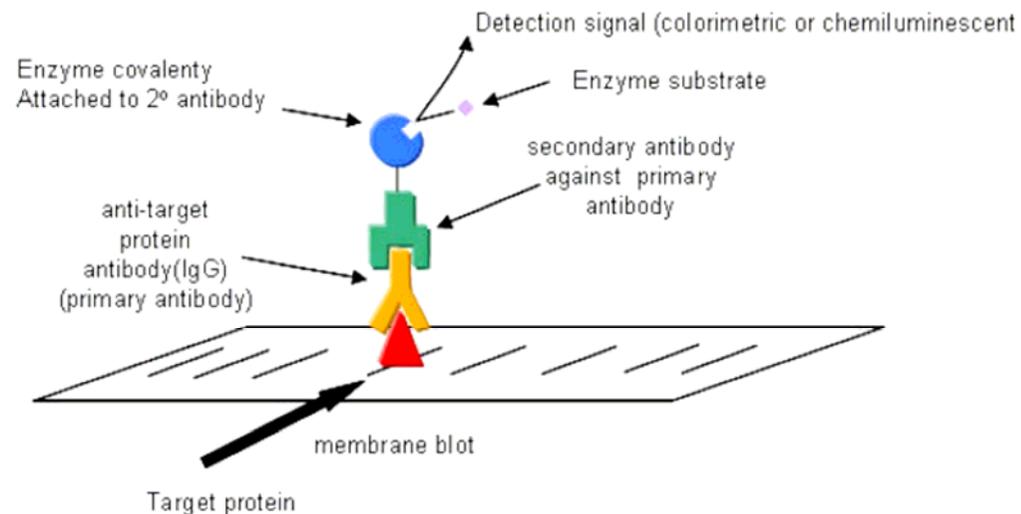


WESTERN BLOTTING



Permette l'identificazione di specifiche proteine antigeniche in una soluzione complessa

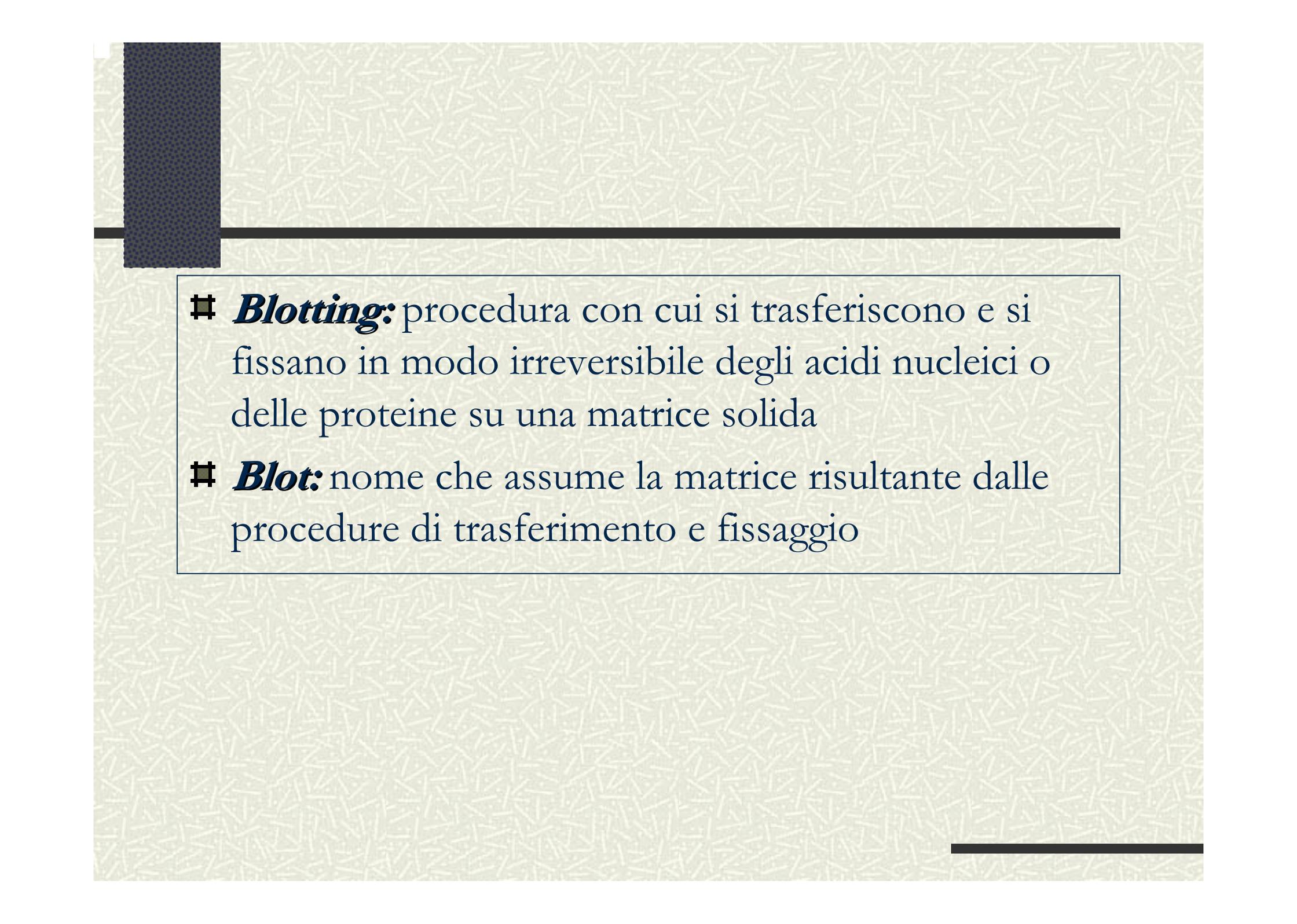
Tecnica di trasferimento delle proteine da un gel ad una membrana associata ad utilizzo di anticorpi specifici



