

# Western Blotting

**Southern Blot:** Per l'analisi del DNA.  
(sonda = DNA o RNA).

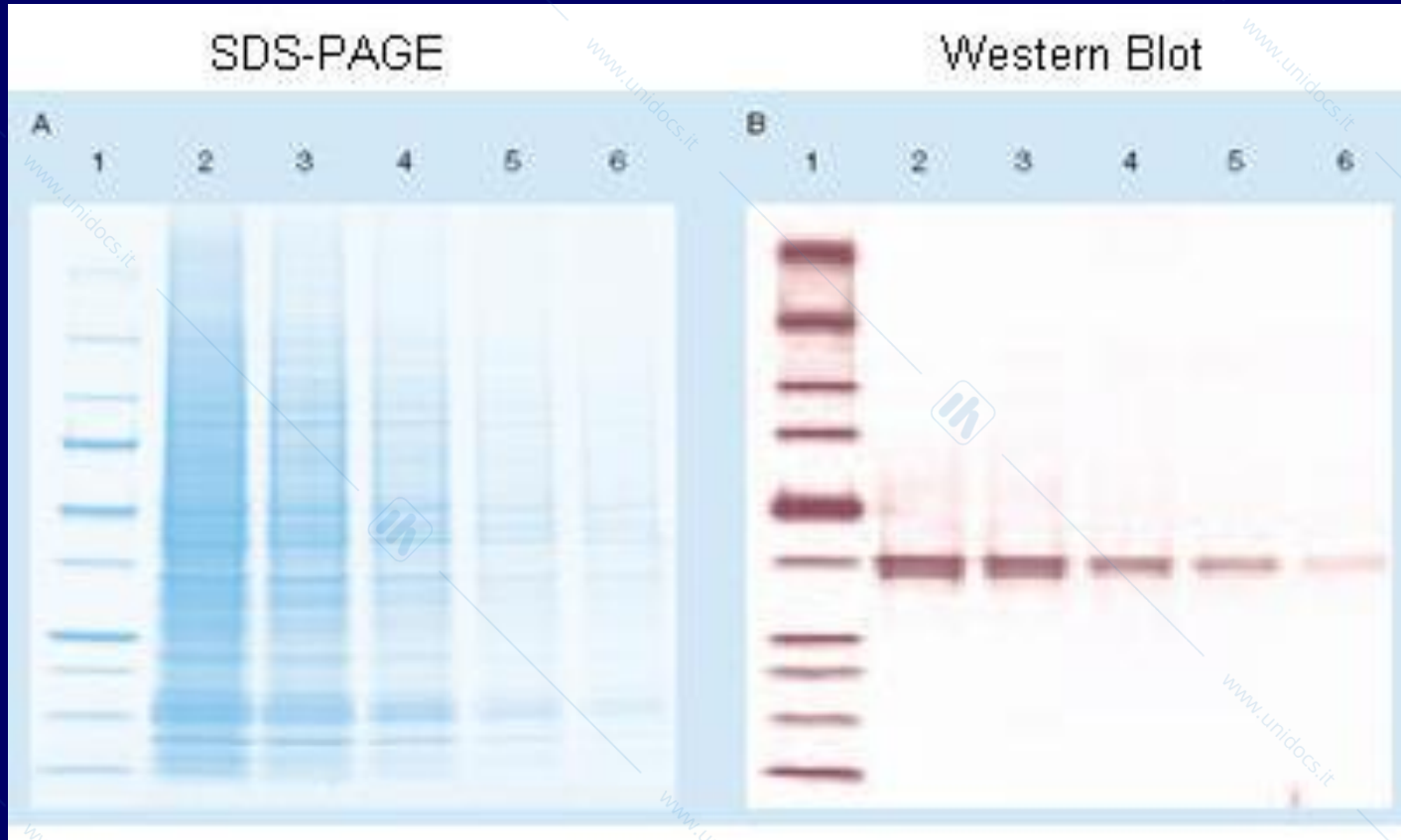
**Northern Blot:** Per l'analisi dell' RNA.  
(sonda = DNA o RNA).

**Western Blot:** Per l'analisi delle proteine.  
(sonda = anticorpo).

# Cosa e' un Western Blot?

- Una tecnica in cui le proteine sono separate mediante elettroforesi su gel e successivamente trasferite su un supporto (membrana o filtro). Successivamente una specifica proteina viene identificata mediante la sua reazione specifica con un anticorpo.

# Western blot



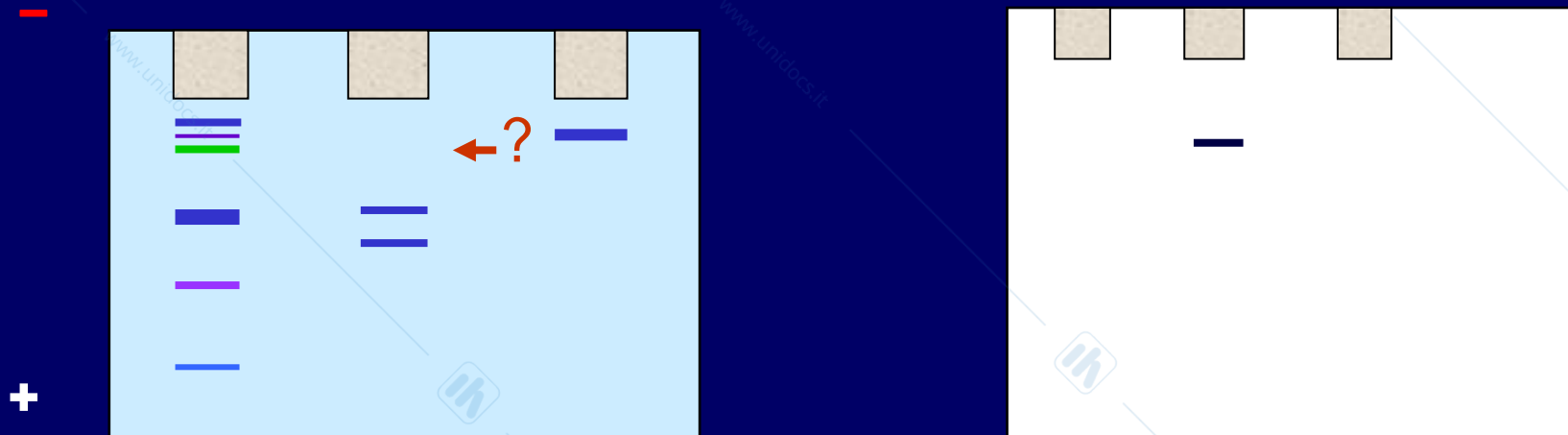
Consente la visualizzazione dell'ago nel pagliaio!



# A cosa serve il Western Blot?

Qual e' la proteina che mi interessa?

- SDS-PAGE (non certo)
  - Si basa sul confronto di peso molecolare
- Western blot (certo)
  - Si basa su una reazione specifica antigene-anticorpo



# Fasi di un Western Blot

- **Prima fase:** elettroforesi su gel.

(Le proteine del campione vengono separate su un gel in base alle loro dimensioni)

- **Seconda fase:** trasferimento su membrana.

(Le proteine nel gel sono poi trasferite su una membrana di nitrocellulosa mediante un campo elettrico)

- **Terza fase:** saturazione o “blocking”.

(La saturazione e' usata per prevenire le interazioni non specifiche tra l'anticorpo e la membrana)

# Fasi di un Western Blot

- **Quarta fase: legame dell'anticorpo primario.**  
(L'anticorpo riconosce la proteina specifica immobilizzata sulla membrana)
- **Quinta fase: legame dell'anticorpo secondario.**  
(L'anticorpo secondario, coniugato a un enzima (AP o HRP), riconosce specificamente l'anticorpo primario, già legato alla proteina sulla membrana)
- **Sesta fase: rivelazione o "detection".**  
(L'enzima coniugato all'anticorpo secondario scinde un substrato che, in corrispondenza della proteina specifica, sviluppa precipitato colorato o chemiluminescenza)

# Western blot: seconda fase

## Immobilizzazione e trasferimento

Le proteine nel gel sono ancora in soluzione

- Le bande diffondono e si confondono col tempo

E' necessaria l'immobilizzazione per:

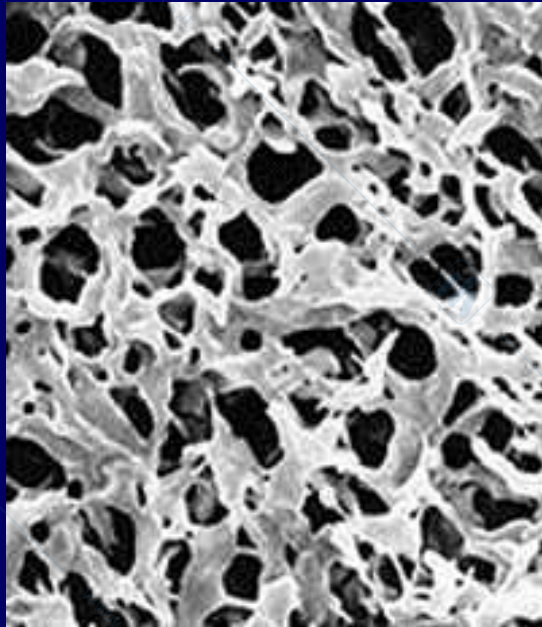
- Preservare in maniera permanente l'esperimento di elettroforesi
- Permettere il riconoscimento di proteine specifiche

La strategia piu' comune e' il trasferimento su membrana

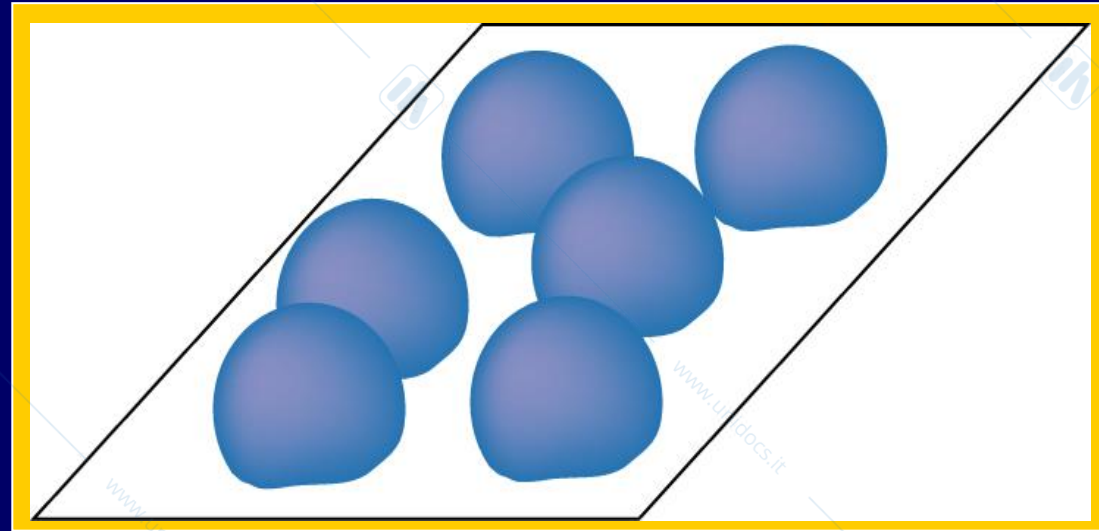
- Nitrocellulosa
- PVDF (Polivinilidene fluoride)
- Nylon

