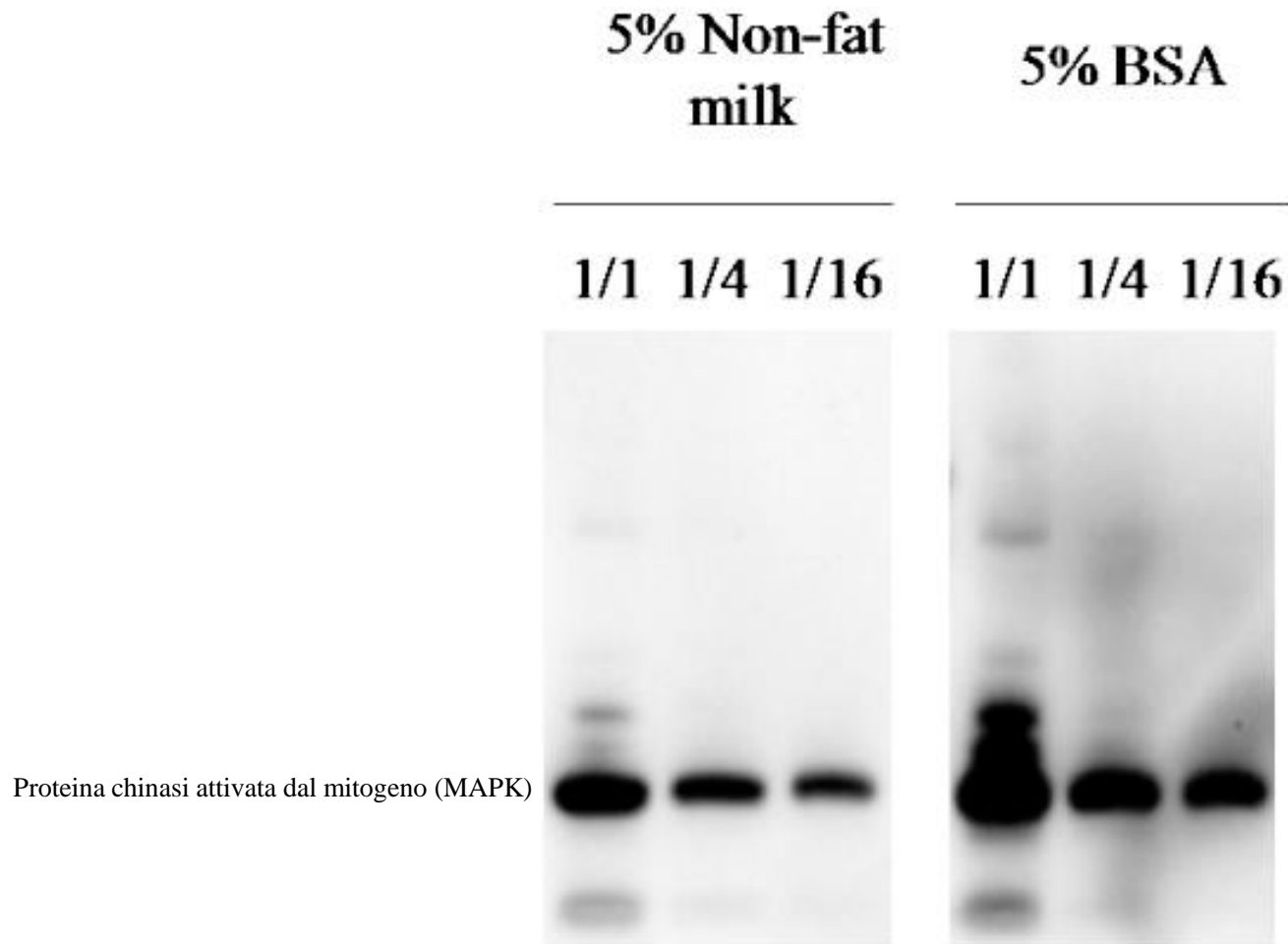
1-3% di albumina di siero bovino (BSA) in Soluzione salina tamponata con fosfato (PBS) contenente lo 0,05% di Tween 20 (PBS-T)

1-5% di latte scremato in PBS-T

Il latte scremato è più efficace nel bloccare, tuttavia, può interferire con specifiche reazioni antigene-anticorpo.

Il latte scremato contiene la fosfoproteina caseina e quindi non è adatto per il rilevamento delle fosfoproteine.

## Soluzione di bloccaggio



Queste proteine regolano le funzioni cellulari tra cui la proliferazione, l'espressione genica, la differenziazione, la mitosi, la sopravvivenza cellulare e l'apoptosi.

## Soluzione blocking ed incubazione con gli anticorpi:

-Soluzione di bloccaggio: da 1 ora a overnight a 4°C e in leggera agitazione;

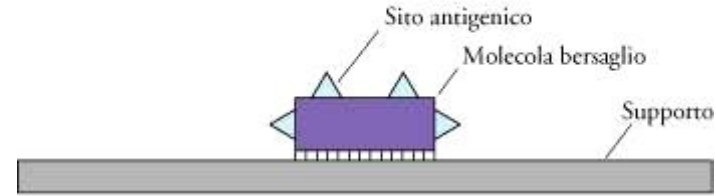
-Incubare con l'anticorpo primario diluito con 1% BSA in TBST da 1 ora a overnight a 4°C in leggera agitazione;

-Lavare con TBST per 3 volte, 10 min l'uno;

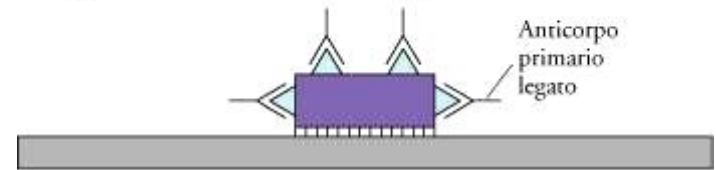
-Incubare per 1 ora con l'anticorpo secondario coniugato con un marcatore diluito opportunamente secondo le istruzioni