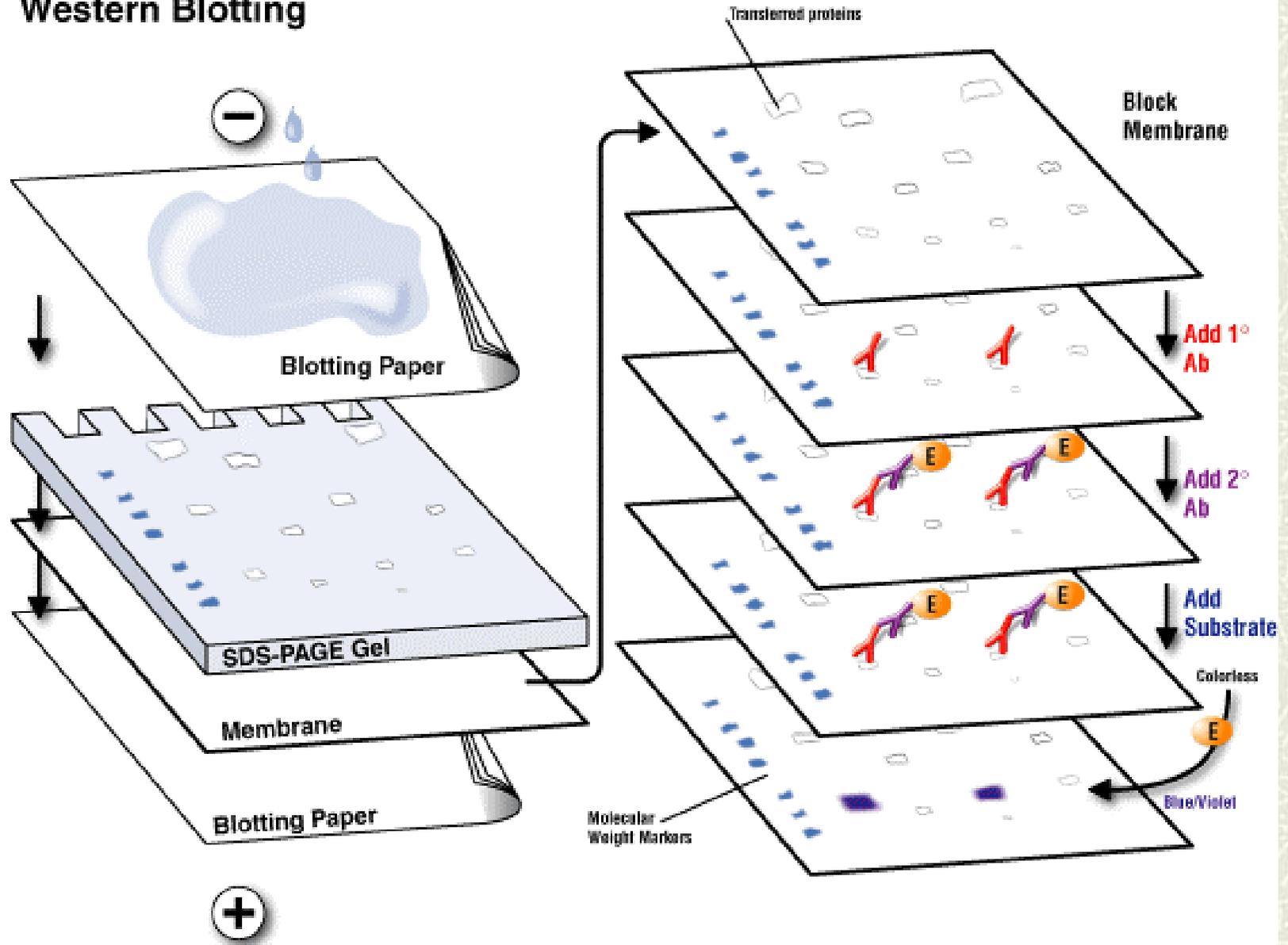
Gioco di parole inventato dai
biochimici:

- *Southern blotting*: DNA
- *Northern blotting*: RNA
- *Western blotting*: proteine



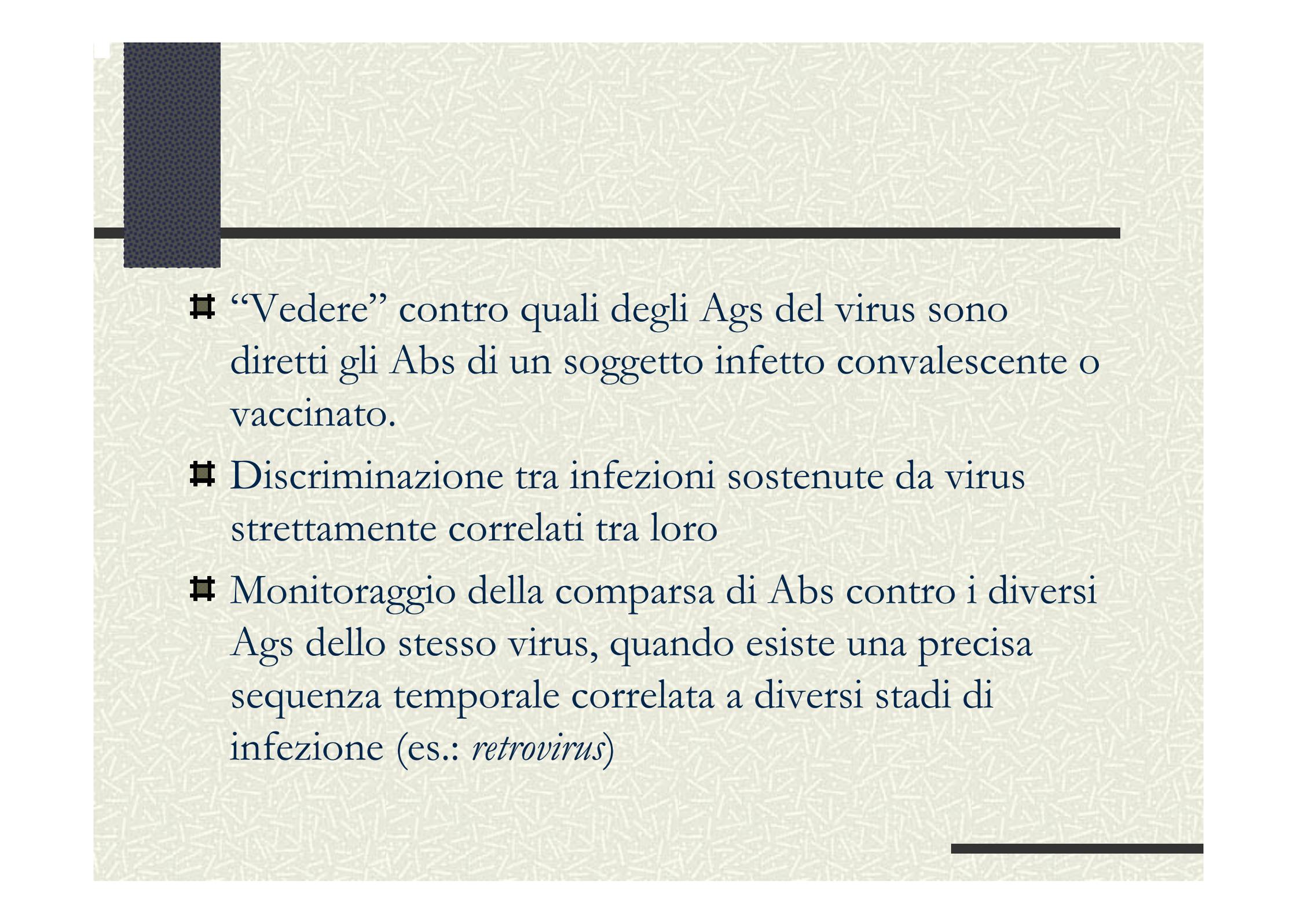
- 
- # **Blotting:** procedura con cui si trasferiscono e si fissano in modo irreversibile degli acidi nucleici o delle proteine su una matrice solida
 - # **Blot:** nome che assume la matrice risultante dalle procedure di trasferimento e fissaggio