# Western blot: seconda fase

## Immobilizzazione e trasferimento



membrana



# Western blot: seconda fase

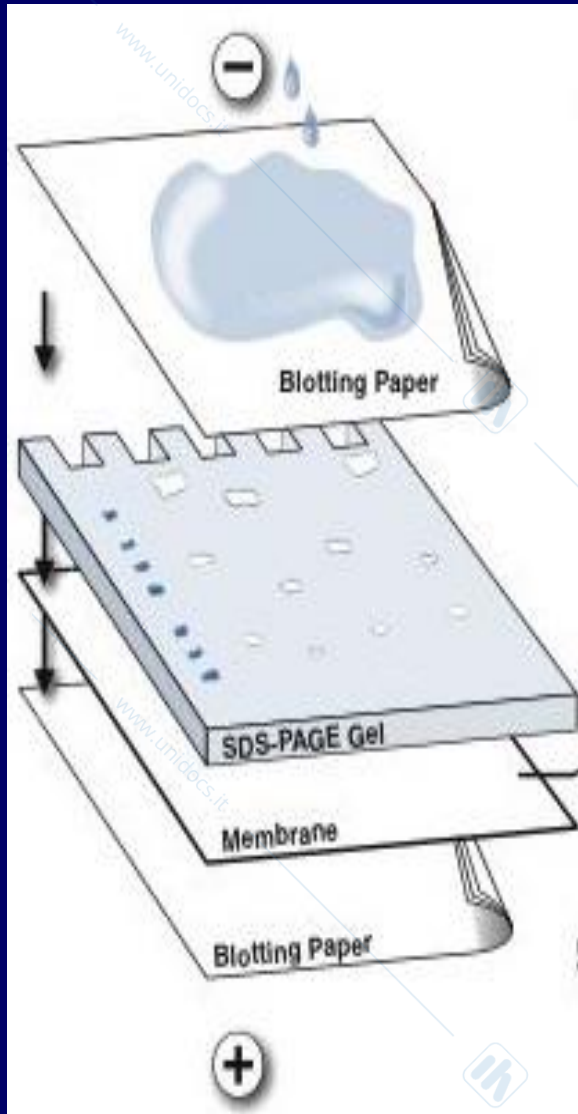
## Immobilizzazione e trasferimento

### ● Elettroblotting

- Apparato di trasferimento
- Il gel e' messo tra strati di carta da filtro con la membrana a diretto contatto col gel sul lato verso l'elettrodo positivo
- Viene applicato un campo elettrico e le proteine migrano fuori dal gel verso l'elettrodo positivo e si legano alla membrana
- Fatto a 4°C per evitare surriscaldamento, decomposizione del tampone e degradazione delle proteine

# Western blot: seconda fase

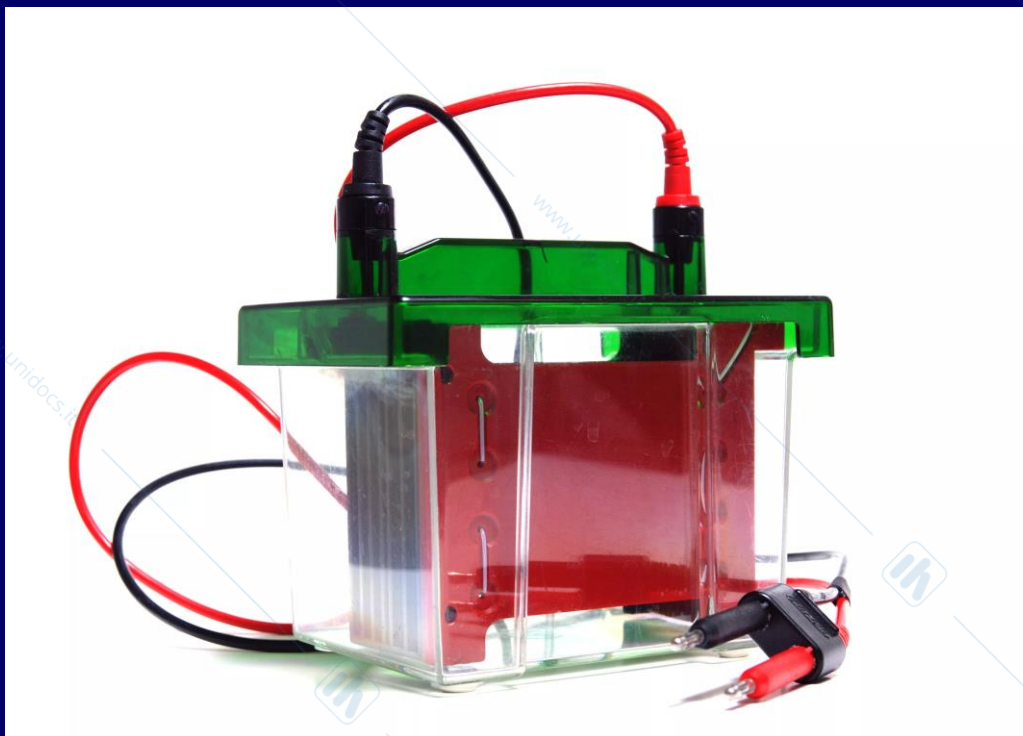
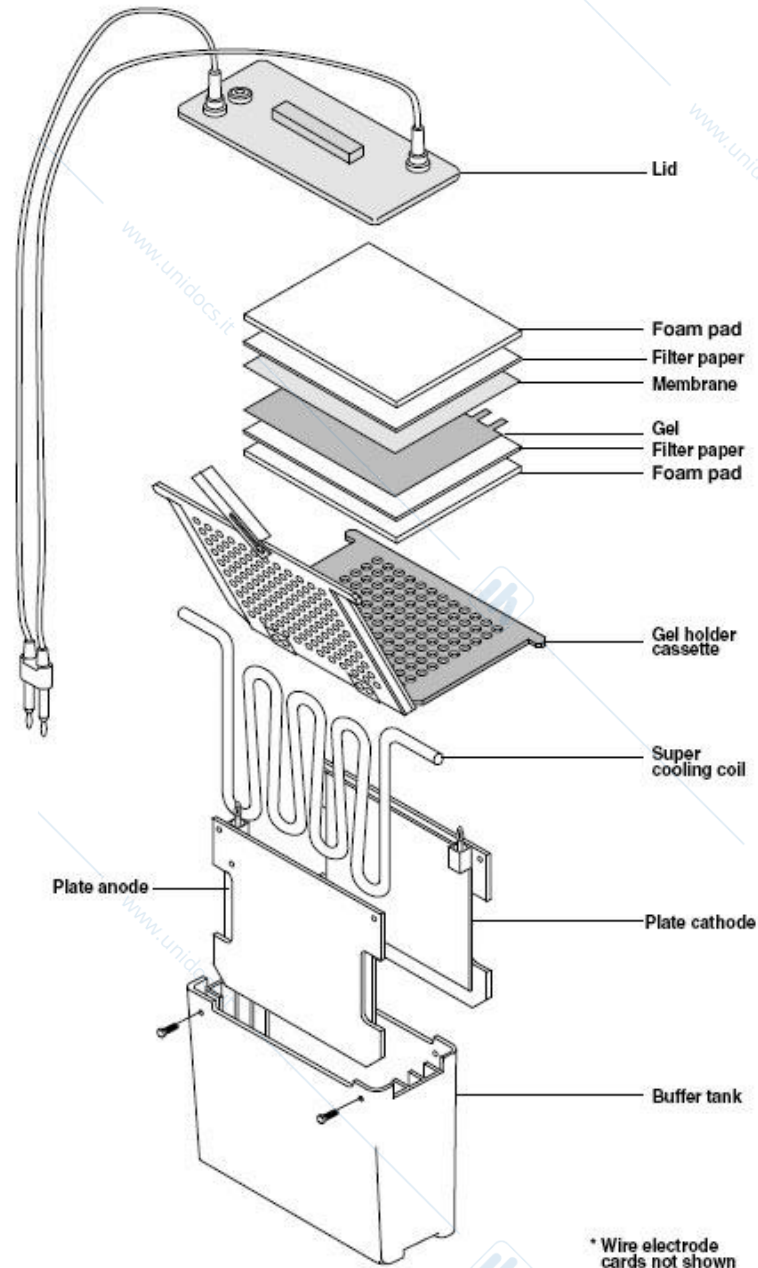
## Immobilizzazione e trasferimento



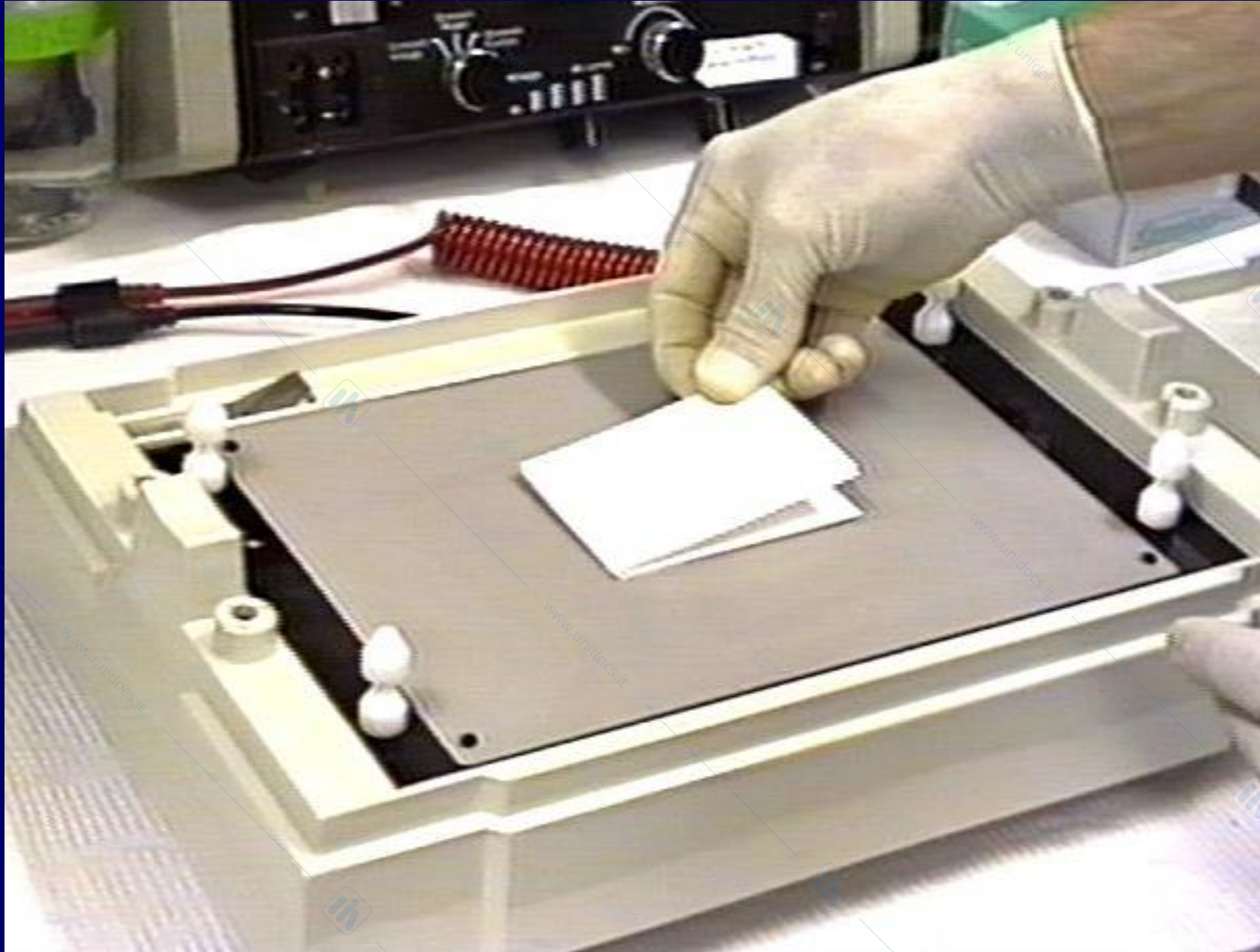
### Trasferimento dal catodo (-) all' anodo (+)

- 1) Spugnette
- 2) 3 fogli di carta da filtro imbevuti di tampone di trasferimento
- 3) Gel
- 4) Membrana
- 5) 3 fogli di carta da filtro imbevuti di tampone di trasferimento
- 6) Spugnette