- Lavare con TBST per 3 volte, 10 min l'uno

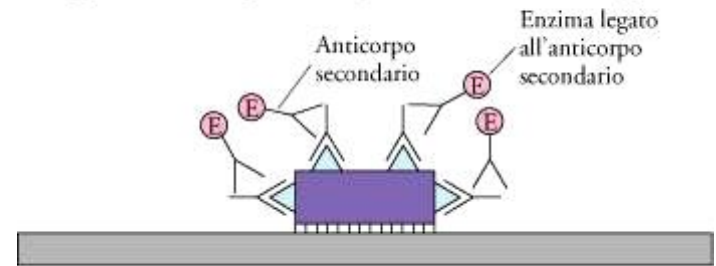
A Ancoraggio del campione al supporto



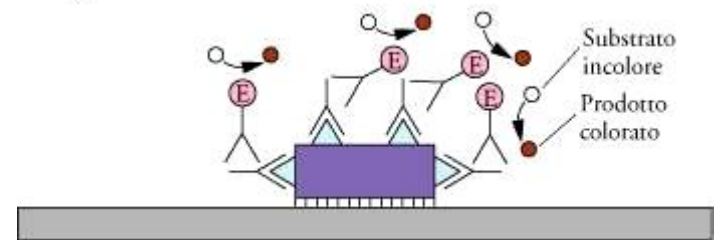
B Aggiunta di anticorpo primario; lavaggio



C Aggiunta del coniugato anticorpo secondario-enzima; lavaggio



D Aggiunta del substrato



# IMMUNORIVELAZIONE DEL SEGNALE



Tipologia	Marcatore	Attivazione	Segnale
Colorimetrico	Enzima	Chimica	Precipitato colorato
Chemiluminescente	Enzima	Chimica	Radiazione luminosa
Fluorescente	Fluoroforo	Radiazione elettromagnetica	Radiazione elettromagnetica



# Traccianti enzimatici: un po' di storia

- **1941 Coons:**

- Anticorpi marcati con fluoresceina per localizzare antigeni in sezioni di tessuto

- **1966 Nakane:**

- Anticorpi marcati con enzimi

- **1970 Sternberger:**

- Perossidasi-anti Perossidasi (PAP)

- **1981 Hsu:**

- Avidin Biotin Complex (ABC)

- **1984 Cordell:**

- Alkaline Phosphatase-anti Alkaline Phosphatase (APAAP)

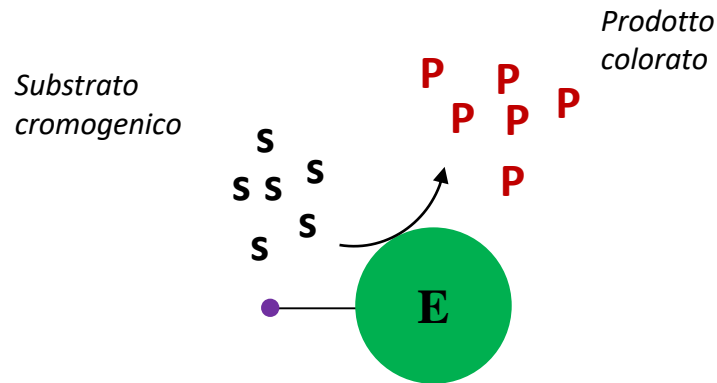
# Traccianti enzimatici

Proprietà degli enzimi che vengono coniugati con gli anticorpi

Enzima	Fonte	Struttura	Reazione catalizzata
Perossidasi	Rafano	Glicoproteina monomerica $M_r$ 40 000	$H_2O_2 + \text{substrato ossidabile} \rightarrow \text{prodotto ossidato} + 2 H_2O$
Fosfatasi alcalina	Intestino di vitello	Glicoproteina contenente $Zn^{2+}$	$R-O-P + H_2O \rightarrow R-OH + P_i$ monoestere $\rightarrow$ alcol      fosfato ortofosfotico                      inorganico
$\beta$ -Galattosidasi	<i>E. coli</i>	Proteina multimerica (4 subunità) $M_r$ 540 000	$\beta$ -D-Galattoside + $H_2O \rightarrow$ galattosio + alcol
Glucosio ossidasi	<i>Aspergillus niger</i>	Flavoglicoproteina	$\beta$ -D-Glucosio + $O_2 \rightarrow H_2O_2 +$ acido gluconico
Ureasi	<i>Canavalia ensiformis</i>	$M_r$ 480 000	$(NH_2)CO + 3 H_2O \rightarrow CO_2 + 2NH_4OH$ urea                                      idrossido di ammonio

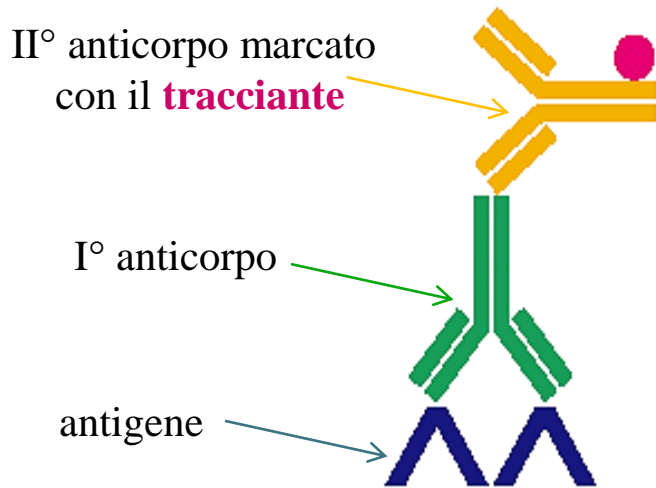
## Marcatura con enzimi:

Gli anticorpi marcati con gli enzimi sono ampiamente utilizzati in dosaggi immunologici. Nelle metodiche di immunoblotting **il prodotto formato deve essere insolubile** per consentire la precisa localizzazione dell'interazione antigene-anticorpo. L'impiego di enzimi consente l'amplificazione catalitica del segnale, in quanto ogni molecola di enzima può convertire molte molecole di substrato in prodotti colorati.