Western Blotting



Applicazioni

- # Caratterizzazione delle proteine
 - # Identificazione di Ags di microrganismi o parassiti complessi
 - # Valutazione della specificità epitopica degli Abs monoclonali
 - # In immunologia clinica: identificazione dello stadio evolutivo di alcune malattie infettive (es.:AIDS)
-

- 
- # “Vedere” contro quali degli Ags del virus sono diretti gli Abs di un soggetto infetto convalescente o vaccinato.
 - # Discriminazione tra infezioni sostenute da virus strettamente correlati tra loro
 - # Monitoraggio della comparsa di Abs contro i diversi Ags dello stesso virus, quando esiste una precisa sequenza temporale correlata a diversi stadi di infezione (es.: *retrovirus*)

P.M.

Siero 1

Siero 2

Siero 3

Siero -

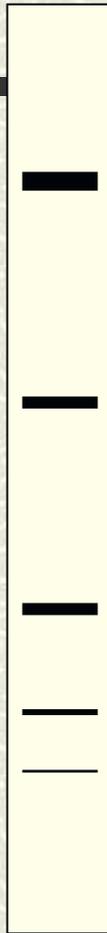
61 kD

41 kD

24 kD

15 kD

10 kD



Stadio più avanzato della malattia (Abs diretti
contro tutte le componenti antigeniche del virus)

Fase iniziale dell'infezione

Fasi

Preparazione del campione

Elettroforesi

→ *Separazione proteine
su gel di acrilamide*

Trasferimento

Blocking

Anticorpo

Rivelazione

Fase importante...

Immobilizzazione e trasferimento

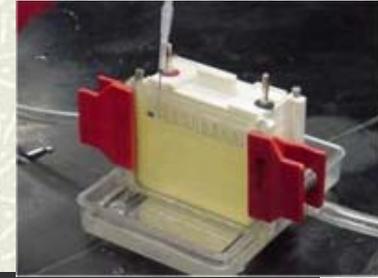
Le proteine nel gel sono ancora in soluzione

- Le bande diffondono e si confondono col tempo

E' necessaria l'immobilizzazione per:

- **Preservare in maniera permanente l'esperimento di elettroforesi**
- **Permettere il riconoscimento di proteine specifiche**

Fasi



Polimerizzazione del gel

- Separazione di una miscela di proteine oppure di frammenti di un virus mediante elettroforesi in gel di poliacrilamide (SDS-PAGE, *polyacrylamide gel electrophoresis*)

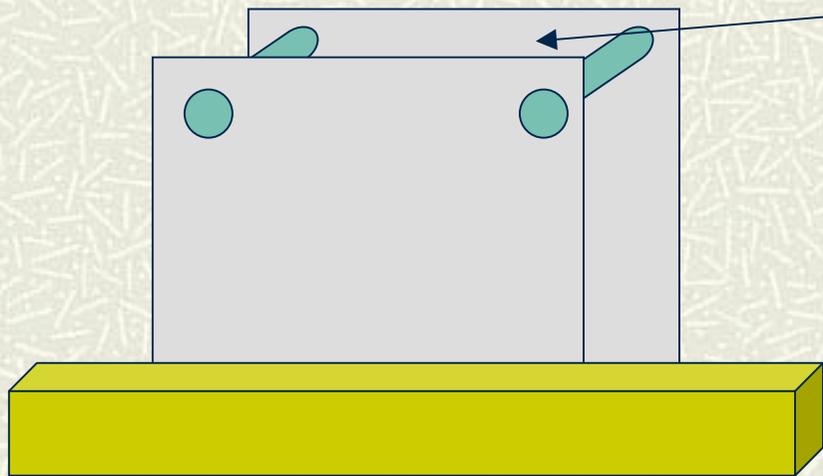
Perchè si usa un gel di poliacrilamide e non di agarosio per separare le proteine?

-gel di poliacrilamide con trama più compatta

-Minore dimensioni dei pori

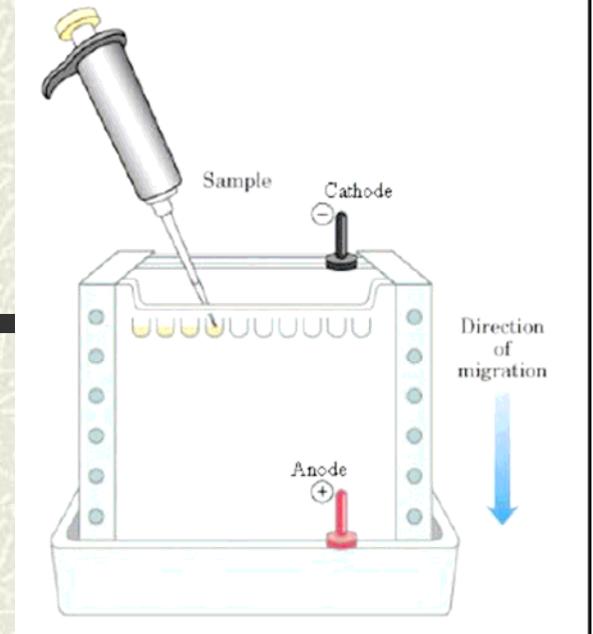
-Minori dimensioni delle proteine rispetto al DNA