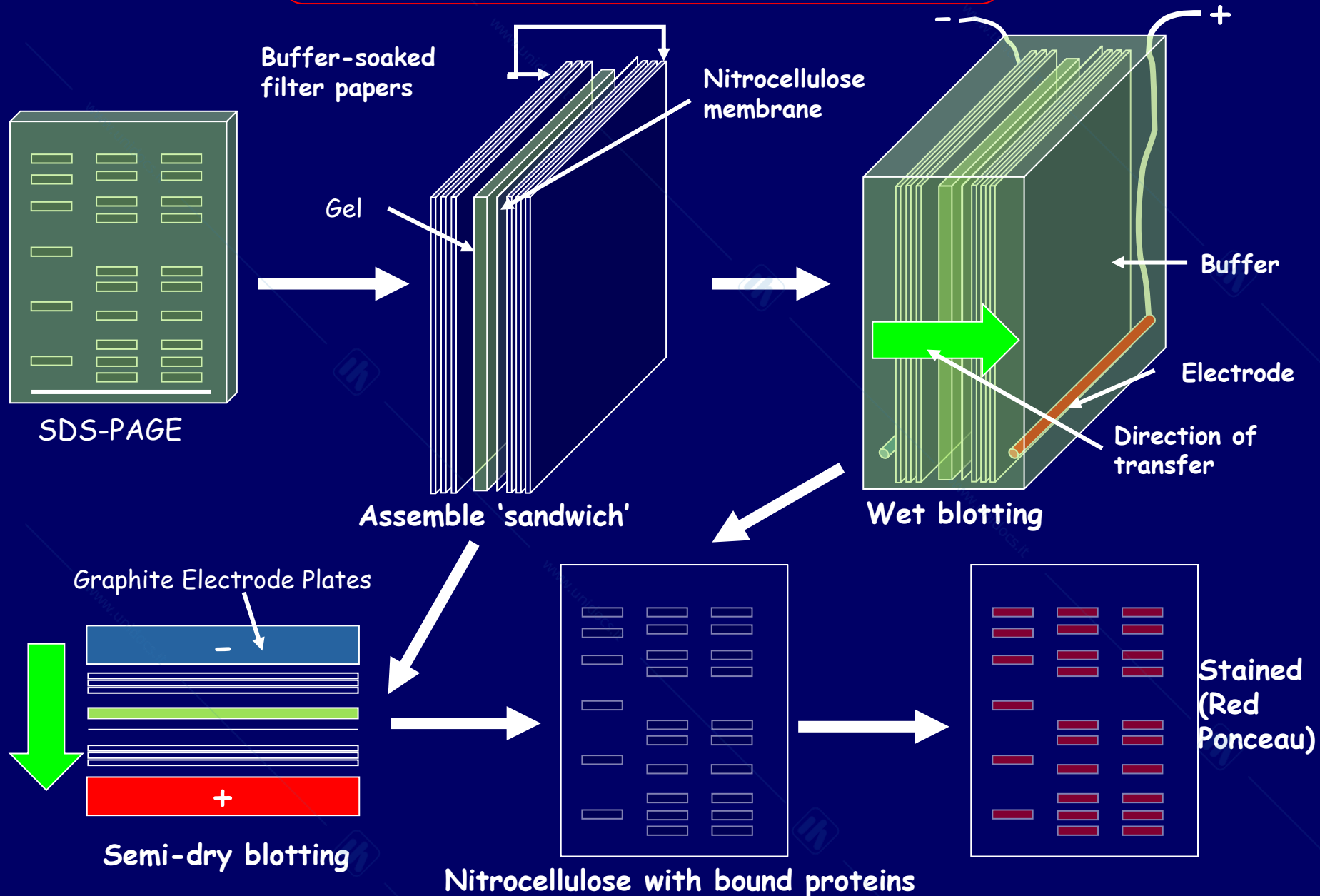
# Trans-Blot Cell Description & Assembly of Parts



# Apparato per il trasferimento "Semi-dry"



# Western Blotting



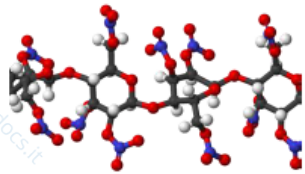
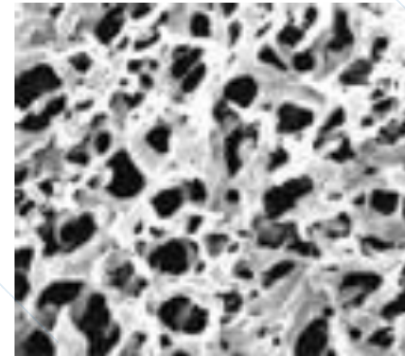
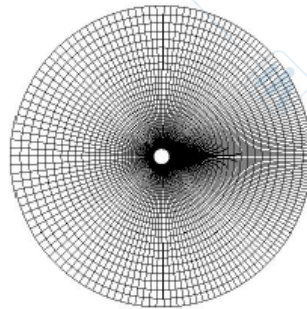
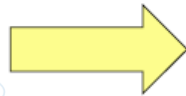
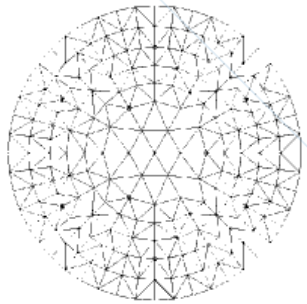
# Western blot: seconda fase

## Immobilizzazione e trasferimento

- Componenti del tampone di trasferimento:
  - 25mM Tris
  - 190mM glicina
  - 20% metanolo

# WESTERN BLOTTING (WB) MEMBRANE

Trasferimento su **membrana** immobilizzanti per rendere più accessibile la proteina (Ag) all'anticorpo (Ab).



**Nitrocellulosa**

**PVDF**

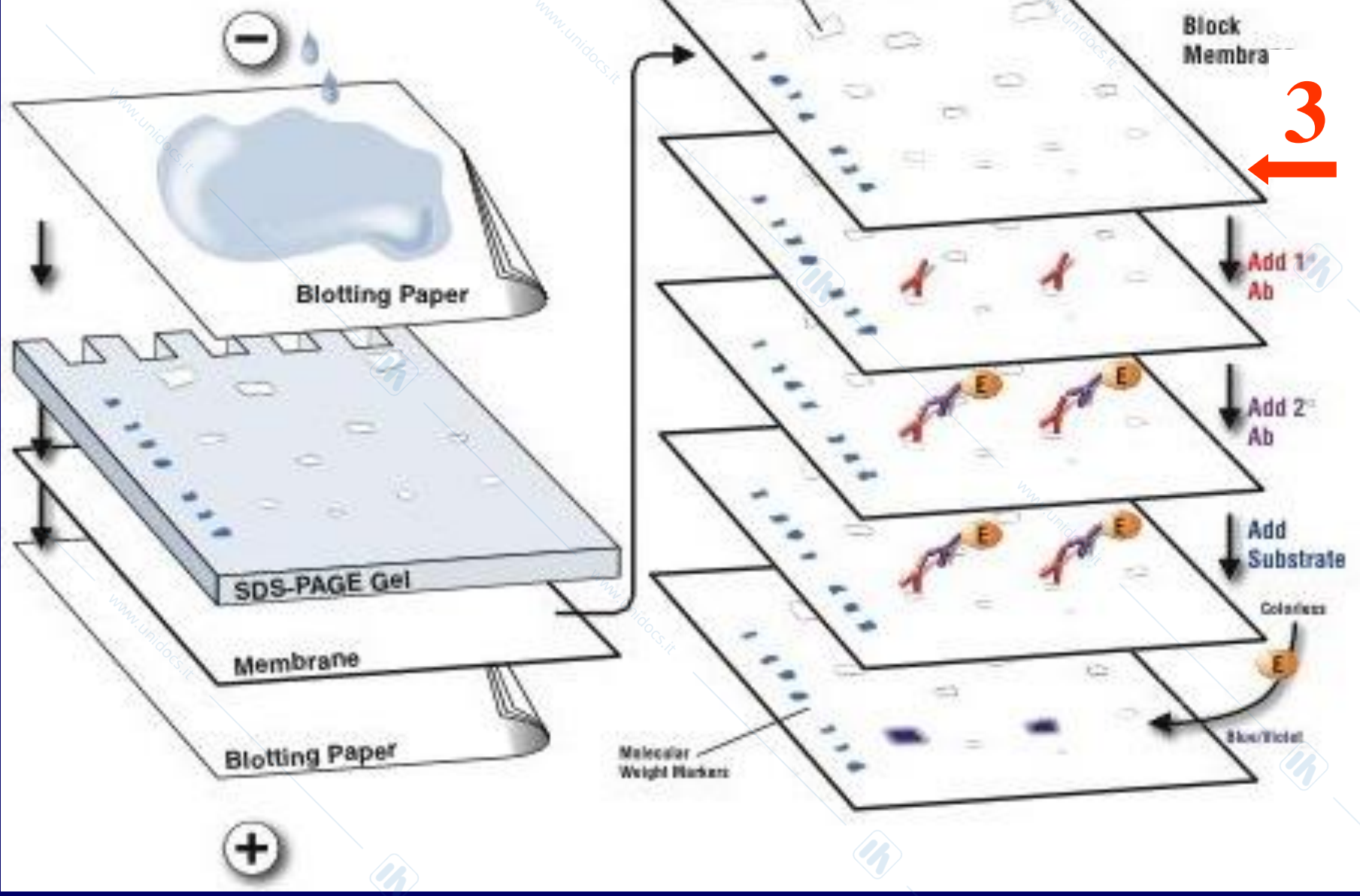
**Nylon**

# Western blot: terza fase saturazione o “blocking”

- Per saturare i siti idrofobici liberi sulla membrana
- Per prevenire il legame dell'anticorpo primario alla membrana stessa
- Latte scremato o Albumina di Siero Bovino (BSA)



# Western Blotting

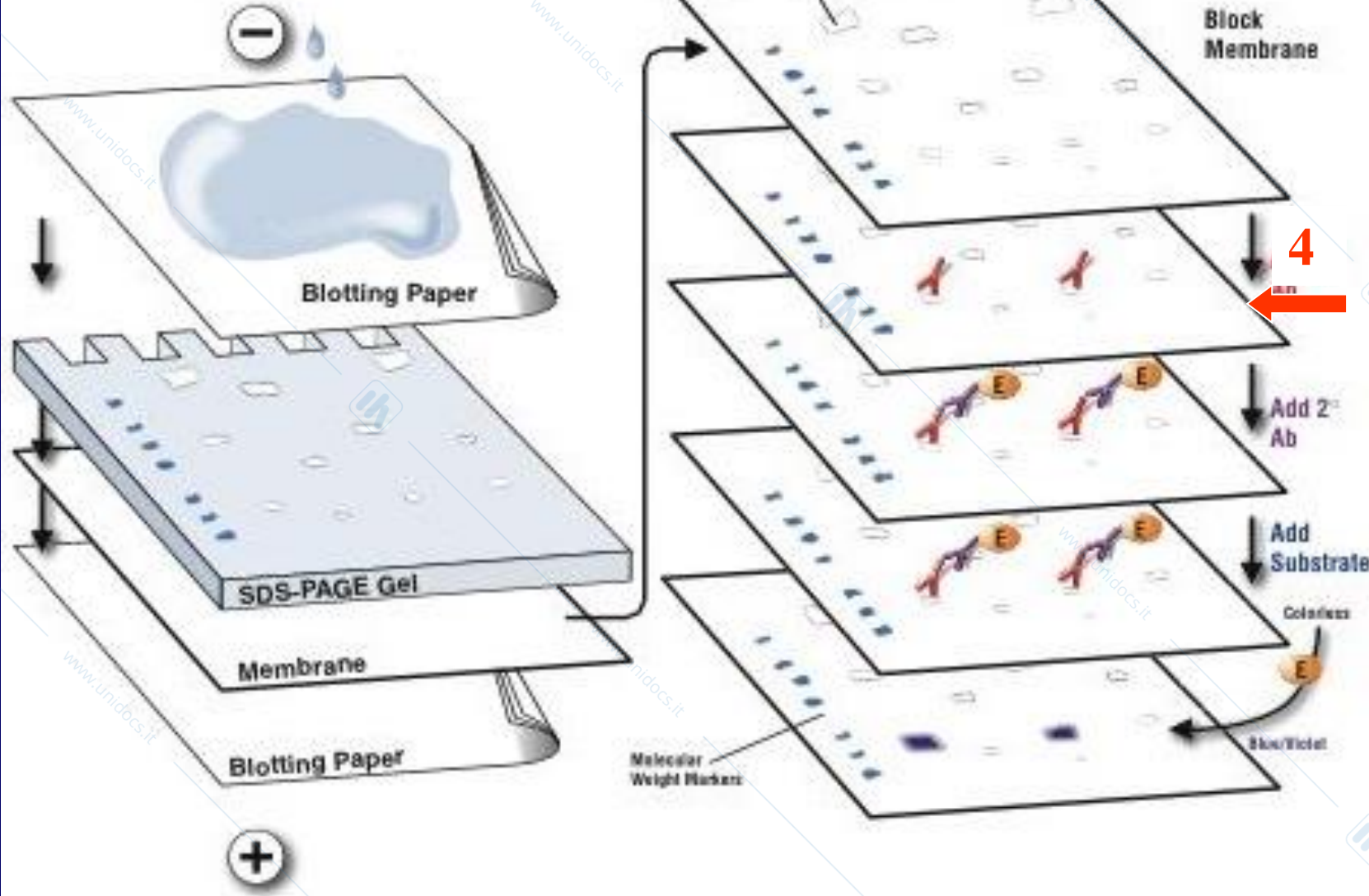


# Western blot: quarta fase

## incubazione con anticorpo primario

- L'anticorpo primario riconosce la proteina di interesse e non lega le altre proteine immobilizzate sulla membrana
- Anticorpi come sonde:
  - Molto sensibili
  - Possono essere “prodotti”
    - Immunizzando una specie diversa (anticorpi policlonali)
    - Generando anticorpi monoclonali (mAb)
  - Economici

