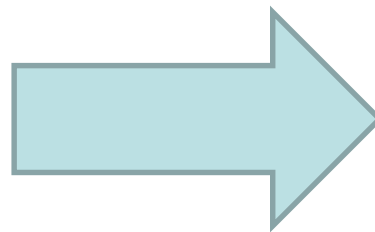
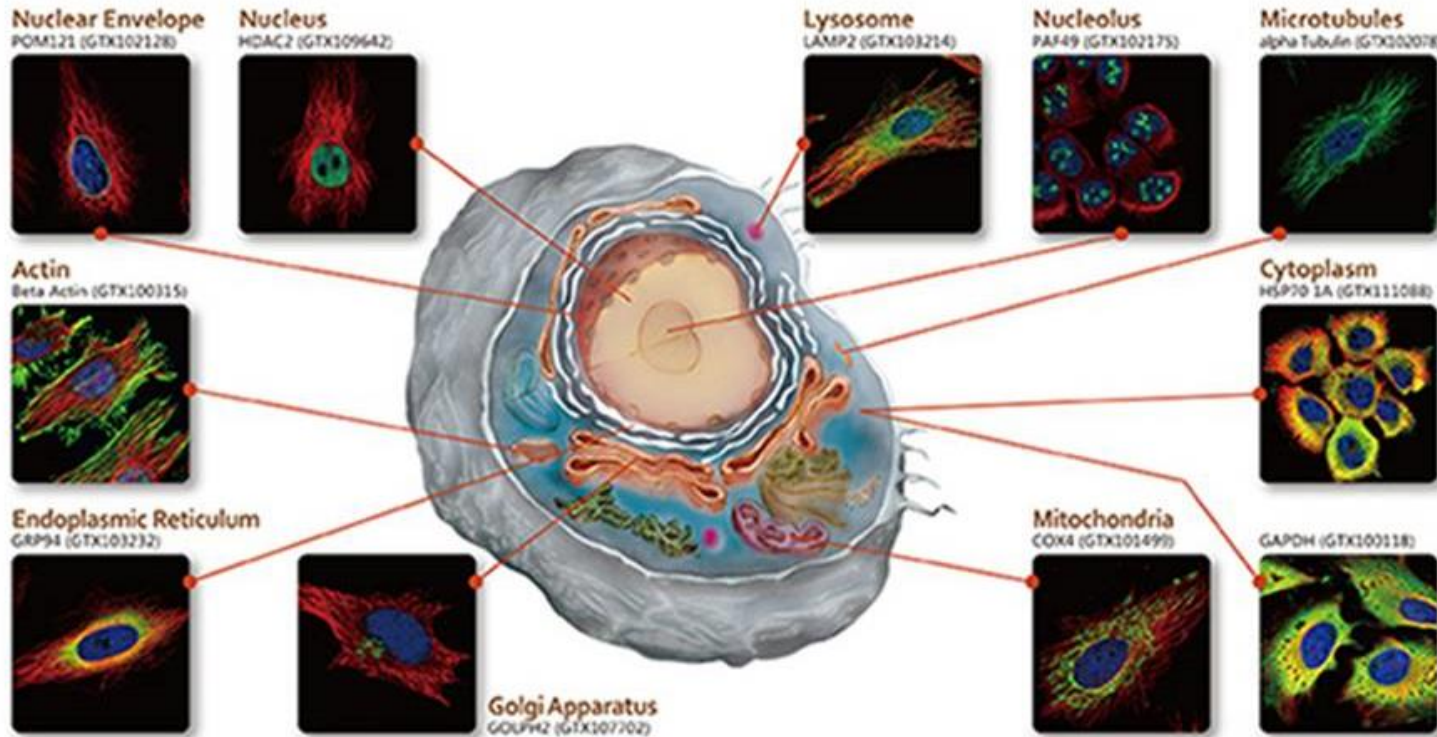
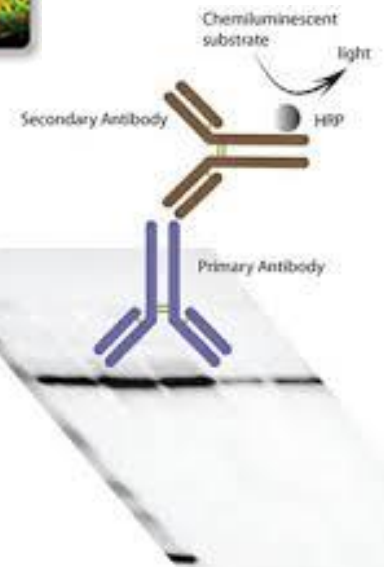