#Polimerizzazione del gel (può essere conservato a +4°C per 1-2 giorni, immerso nel tampone)



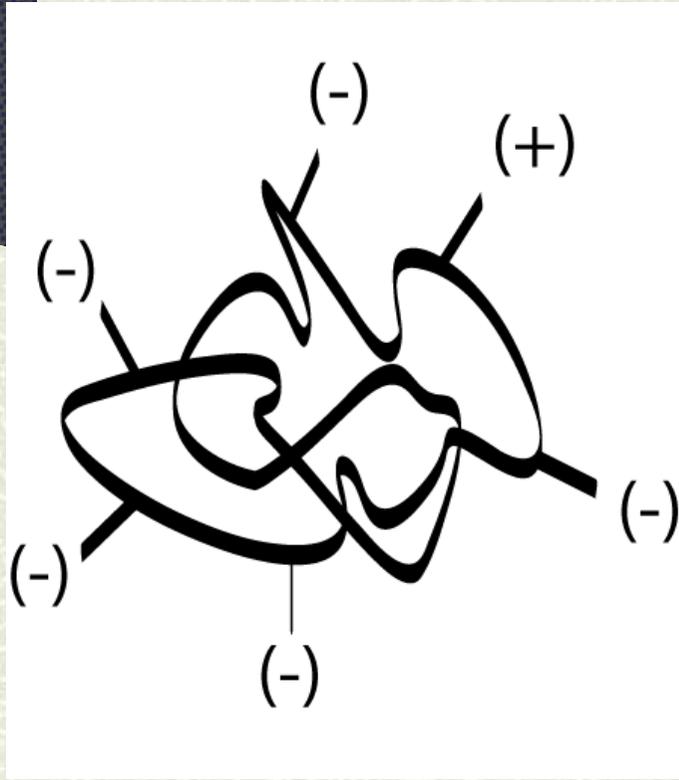
Gel di acrilamide al 12%:
acqua distillata,
mix di acrilamide,
Tris, SDS, ammonio persolfato,
TEMED

Elettroforesi delle proteine

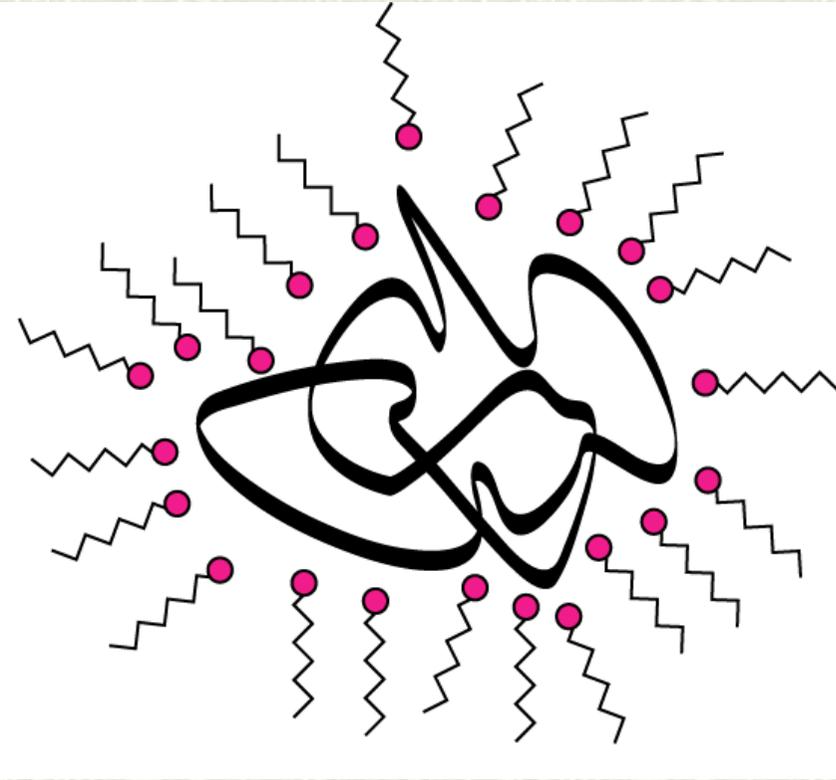


SDS (detergente anionico): funzioni

- Legame alle proteine in proporzione al loro PM
- Annullamento della carica intrinseca della proteina dalla carica negativa netta dell'SDS
- Rottura dei ponti disolfuro intracatena e ripiegamento della proteina in un asse semirigido di lunghezza proporzionale al PM



Proteina Nativa
Carica netta: -4



Proteina trattata con SDS
Carica netta: Molto (-)

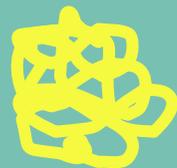
Dopo trattamento con SDS....

- ✓ Le proteine perdono la loro normale forma
- ✓ Le proteine hanno tutte lo stesso rapporto carica/massa
- ✓ Le proteine vengono separate esclusivamente sulla base delle loro dimensioni