# Western Blotting



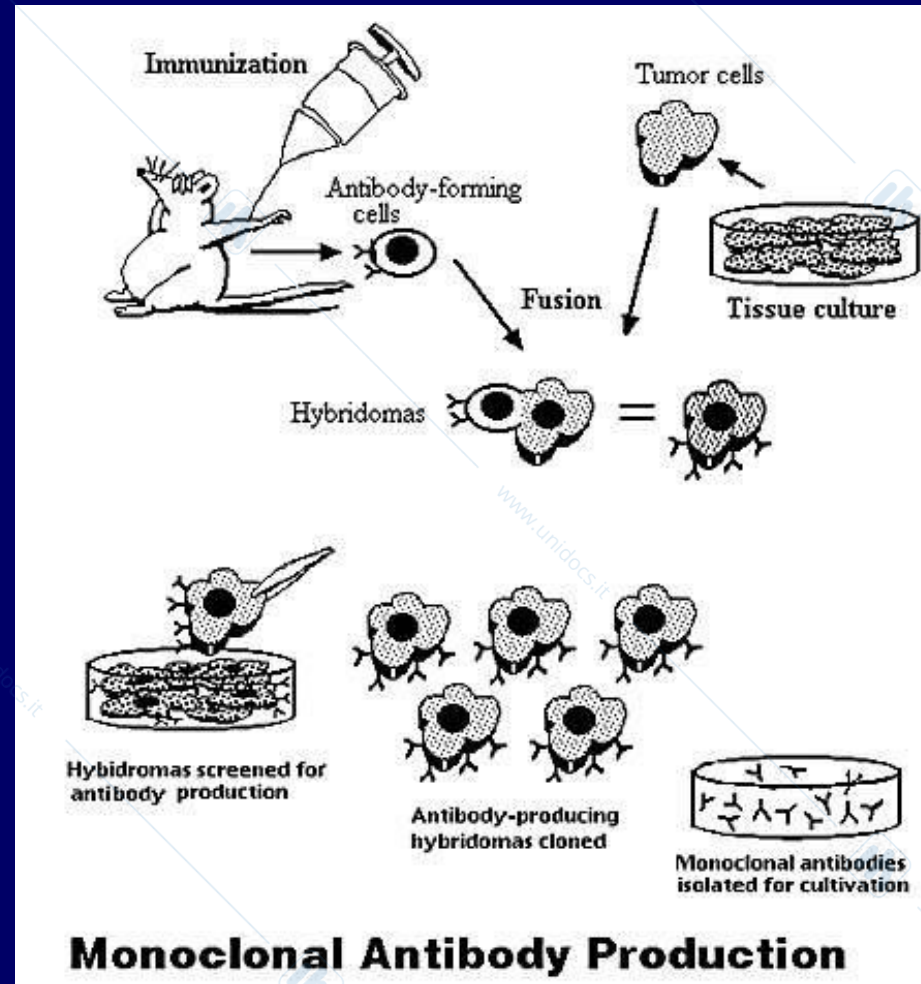
# Anticorpi policlonali

## Produzione

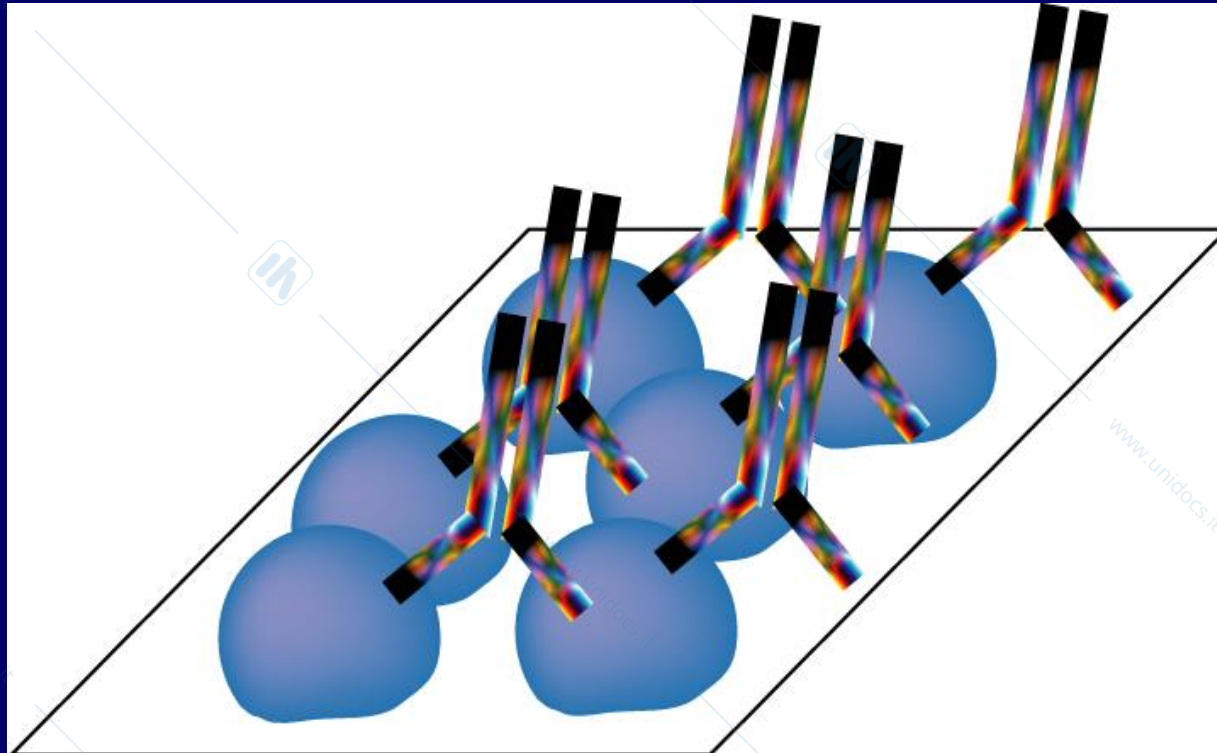
- Immunizzazione ripetuta dell'animale con l'antigene (peptide, proteina purificata o ricombinante)
- Il sangue e' prelevato nel momento di picco di produzione dell'anticorpo ed e' purificato il siero
- Il "pool" degli anticorpi riconosce molti epitopi dell'antigene usato per l'immunizzazione