**L'enzima** utilizzato come marcatore **produce molte molecole di prodotto per ogni molecola di enzima.**

# Colorazione Indiretta



# Colorazione Diretta



- elevata sensibilità
- versatilità
- costo maggiore
- tempi più lunghi



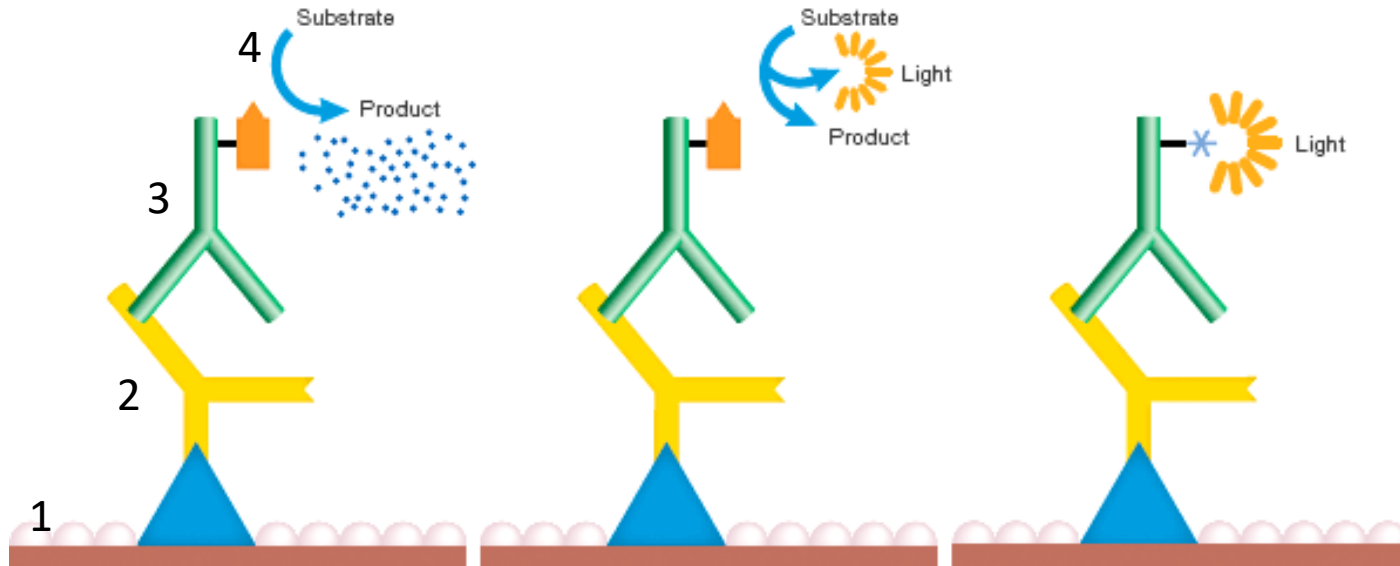
- costo minore
- rapidità
- scarsa sensibilità



A. Colorimetrico

B. Chemiluminescente

C. Fluorescente



*1) Saturazione dei siti aspecifici con il latte scremato o BSA*

*2) I L'anticorpo specifico per la proteina*

*3) II L'anticorpo coniugato con il marcatore*

*4) Sviluppo del segnale per aggiunta del substrato con formazione di prodotto*

# Chemiluminescenza in natura

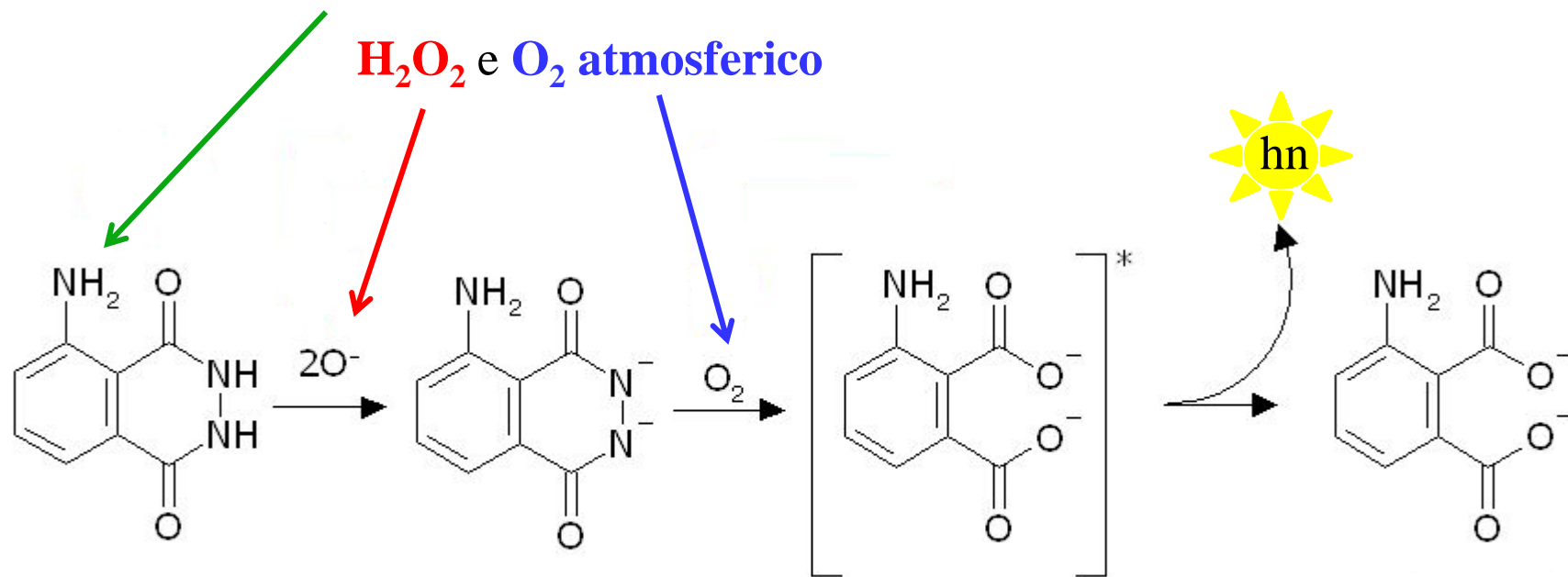




# La Chemiluminescenza (ECL)

La chemiluminescenza è la luminescenza emessa nel corso di **una reazione chimica**, generalmente un'ossidazione.