Carica Massa

+3

30kD



SDS



-300

30kD

-4

42kD



-420

42kD

Native-PAGE

SDS-PAGE

X

Y

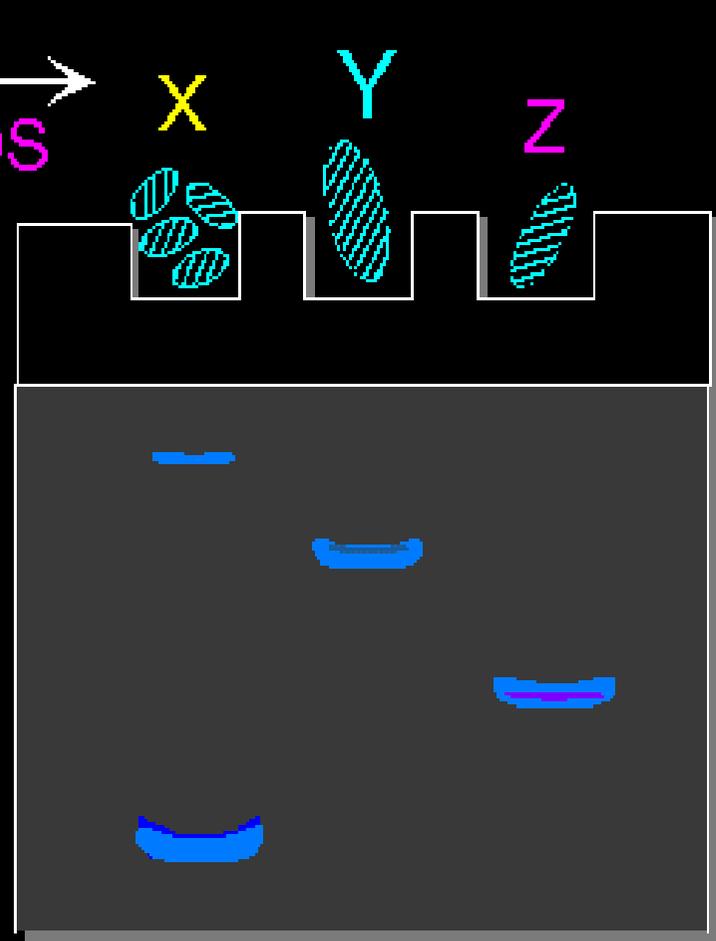
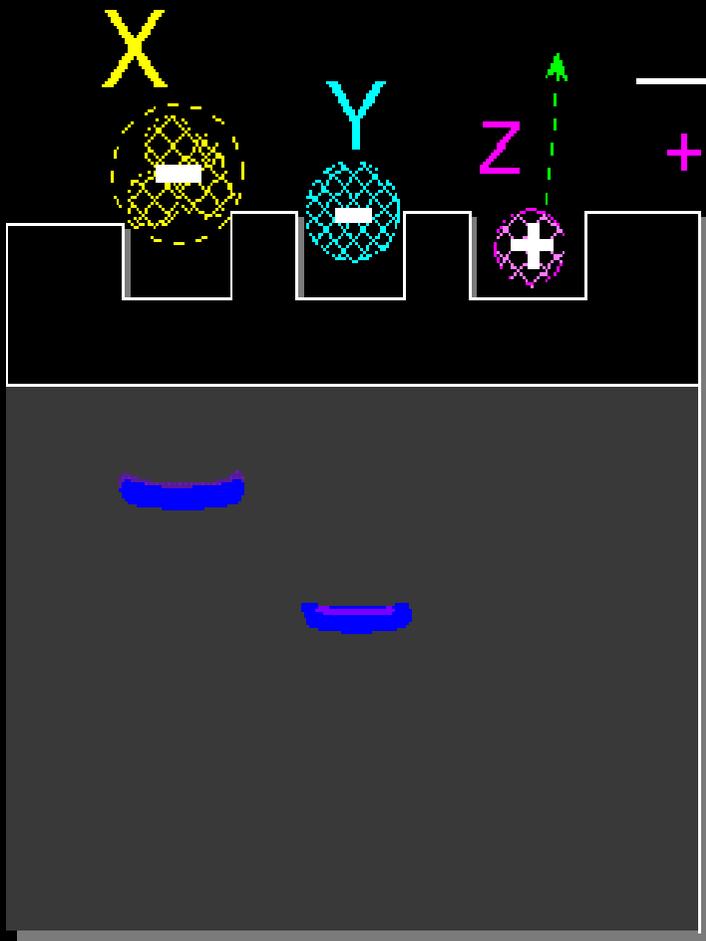
Z

X

Y

Z

+ SDS



+

+

Acrilamide: azione neurotossica, assorbimento percutaneo. La poliacrilamide non è tossica, ma bisogna usare cautela in quanto potrebbe contenere piccoli residui non polimerizzati