# Anticorpi monoclonali

Riconoscono solo un epitopo

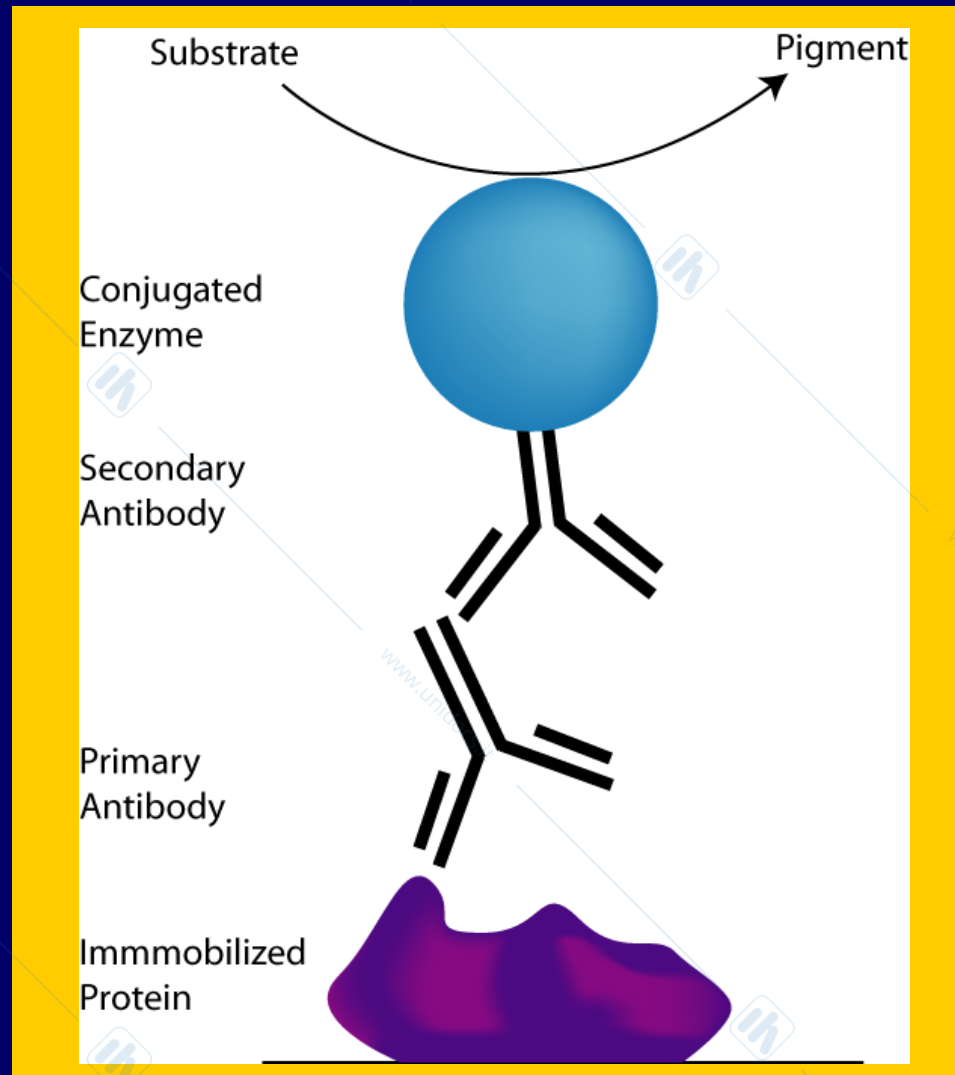


# Western blot: quarta fase incubazione con anticorpo primario

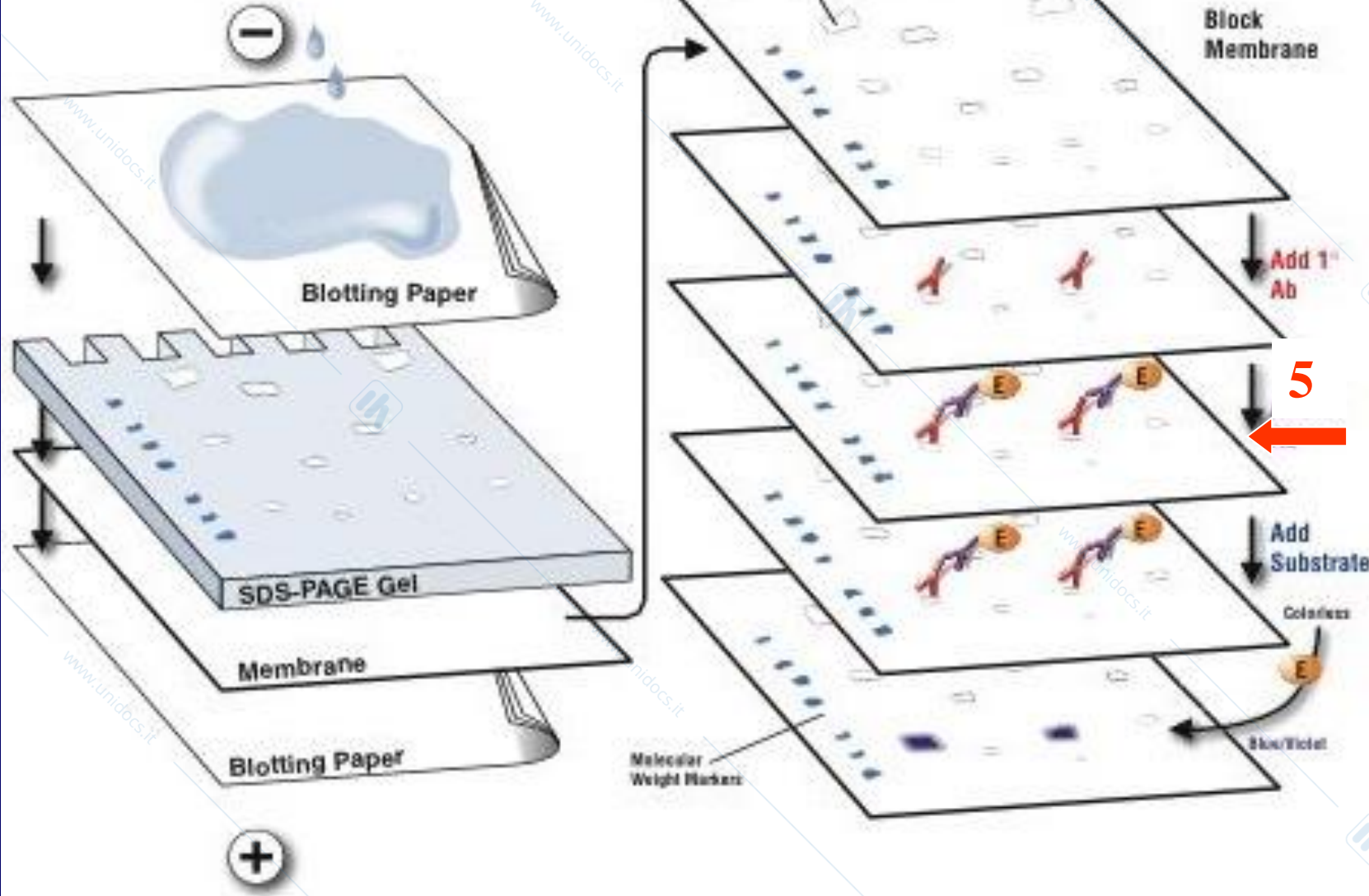


# Western blot: quinta fase

## Incubazione con anticorpo secondario



# Western Blotting



# Anticorpi

## ● Anticorpo primario

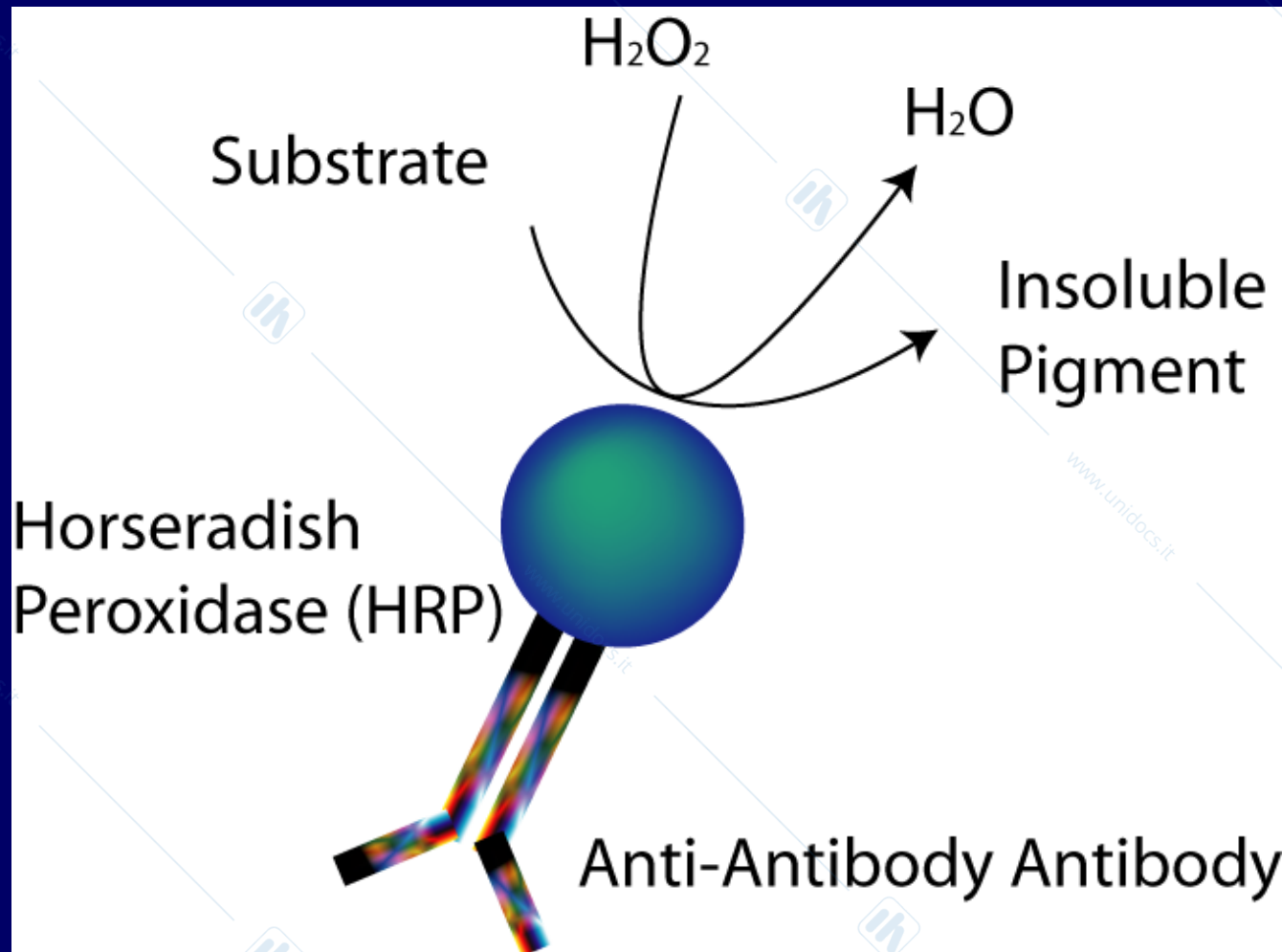
- Riconosce la proteina

## ● Anticorpo secondario

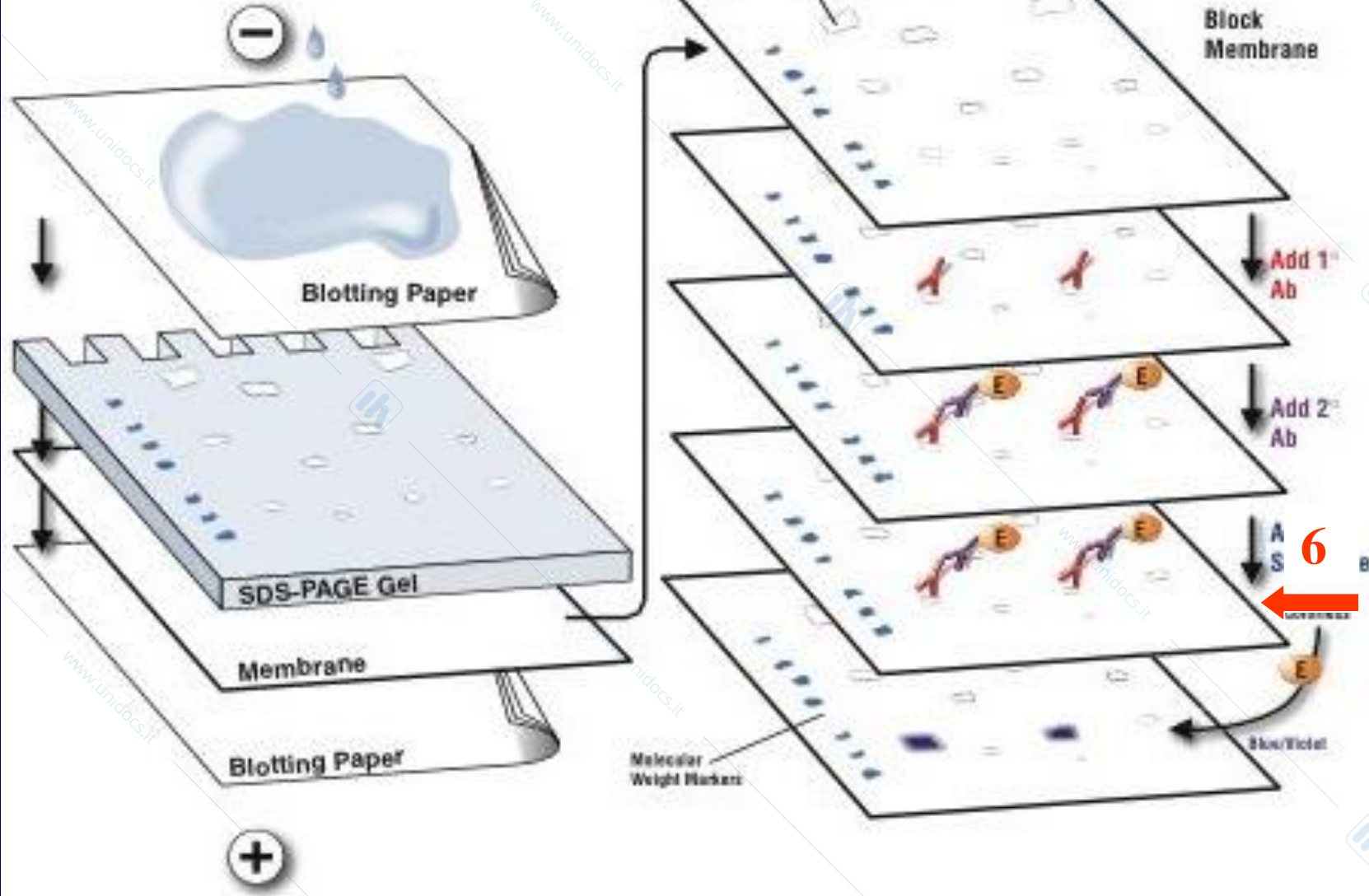
- Lega l'anticorpo primario
- Generalmente prodotto in una specie diversa
- Coniugato con un enzima
- Il substrato dell'enzima sarà convertito in un prodotto colorato
- Può anche essere radioattivo o fluorescente

# Western blot: quinta fase

## Incubazione con anticorpo secondario



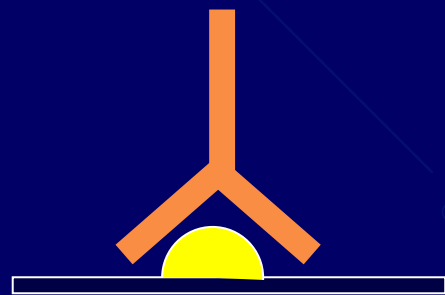
# Western Blotting



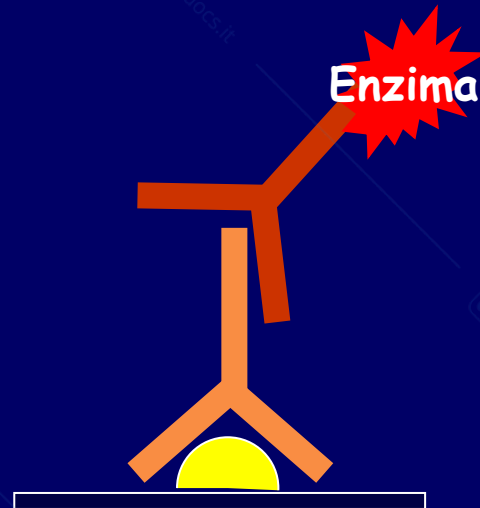
# Western blot: sesta fase rivelazione o “detection”

- Fosfatasi alcalina (AP) o perossidasi del rafano (HRP: horseradish peroxidase)
  - Conversione di un substrato colorimetrico in un precipitato colorato
- Substrati Chemiluminescenti
  - Emettono luce se convertiti dall'enzima
  - Possono essere visualizzati su lastre radiografiche
- Marcatura radioattiva
- Anticorpi secondari biotinilati