Perché fare un Western Blotting?



60 kDa

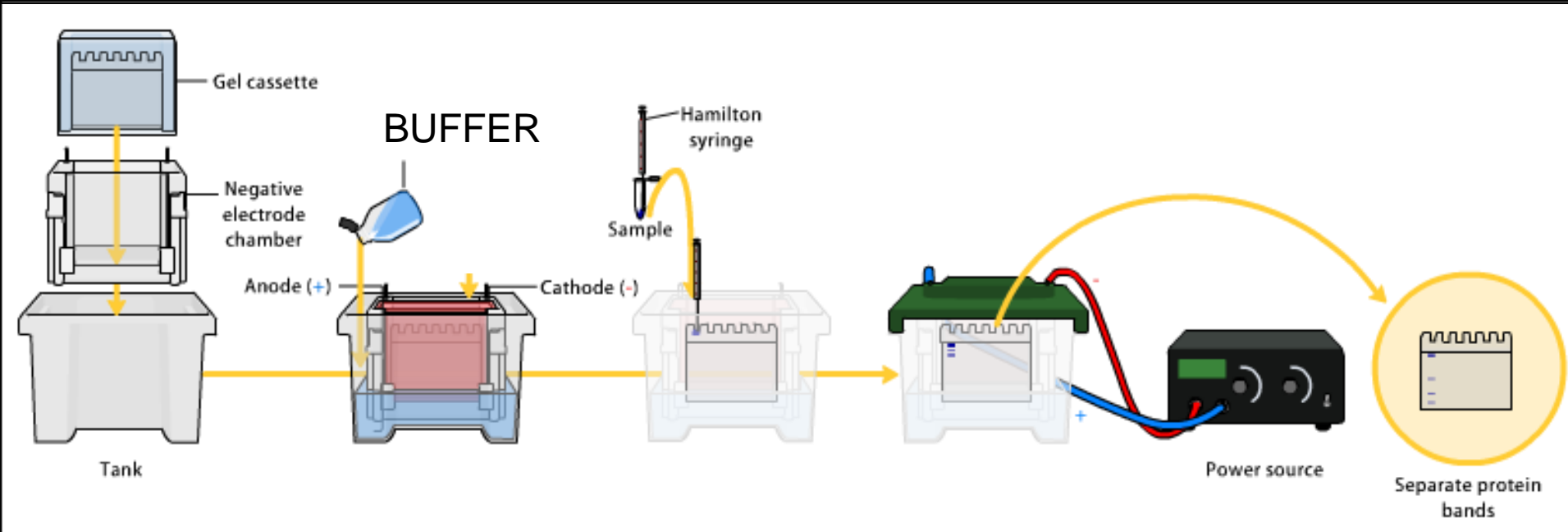
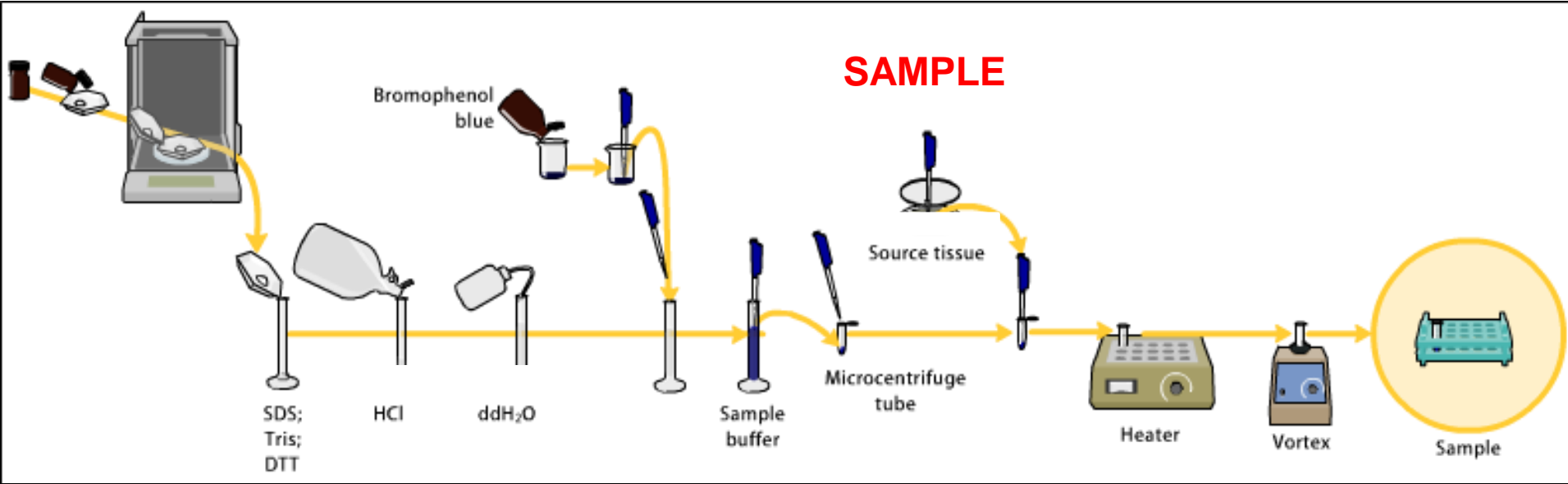