% di acrilammide consigliata

8%

10%

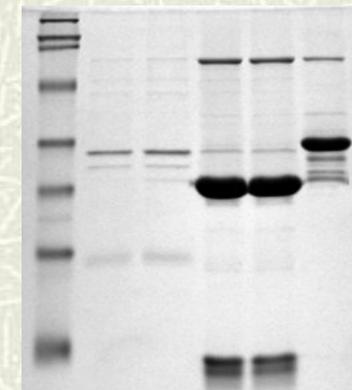
12%

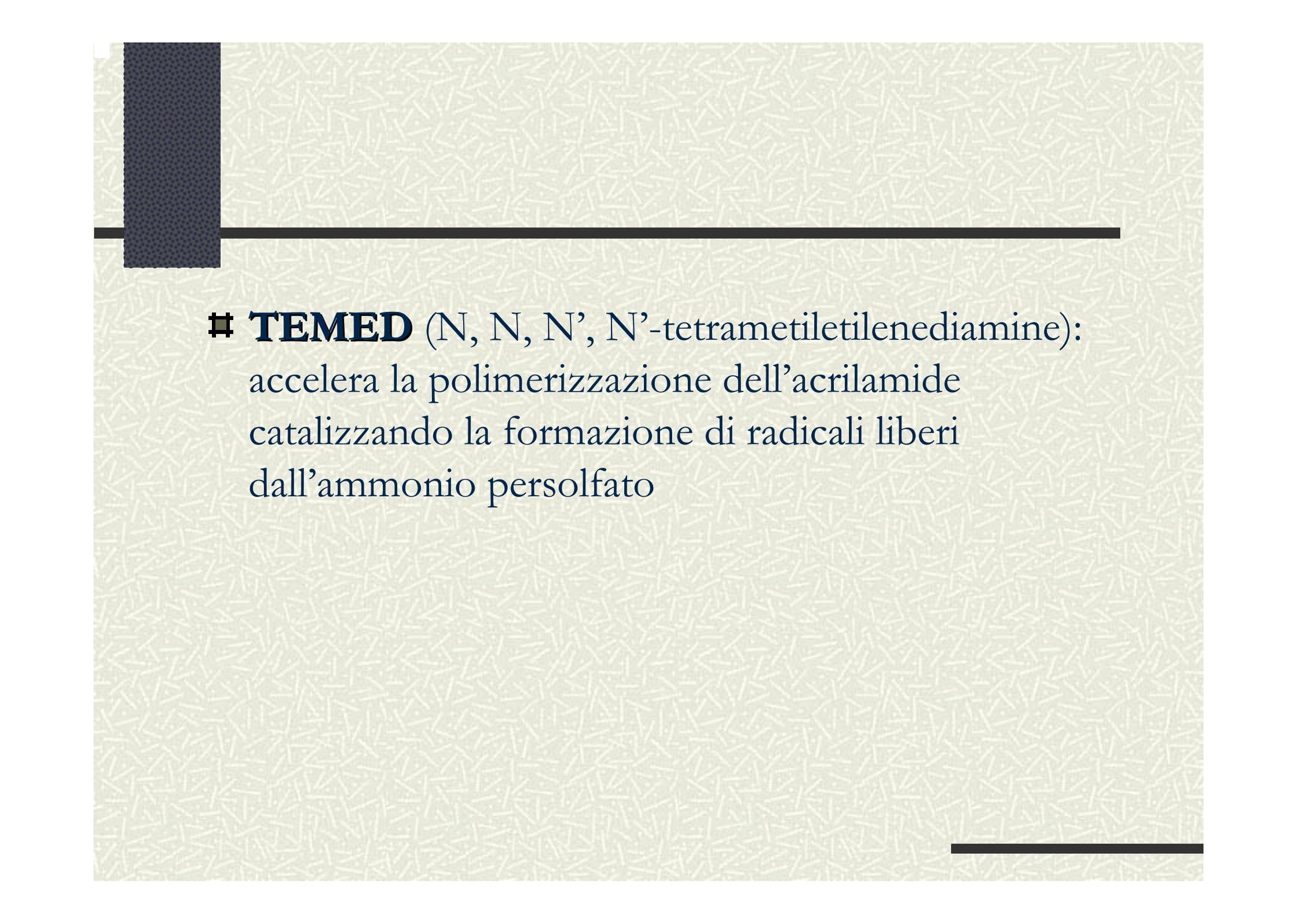
Dimensioni delle proteine

40-200 kDa

21-100 kDa

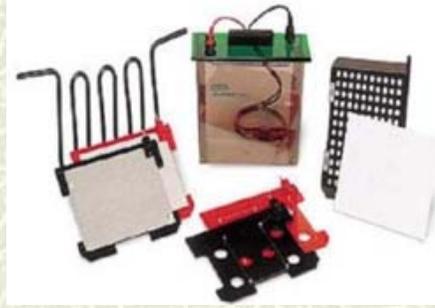
10-40 kDa



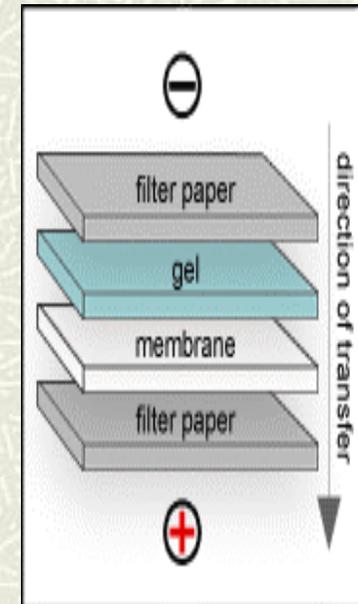


TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletilenediamine):
accelera la polimerizzazione dell'acrilamide
catalizzando la formazione di radicali liberi
dall'ammonio persolfato

Trasferimento



- # Deposizione del gel su un foglio di nitrocellulosa, di nylon o su una membrana PVDF (polyvinylidene difluoride)
- # qualità del PVDF: maggiore capacità legante, maggiore “ritenzione” delle proteine legate, maggiore sensibilità
- # Induzione di un flusso di soluzione tampone (in camera elettroforetica) che migri attraverso il gel verso il foglio di nitrocellulosa





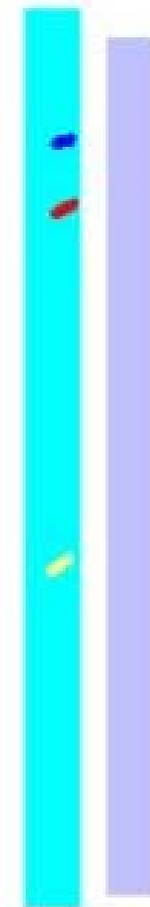
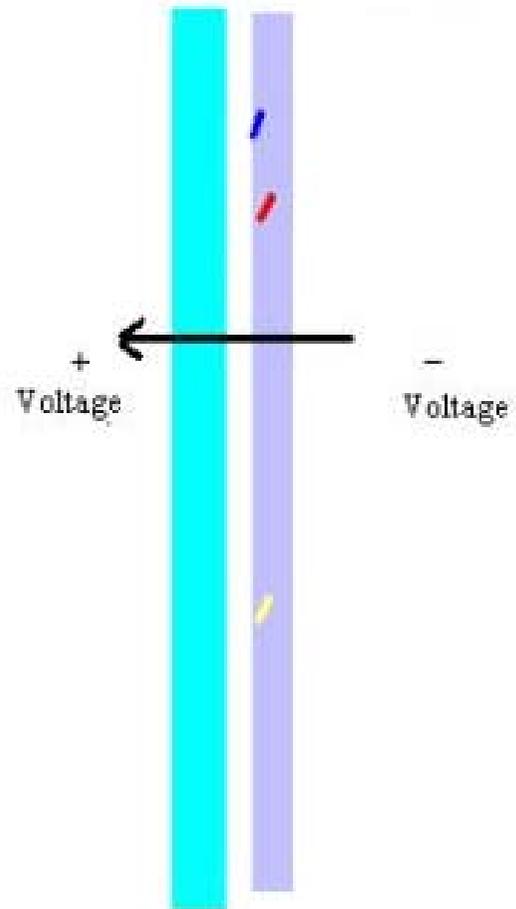
#Gel di controllo colorato con blu Coomassie
(determinazione banda proteica totale)

#Tempo di trasferimento e amperaggio:

- proteina di 20 kDa trasferisce in 10 min.