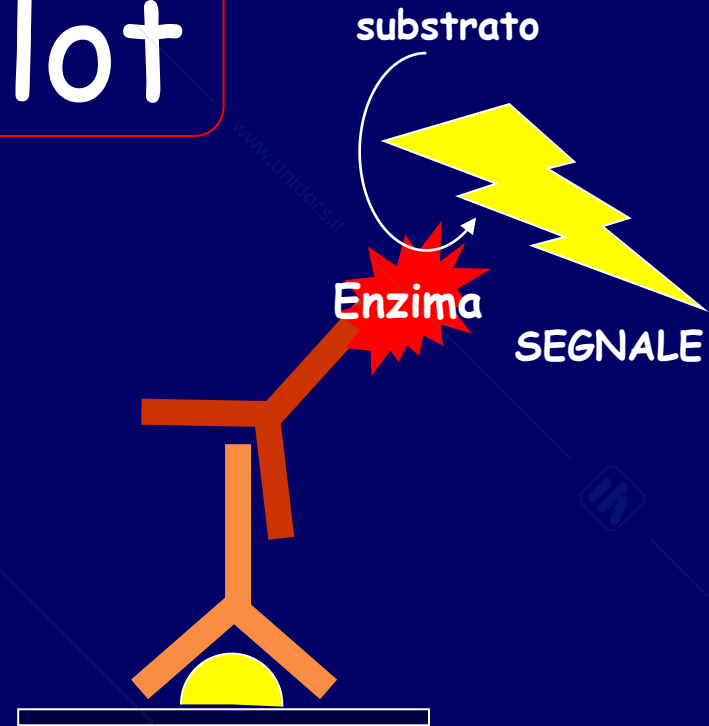
# Western blot



Anticorpo primario



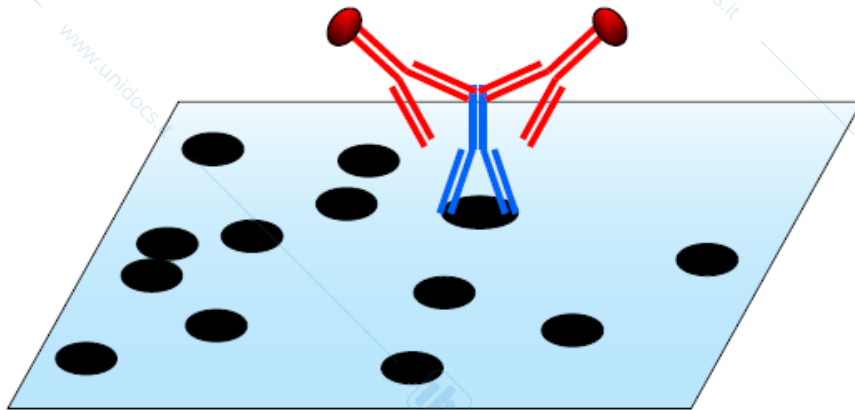
Anticorpo secondario



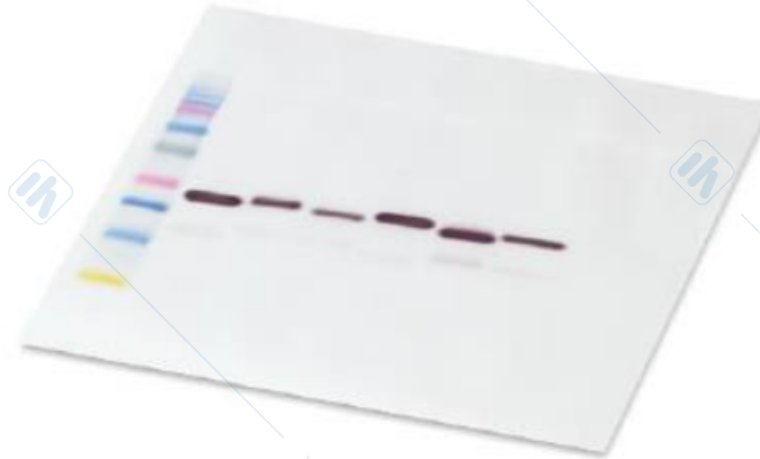
Rivelazione

**Il substrato metabolizzato dall'enzima emette un segnale rivelabile**

# RIVELAZIONE NEL WESTERN BLOTTING



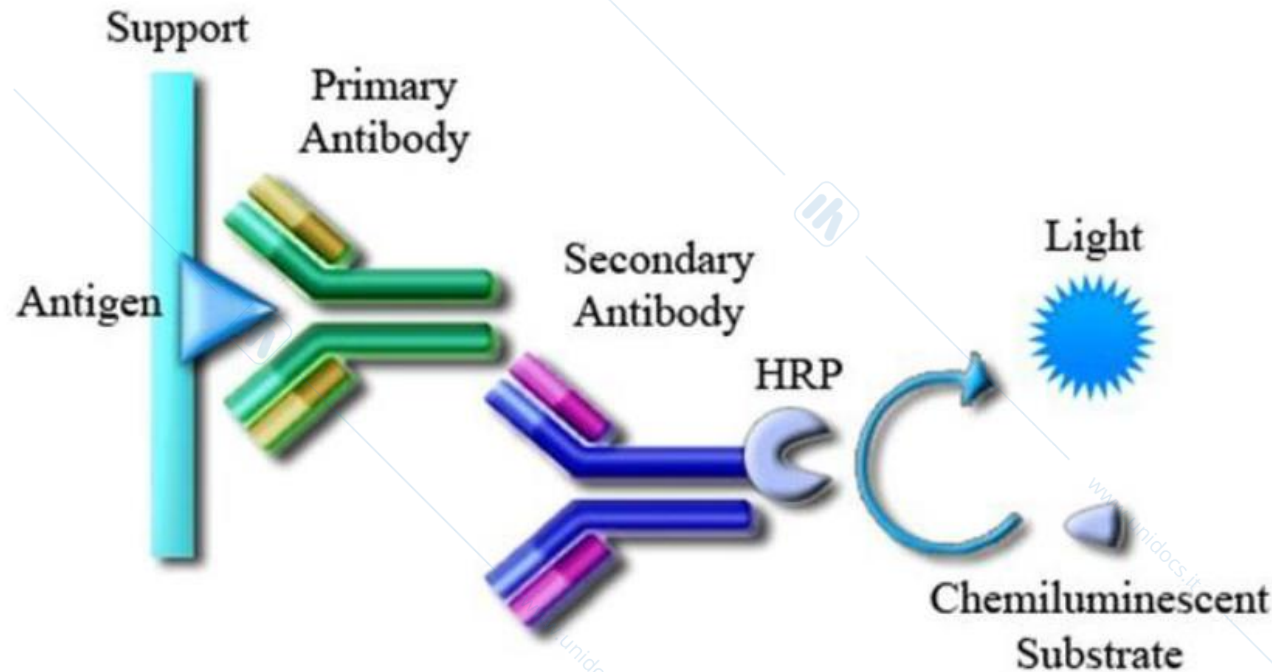
● **Perossidasi** = usando  $H_2O_2$  come substrato, **ossida** il **3-N-9-etilcarbazolo** a prodotto insolubile e **marrone**.



# ECL (Enhanced ChemiLuminescence)

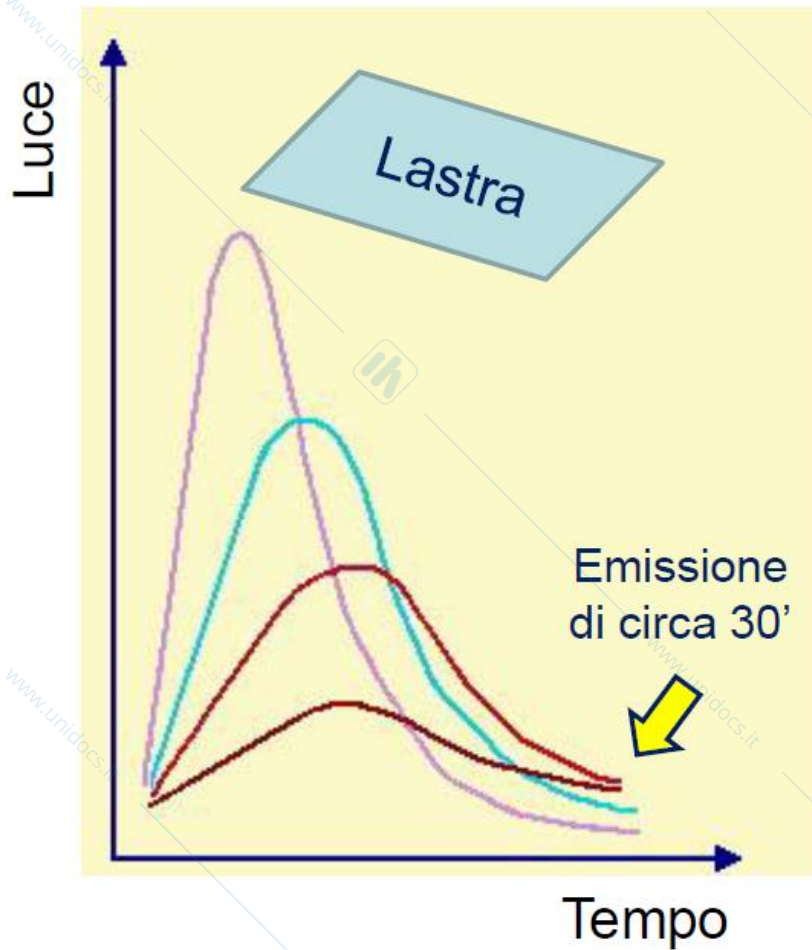
**Enzima** marcatore = Perossidasi (HRP)

Substrato = **Luminolo**



In presenza di perossidasi e  $H_2O_2$  il luminolo viene **ossidato**: si produce **luce**, la cui intensità può esser aumentata di 1000 volte con un intensificatore chimico.

# RIVELAZIONE NEL WESTERN BLOTTING



Il substrato metabolizzato dalla perossidasi **emette luce** che impressiona una lastra.