FILMATO
sul WB
classico

EVOLUZIONE DEL WESTERN BLOTTING

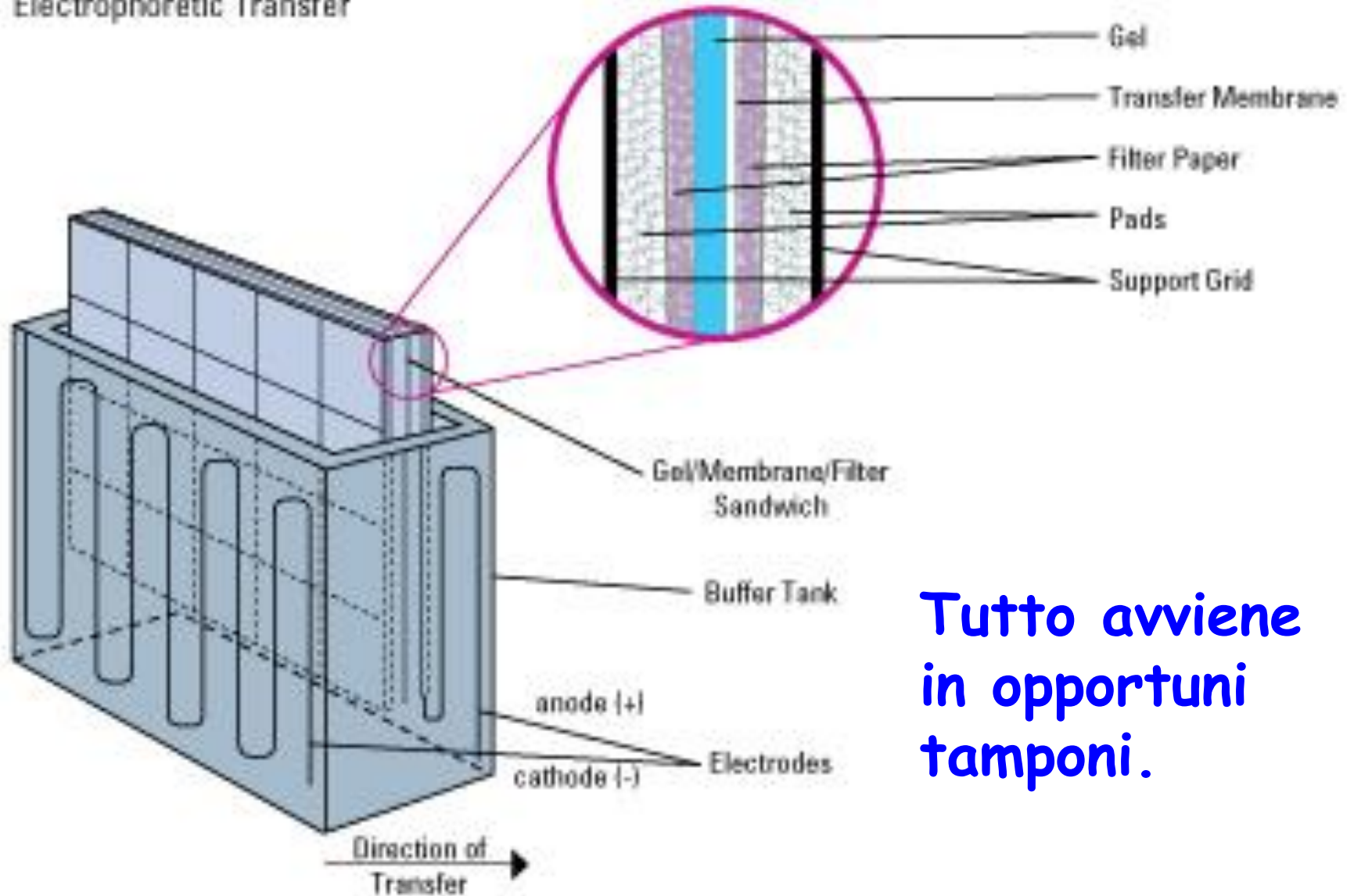
Western Blotting (1979-2008)