a un gel spesso 0.5 mm a 0.5 A

-proteine più grandi (≥ 100 kDa): 45-60 min

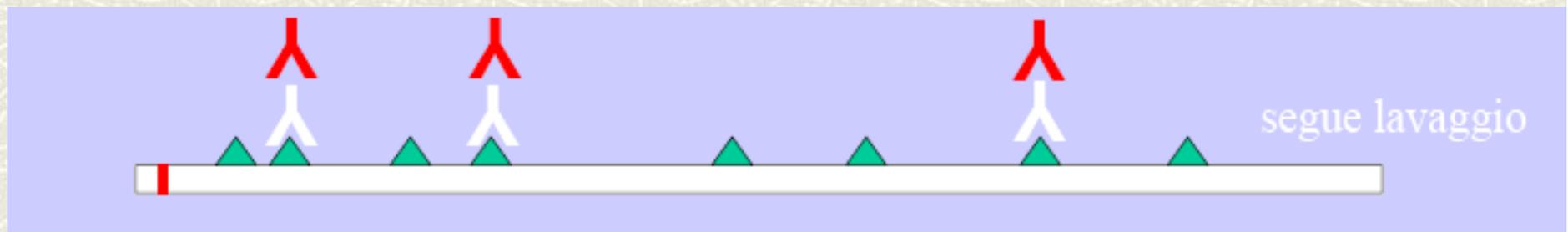


Blocking e reazione Ag/Ab

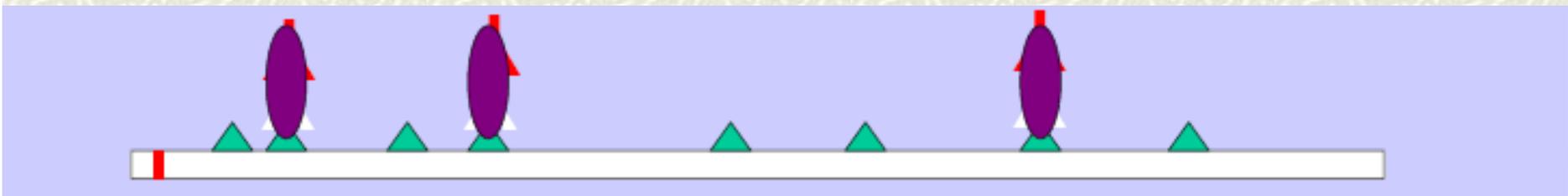
- # Misurazione delle diverse bande proteiche separate sul gel alla nitrocellulosa dove si fissano
- # Blocking (blocco dei restanti siti di legame idrofobici sulla membrana): tampone tris con latte in polvere o BSA
- # Distribuzione sulla nitrocellulosa di un Ab monoclonale specifico per l'Ag che si vuole cercare
- # Legame dell' Ab con la banda che contiene l'Ag omologo



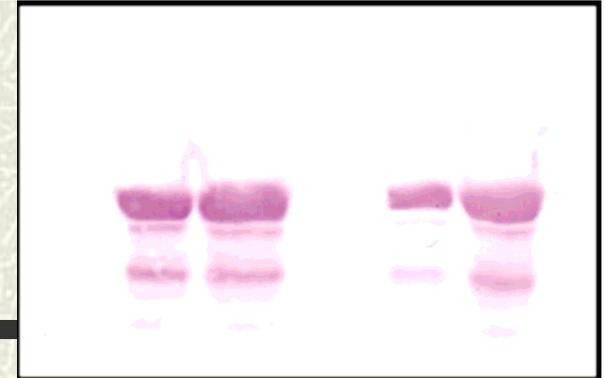
- Visualizzazione della reazione Ag-Ab mediante anti-Ab marcato con un enzima



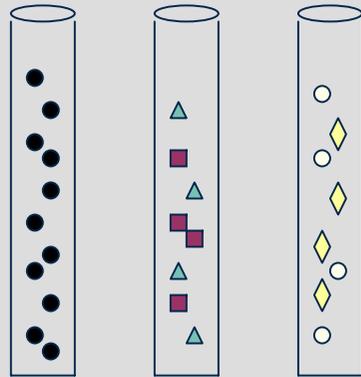
- Aggiunta del cromogeno (es: DAB) e colorazione della banda in cui è presente l'Ag



Metodi di rivelazione



- # **Blotting con fosfatasi alcalina** (ATTENZIONE: enzima inibito da EDTA e da fosfato....usare tampone TBS per i lavaggi successivi e non PBS!!!!)
- # **Blotting con perossidasi**
- # **Enhanced chemiluminescence** (emissione di luce con minima produzione di calore; la perossidasi catalizza l'ossidazione del luminol in 3-aminoftalato con emissione di luce a bassa intensità, ma in presenza di alcune sostanze chimiche come i fenoli modificati la luce emessa può essere 1000 volte maggiore)

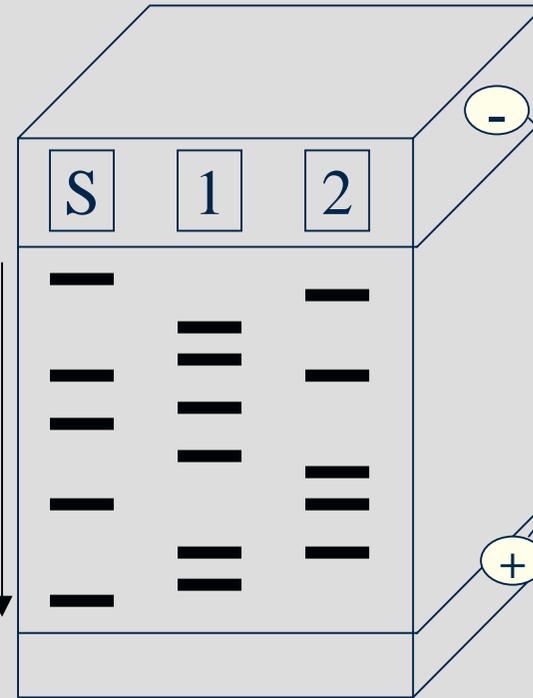


Standard di PM
Campione 1
Campione 2

Denaturazione delle proteine e caricamento del gel



Separazione degli Ags proteici mediante elettroforesi in gel

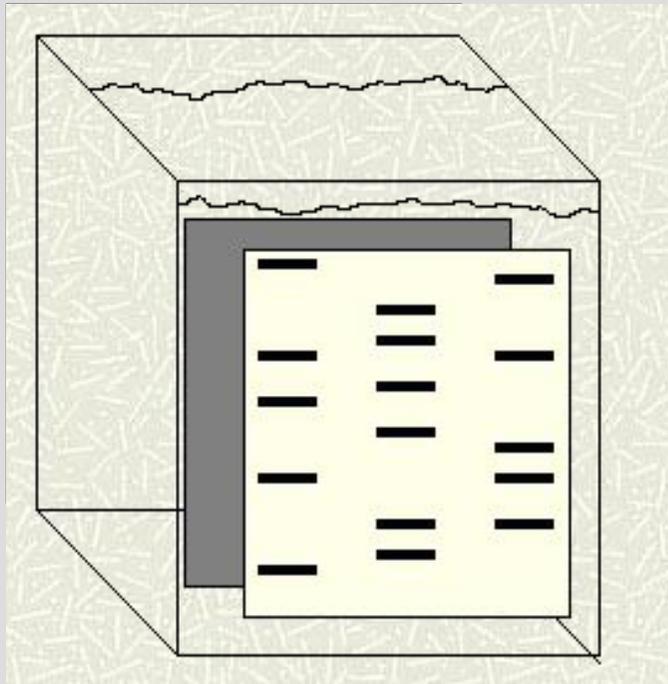


Catodo

ALIMENTATORE

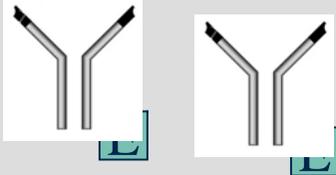
Anodo

Migrazione elettroforetica



Trasferimento dei peptidi dal gel a una membrana di nitrocellulosa mediante elettroforesi perpendicolare alla prima