# ESPOSIZIONE DELLE LASTRE



**Dark room**

<http://www.theimageflow.com/wp-content/uploads/2013/07/darkroom940.jpg>



**Sviluppo e fissaggio**

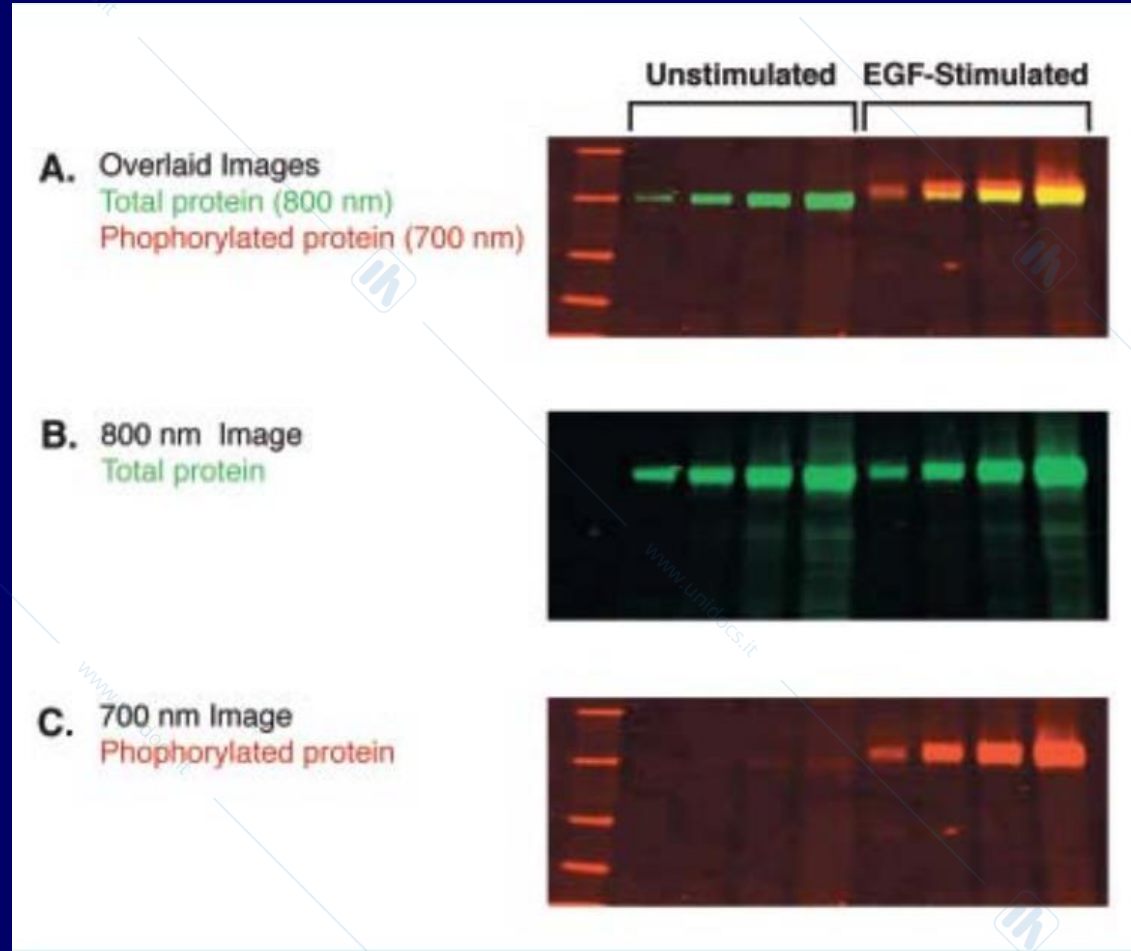
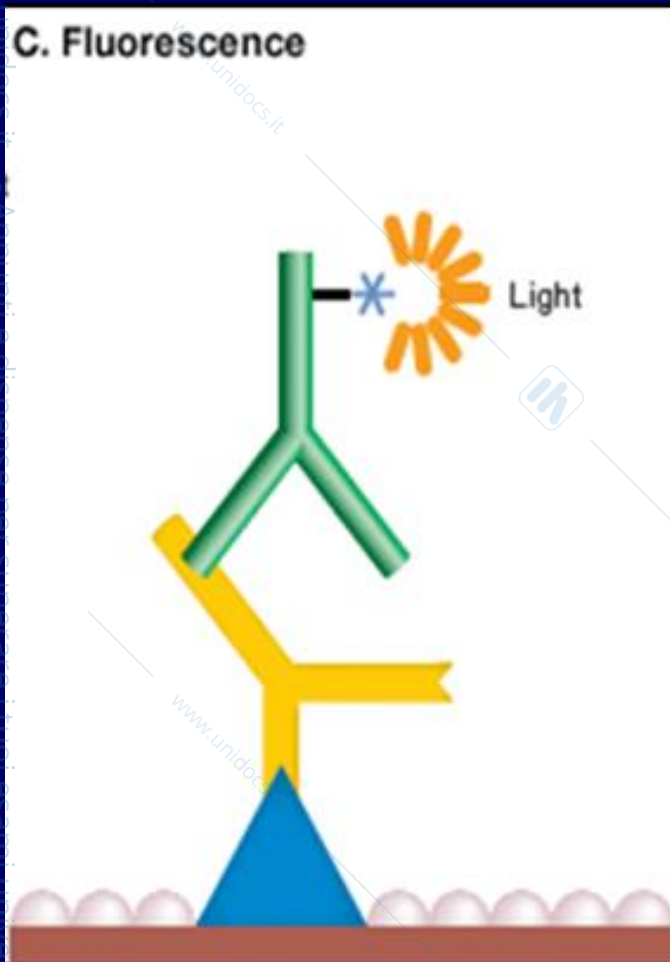
**Esposizione manuale**



**Sviluppatrice**

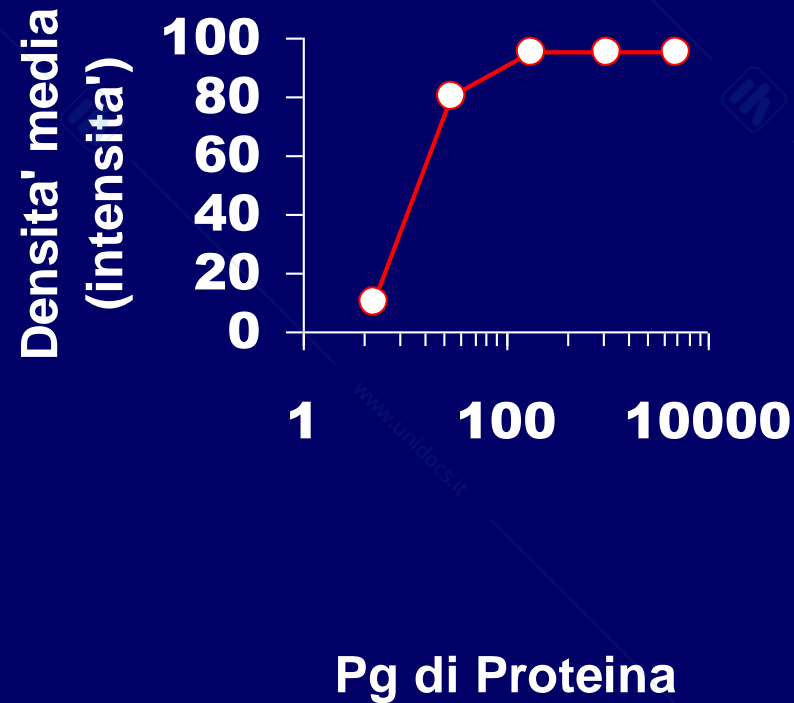
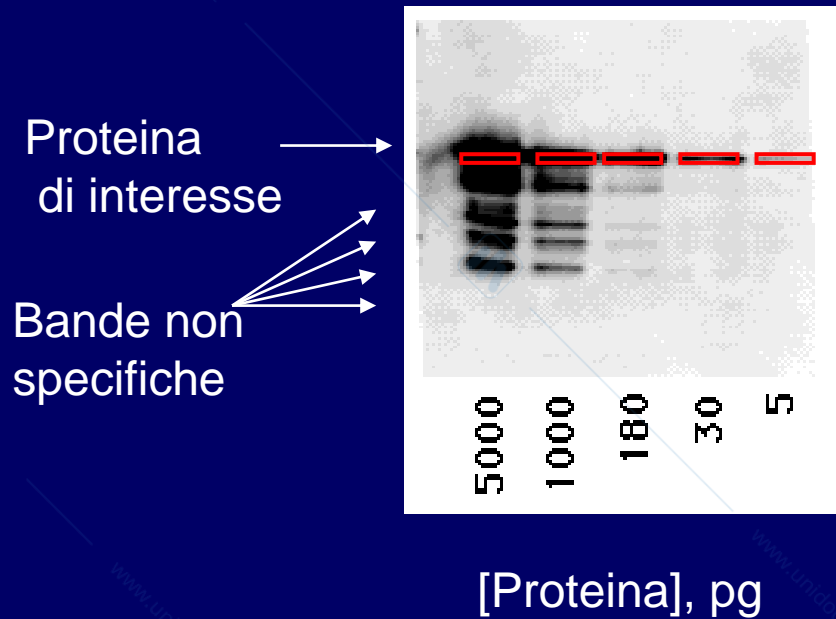


# Rivelazione western blot: Fluorescenza



# A cosa serve il Western Blot?

Quanta proteina di interesse c'è?



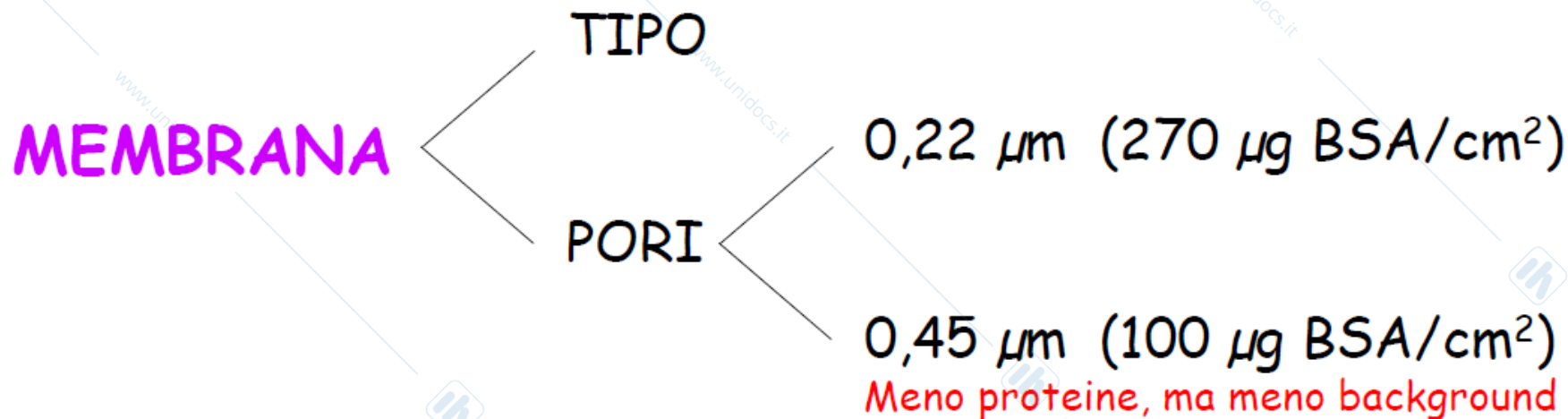
# OTTIMIZZARE UN WESTERN BLOT

## - TRASFERIMENTO -

**SDS** = agisce sulla proteina

**METANOLO** = agisce sulla membrana

## DURATA DEL BLOT

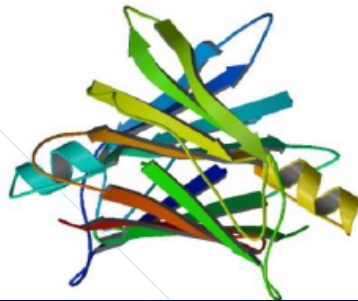


# COLLI DI BOTTIGLIA DI UN WB

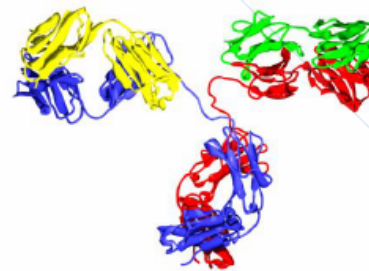
- Concentrazione delle proteine
- Rimozione contaminanti

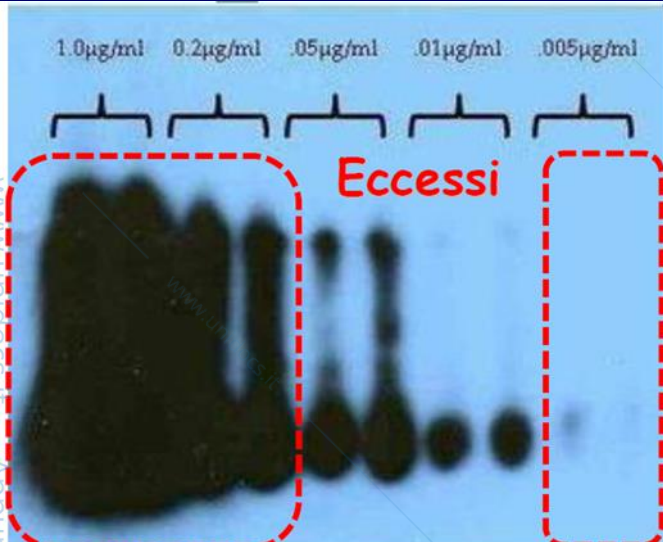
Cosa limita un WB?