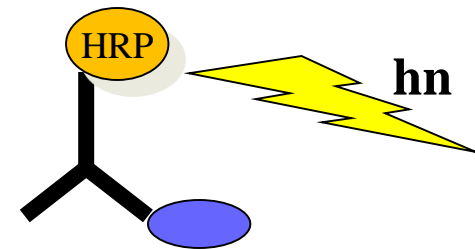
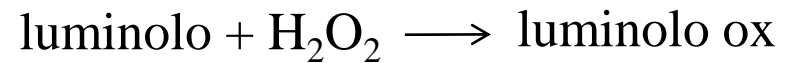
Nel caso del **Luminolo** la reazione di ossidazione può avvenire in presenza di



# Procedura di Staining con Anticorpi

## Diretta

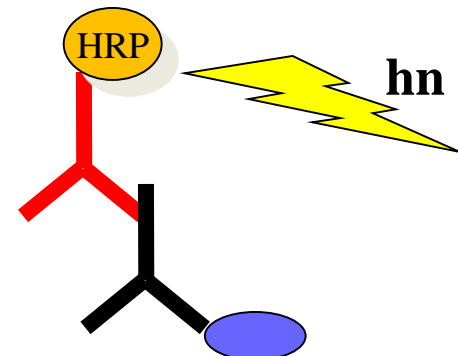
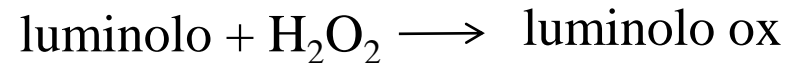
■ **PRIMARY ANTIBODY** The first antibody used in a staining procedure.



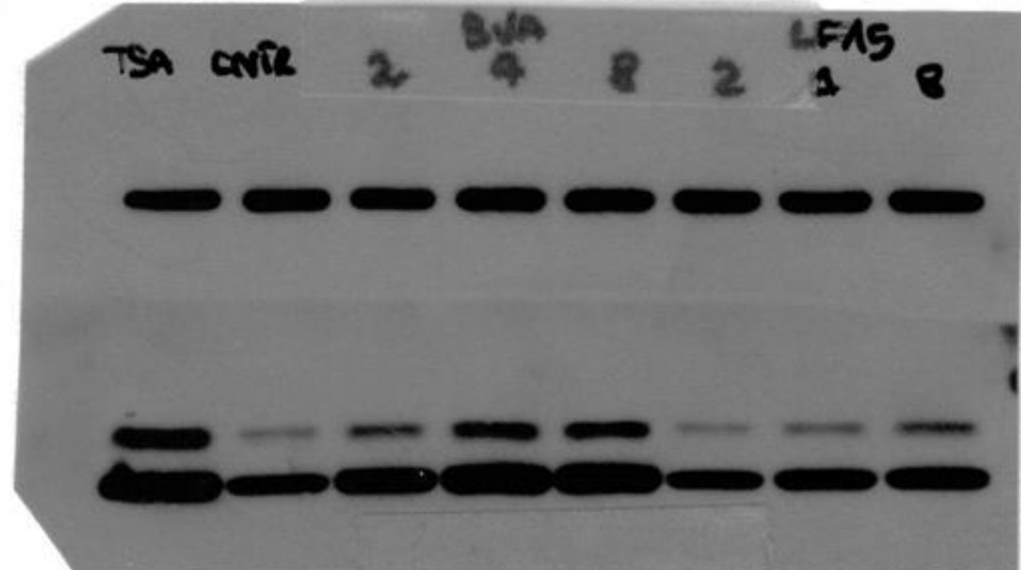
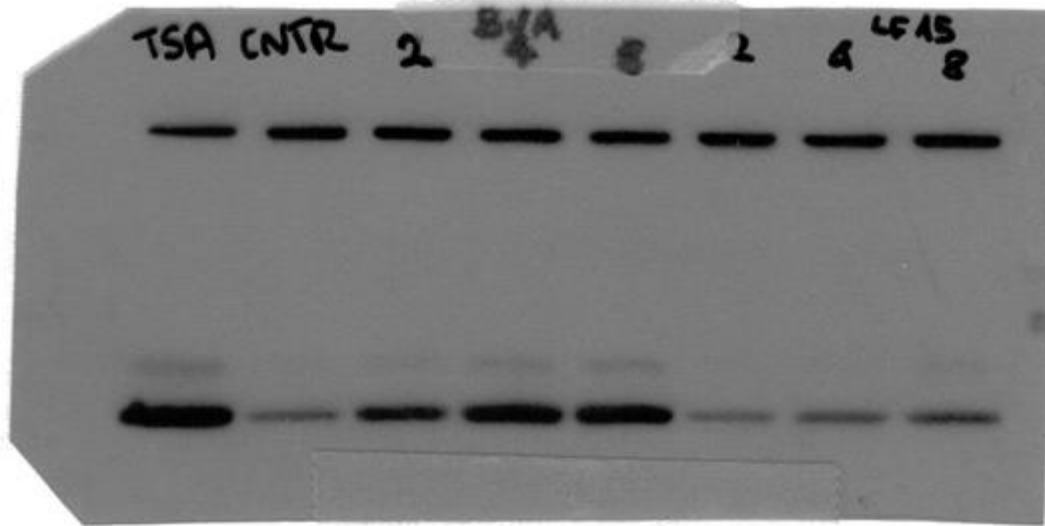
## Indiretta

■ **PRIMARY ANTIBODY** The first antibody used in a staining procedure.