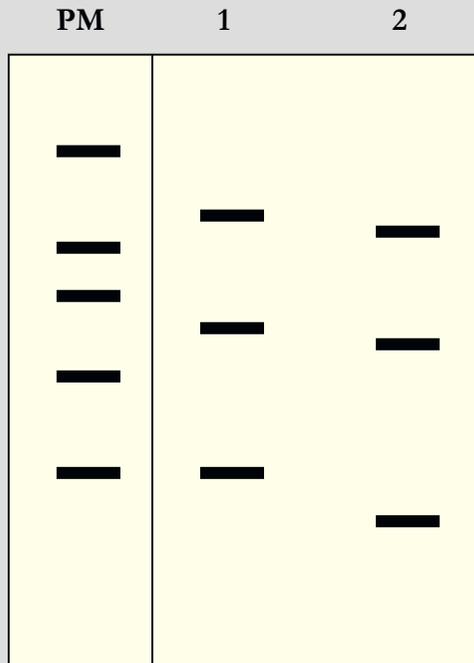
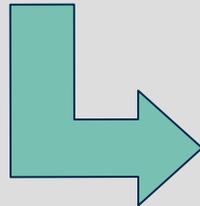




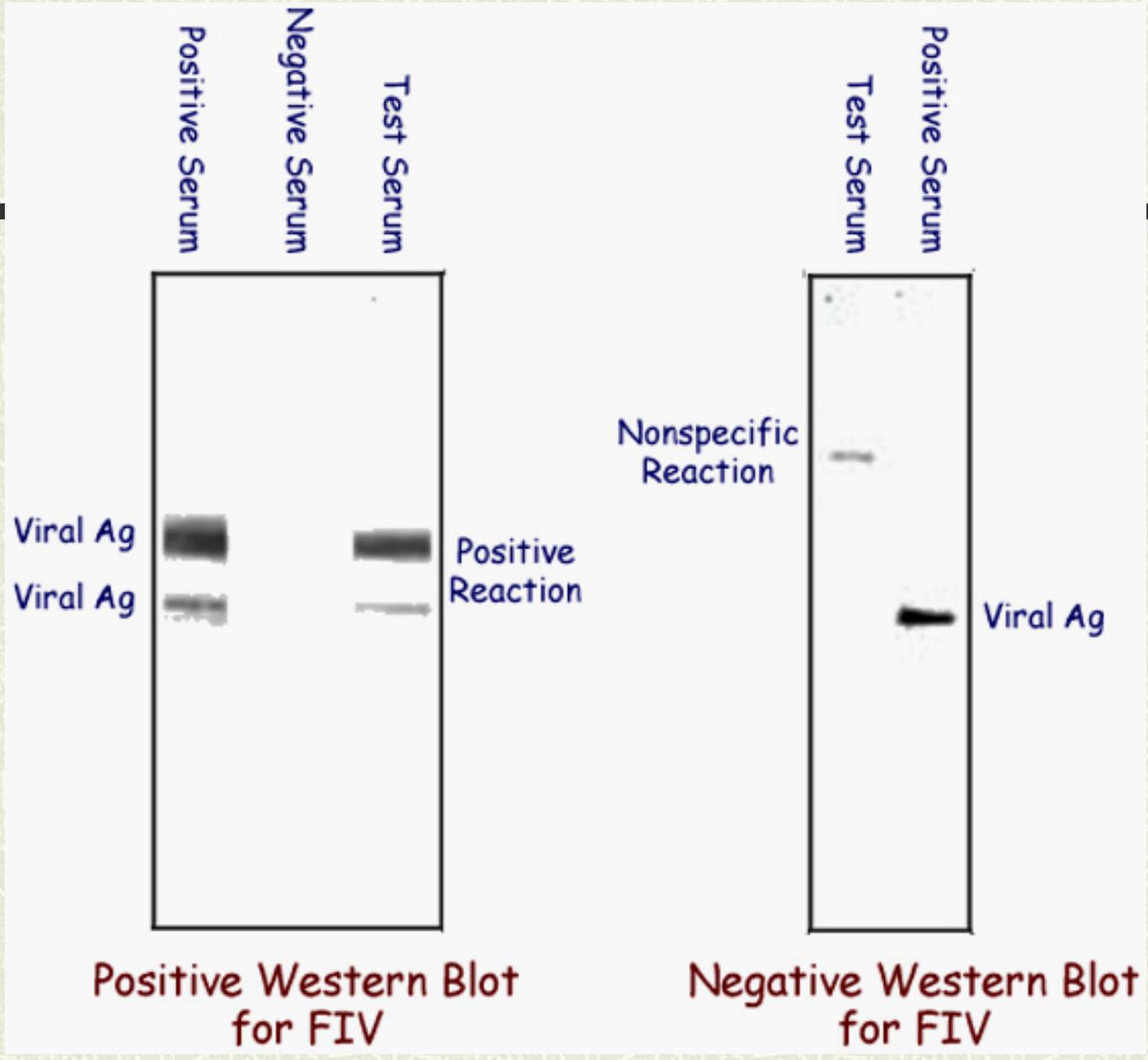
S

Aggiunta degli Abs specifici
Coniugati con enzima o di Abs
secondari coniugati

Aggiunta del substrato
Con sviluppo della reazione
enzimatica



Visualizzazione delle bande
antigeniche e confronto con i
PM evidenziati mediante
colorazione specifica



WB e infezione da prioni



Messa in evidenza della presenza della proteina patologica in omogenati di cervello di animali anche in stadio asintomatico prima che compaiono le lesioni istopatologiche

Idrolisi parziale con proteinasi K ed evidenziazione della proteina patologica che permane, con un PM inferiore, dopo trattamento, mentre la proteina normale viene completamente degradata.