Quantità e qualità del campione

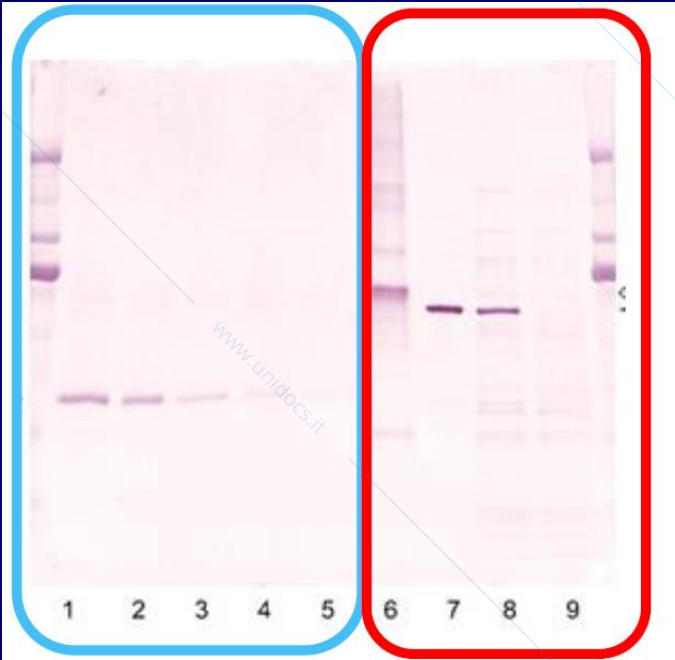


Qualità e quantità dell'anticorpo





# OTTIMIZZAZIONE DEGLI ANTICORPI

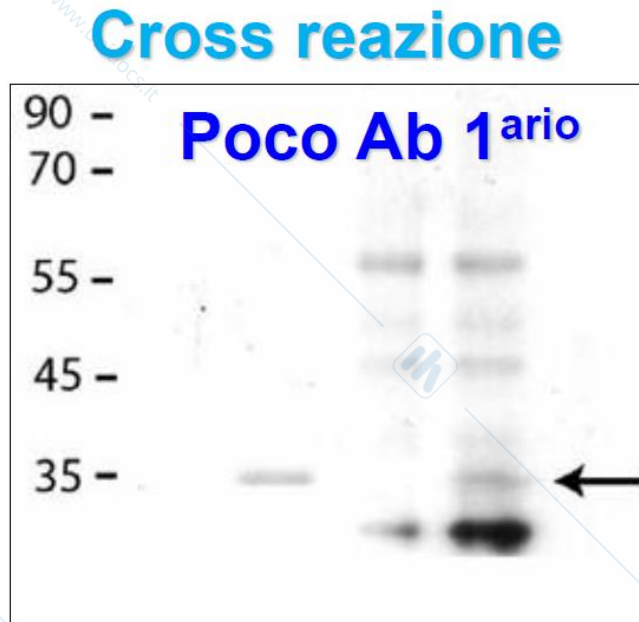


**Buono** **Migliorabile**



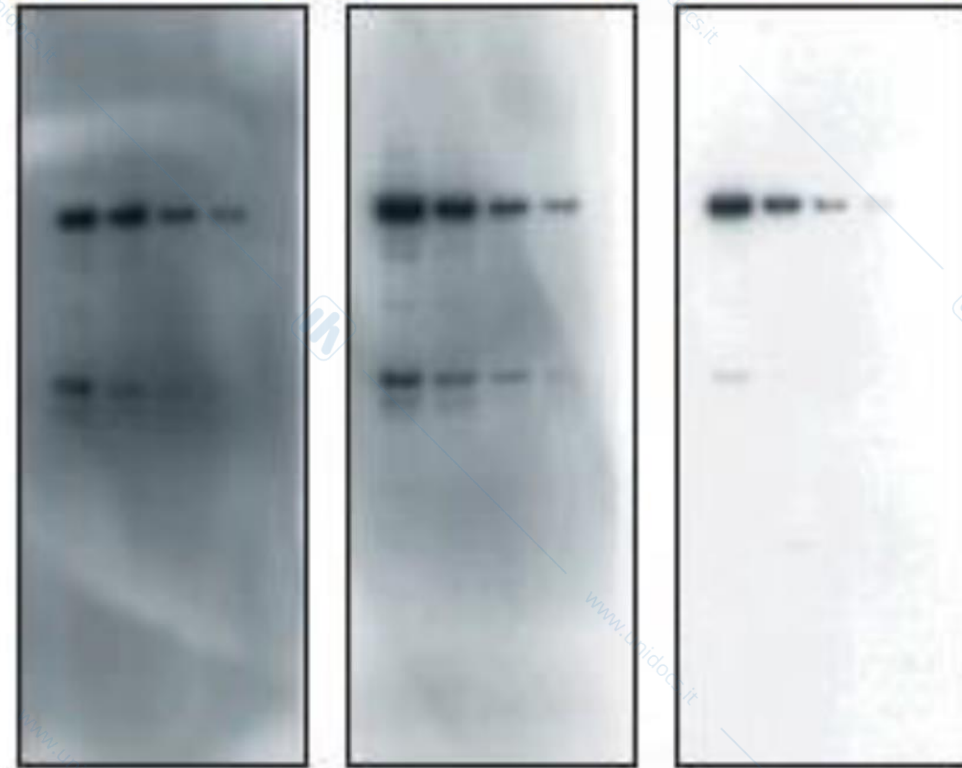
**Tutto da rifare!**

# OTTIMIZZAZIONE DEGLI ANTICORPI



**Ag frammentato**

Ab 2<sup>ario</sup> 1/100      Ab 2<sup>ario</sup> 1/300      Ab 2<sup>ario</sup> 1/1000



**ECCESSO DI Ab 2<sup>ario</sup>**

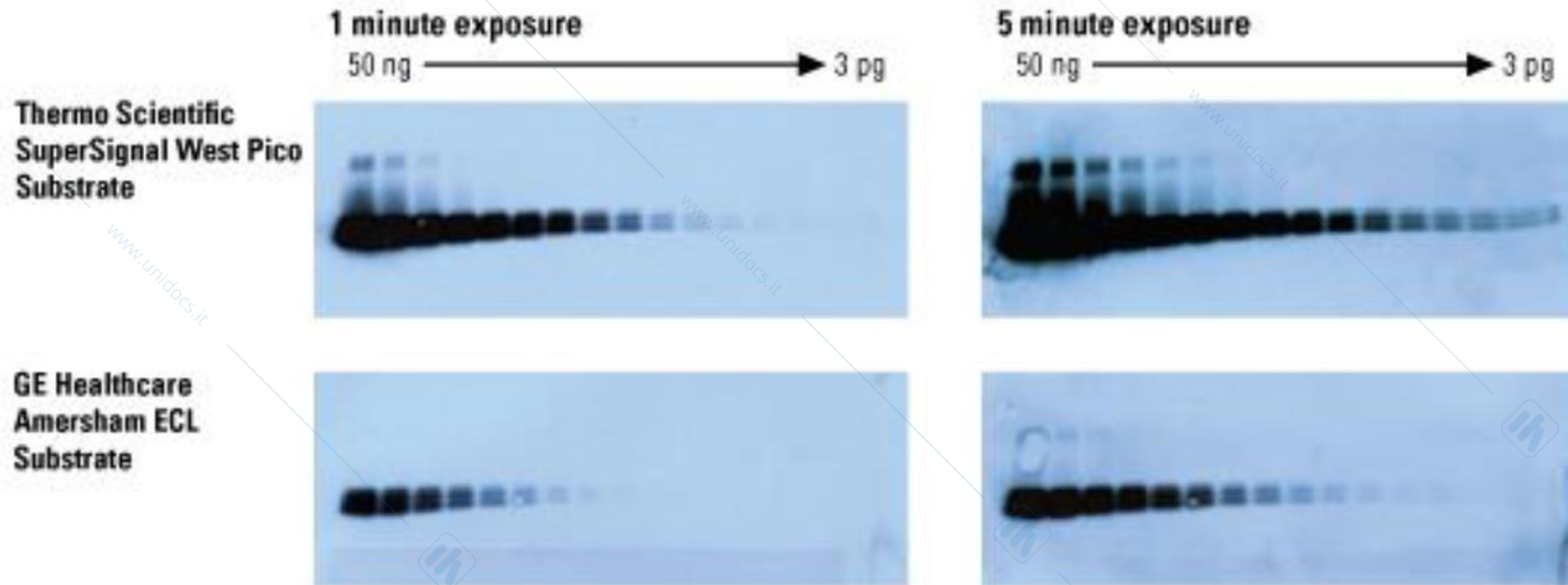
# OTTIMIZZAZIONE DELLA RILEVAZIONE

## TEMPI DI ESPOSIZIONE



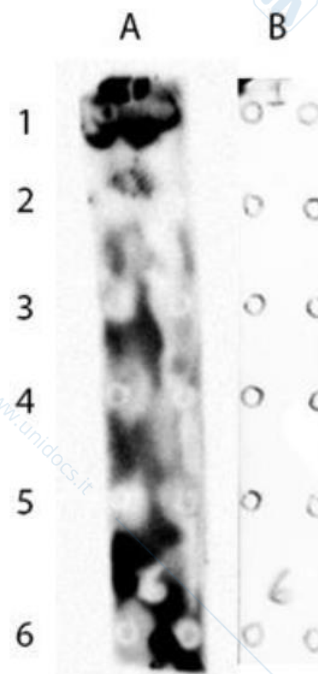
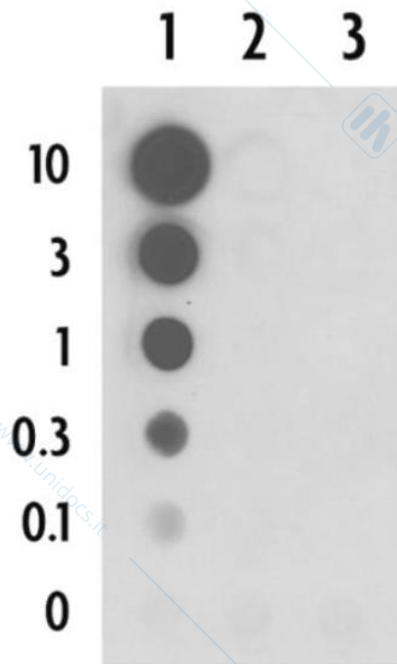
## SOSTITUIRE L'ENZIMA CONIUGATO ALL' Ab

## SUBSTRATI CON SENSIBILITA' DIVERSA



# DOT BLOT

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



1 A) 60 ng ApoCIII

2 A) 30 ng ApoCIII

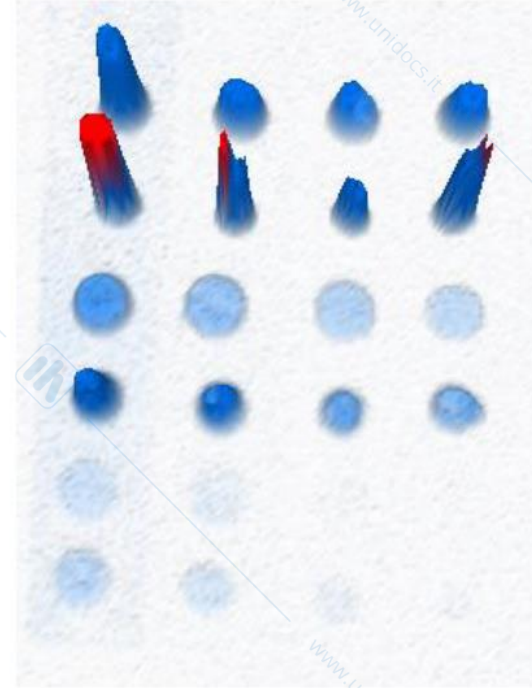
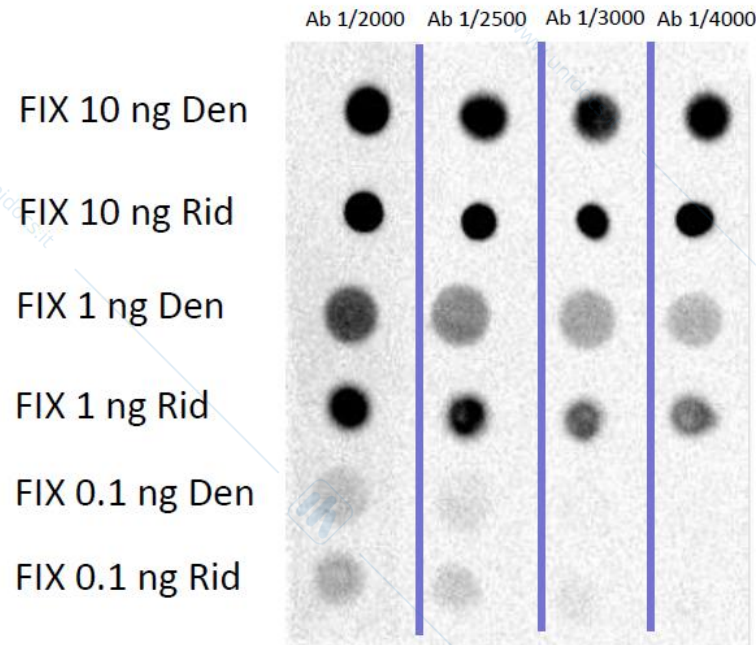
3 A) 10 ng ApoCIII

4 A) 1 ng ApoCIII

5 A) 0.1 ng ApoCIII

6 A) 60 ng BSA

# DOT BLOT



## SVANTAGGI

Riconoscimento e legame più difficili.

## VANTAGGI

- Rapidità e semplicità di esecuzione.
- Non c'è perdita di campione.