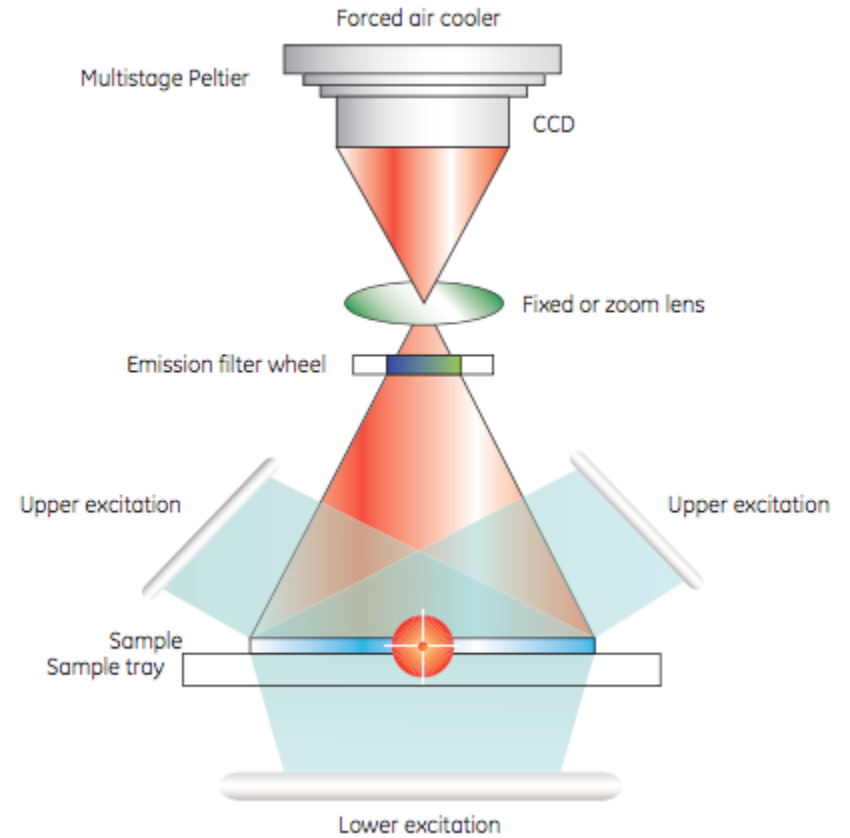
■ **SECONDARY ANTIBODY** The second antibody used in a staining procedure; it reacts with the primary antibody, now the antigen, and forms a bridge between the primary antibody and a subsequent reagent, if any. Also known as "link" antibody.



# Lastra fotografica



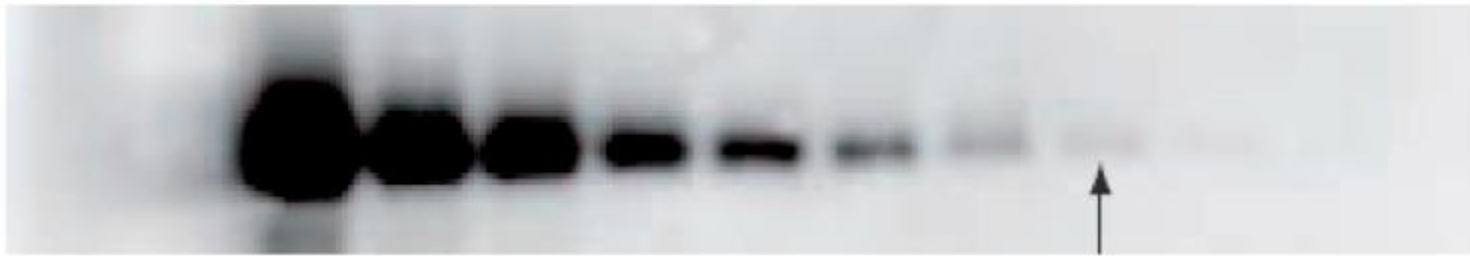
# Sistemi digitali



# Esempi

Transferrina

5000 2500 1250 630 310 160 78 39 19 (pg)

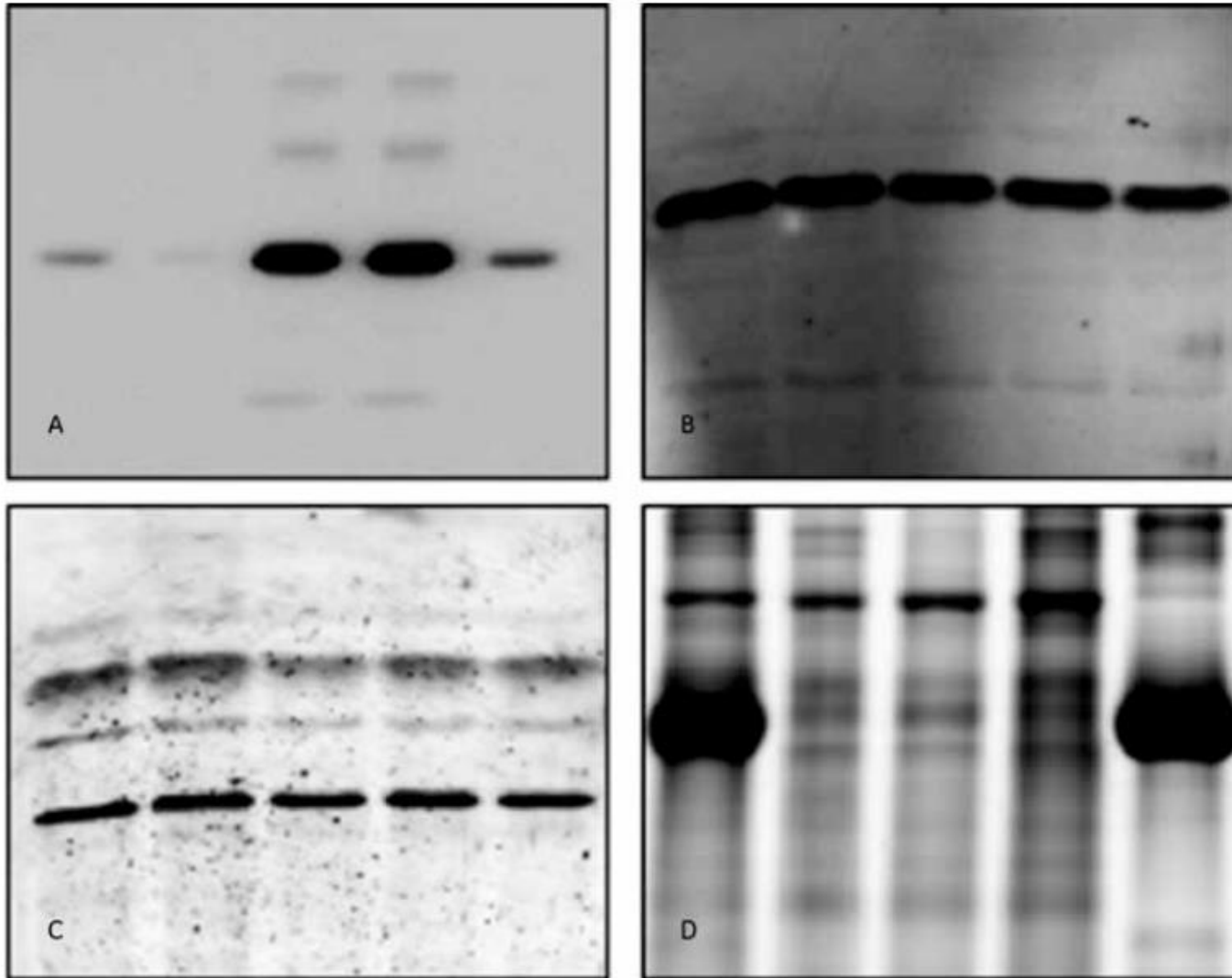


La sensibilità è tale da permettere il rivelamento di pg e anche di fg di proteine



Il sistema è anche in grado di visualizzare in rosso, quando il segnale si è saturato

# Densitometria, quantificazione e problematiche della quantificazione

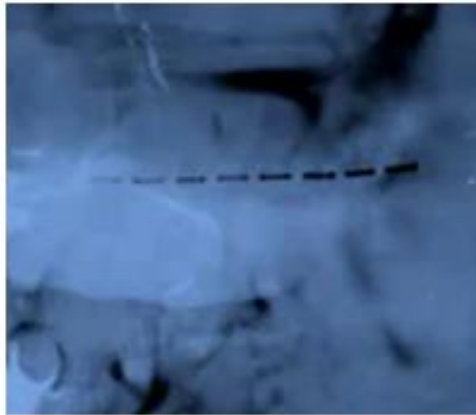


L'analisi densitometrica consiste nello studio, quantitativo e qualitativo della distribuzioni di livelli di grigio/nero/colore delle immagini da esaminare



# Problemi comuni nel Western Blot

1. Sfondo alto



2. Segnale debole/nessuno



3. Bande non specifiche



1 problema: sfondo alto	
CAUSE	SOLUZIONI
La temperatura di incubazione dell'anticorpo è troppo alta	Incubare l'anticorpo a una temperatura più bassa (4°C) ciò potrebbe richiedere un tempo di incubazione più lungo.
L'anticorpo reagisce in modo incrociato con altre proteine o con la soluzione di bloccaggio	Utilizzare una soluzione di blocco diversa (per esempio: non utilizzare latte scremato con il sistema della biotina).  Se si utilizza un anticorpo secondario non specifico: <ul style="list-style-type: none"> <li>• usare come controllo l'anticorpo secondario (senza il primario)</li> <li>• diminuire la concentrazione dell'anticorpo secondario.</li> <li>• testare la reattività crociata tra l'anticorpo secondario e la membrana.</li> </ul>
Blocco insufficiente	Estendere il tempo di bloccaggio o utilizzare un agente bloccante compatibile (ad es. latte scremato, BSA, siero, ecc.).
Insufficiente lavaggio	Incrementare il numero di lavaggi e il volume del tampone utilizzato. Aggiungere lo 0,05% di Tween 20 nel tampone di lavaggio.

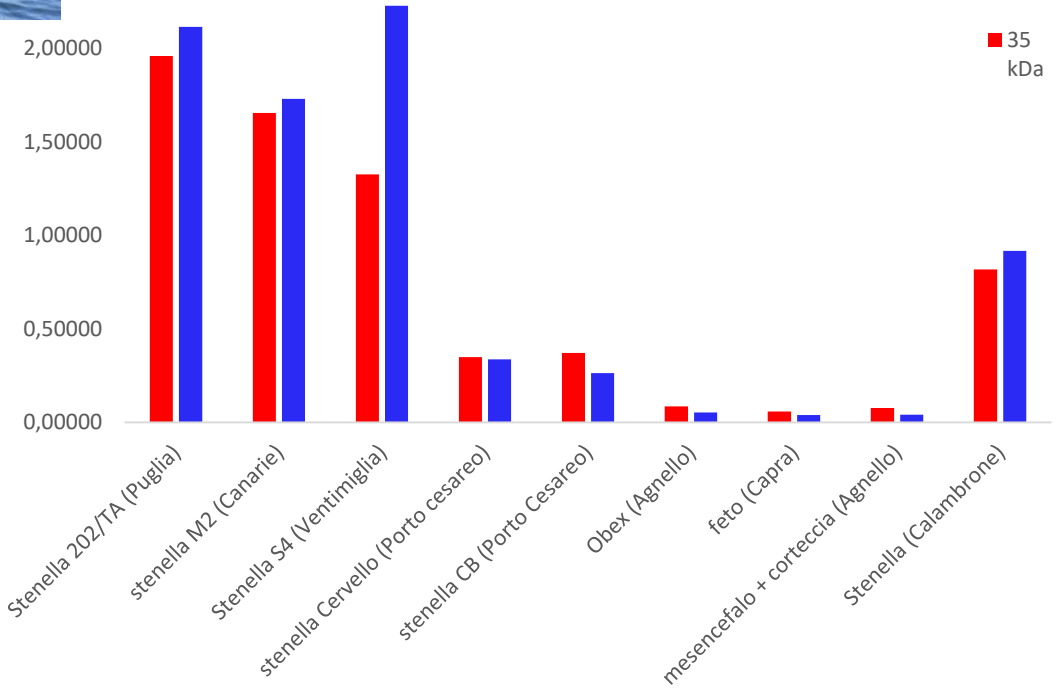
# Problemi comuni nel Western Blot

<b>2 Segnale debole/nessuno</b>	
<b>CAUSE</b>	<b>SOLUZIONI</b>
Insufficiente campione caricato sul gel	Controllare la concentrazione delle proteine. Caricare più proteine.
Anticorpi primari poco efficaci	Preparare l'anticorpo fresco e conservarlo correttamente fino al momento dell'uso. Evitare il congelamento e lo scongelamento ripetuto per ridurre al minimo la denaturazione.
Inibizione dell'anticorpo secondario da parte di alcuni reagenti (sodio azide)	Evitare l'aggiunta di sodio azide o l'utilizzo di prodotti contenenti sodio azide in modo che non vi siano interferenze con gli anticorpi coniugati con HRP.
La soluzione di bloccaggio maschera l'antigene	Confrontare diverse soluzioni di blocco. Ottimizzare la concentrazione delle proteine della soluzione bloccante. Riduci il tempo di bloccaggio.

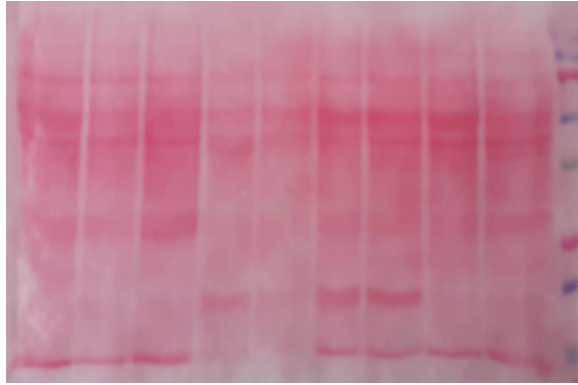
<b>3 Bande non specifiche</b>	
<b>CAUSE</b>	<b>SOLUZIONI</b>
La concentrazione dell'anticorpo primario è troppo alta	Diminuire la concentrazione dell'anticorpo primario.
Eccesso di proteine sul gel	Ridurre la quantità di proteine totali caricate sul gel.
Insufficiente lavaggio	Incrementare il numero di lavaggi.
Problema con la soluzione di blocco	Incrementare il tempo della soluzione di blocco. Ottimizzare la scelta della soluzione di bloccaggio.



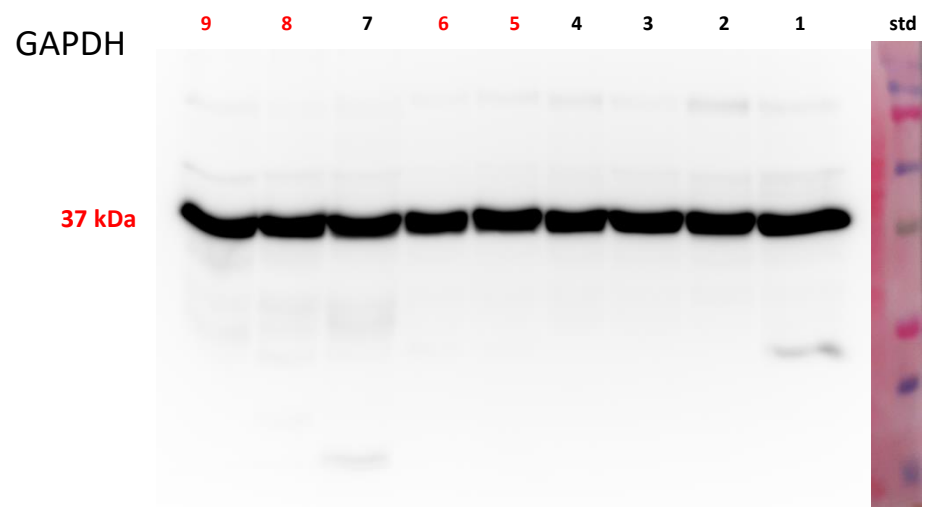
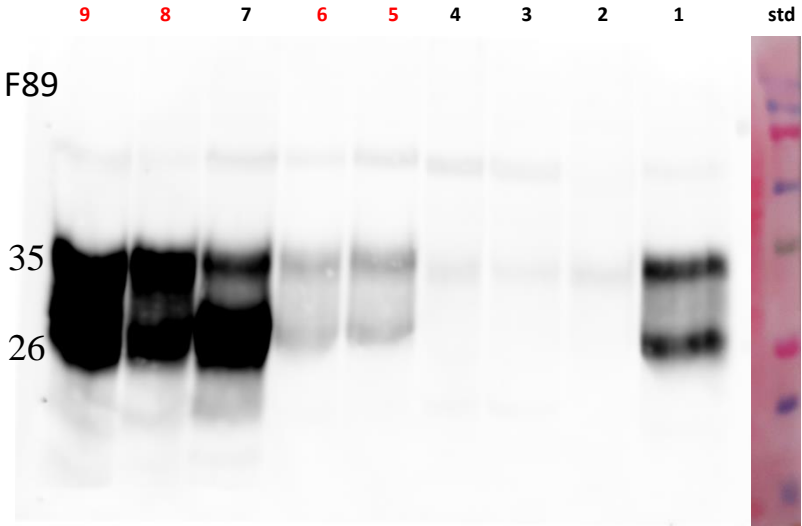
Studio della PrP<sup>C</sup> nel cervello di *Stenella coeruleoalba*  
Gel al 12%  
Caricamento: 150 ug/pz  
**Ab F89/160.1.5** Diluito: 1:400  
**Ab GAPDH** (37 kDa) diluito 1:1500

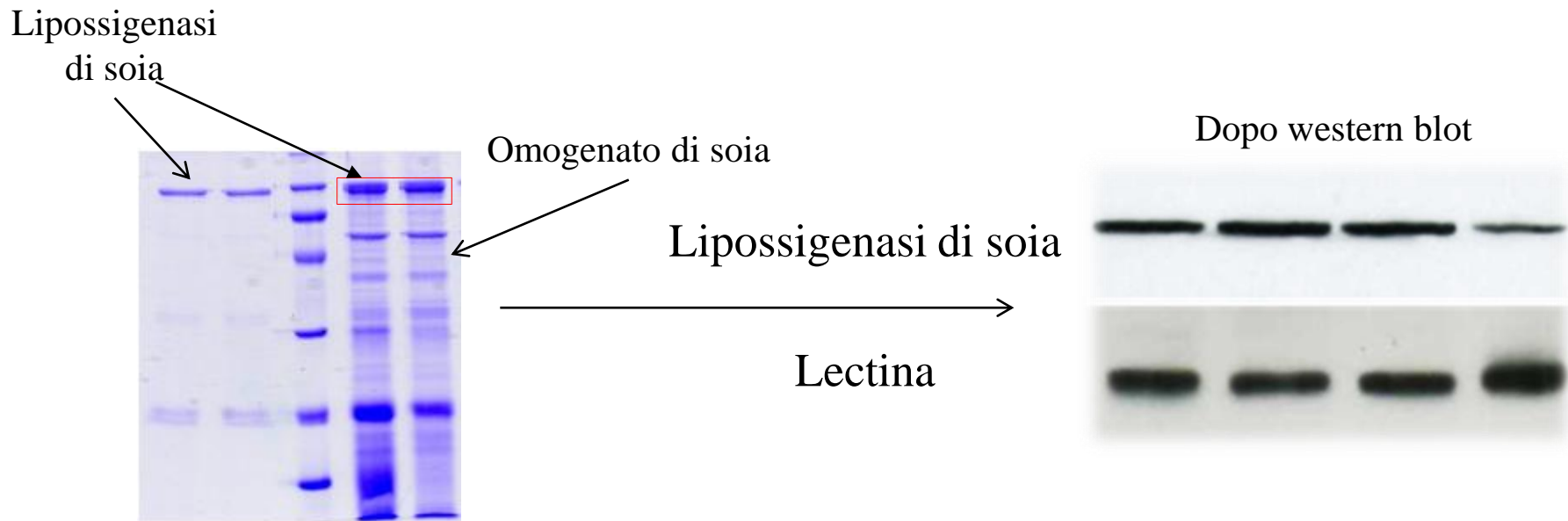
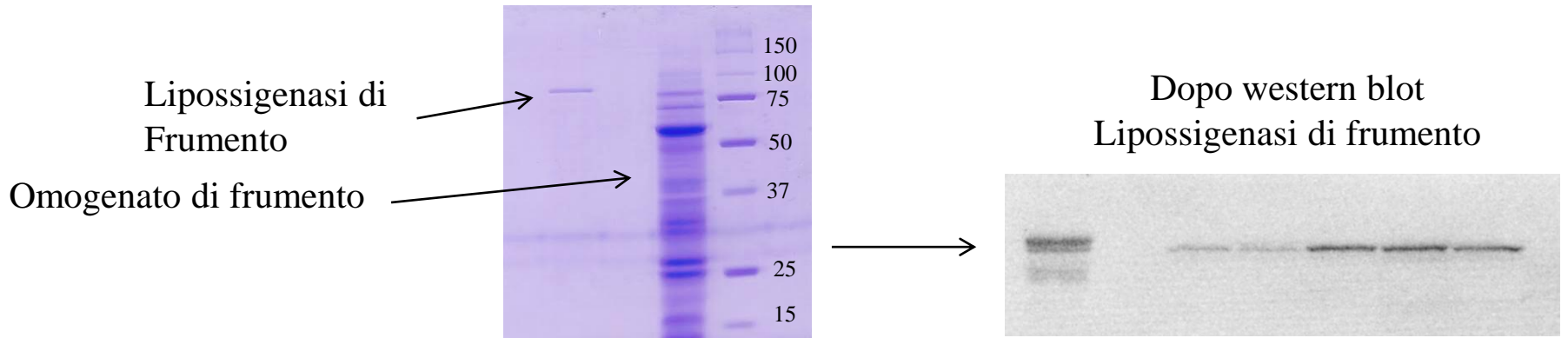


Colorazione con il Rosso Ponceau



- 5 = CB (Porto Cesareo)
- 6 = Cervello (Porto Cesareo)
- 7 = S4 (Ventimiglia)
- 8 = Isole Canarie
- 9 = *Stenella* 202/TA (Puglia)
- 1 = S Calabrone
- 2 = agnello (mesencefalo + corteccia)
- 3 = capra (feto)
- 4 = obex (agnello)





La colorazione è:  
 Aspecifica, perché colora tutte le proteine.  
 Bassa sensibilità

Il western è:  
 Specifico, perché visualizza una proteina  
 Alta sensibilità

# Soluzioni di luminolo e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

## Soluzioni per lo stripping