FASI INVARIATE



Western Blotting

Electrophoretic Transfer



**Tutto avviene
in opportuni
tamponi.**

Buffers

Tampone di corsa:

| | |
|----------------|---------------|
| Tris | 25 mM |
| SDS | 3.5 mM |
| Glicina | 190 mM |

**Tampone di
trasferimento:**

| | |
|-----------------|---------------|
| Tris | 25 mM |
| SDS | 0,1 % |
| Glicina | 190 mM |
| Metanolo | 20 % |



Rilevazione



Luminolo



Lastre fotografiche



Esposizione delle lastre in camera oscura

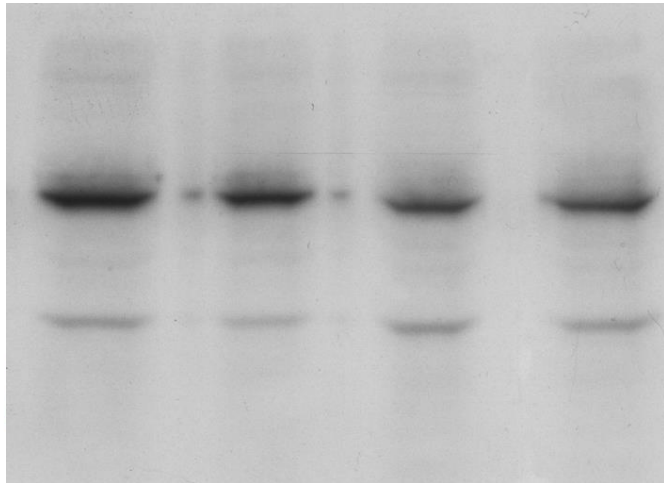


Sviluppo e fissaggio



Western Blotting classico

Due giorni
di lavoro



Massimizzare l'efficienza
di rivelazione



Fasi economiche

Variazioni del Western Blotting

Trasferimento con nuovi sistemi per aumentare sensibilità e ridurre i tempi di lavoro.



Sistemi per velocizzare Blocking e incubazioni anticorpali.



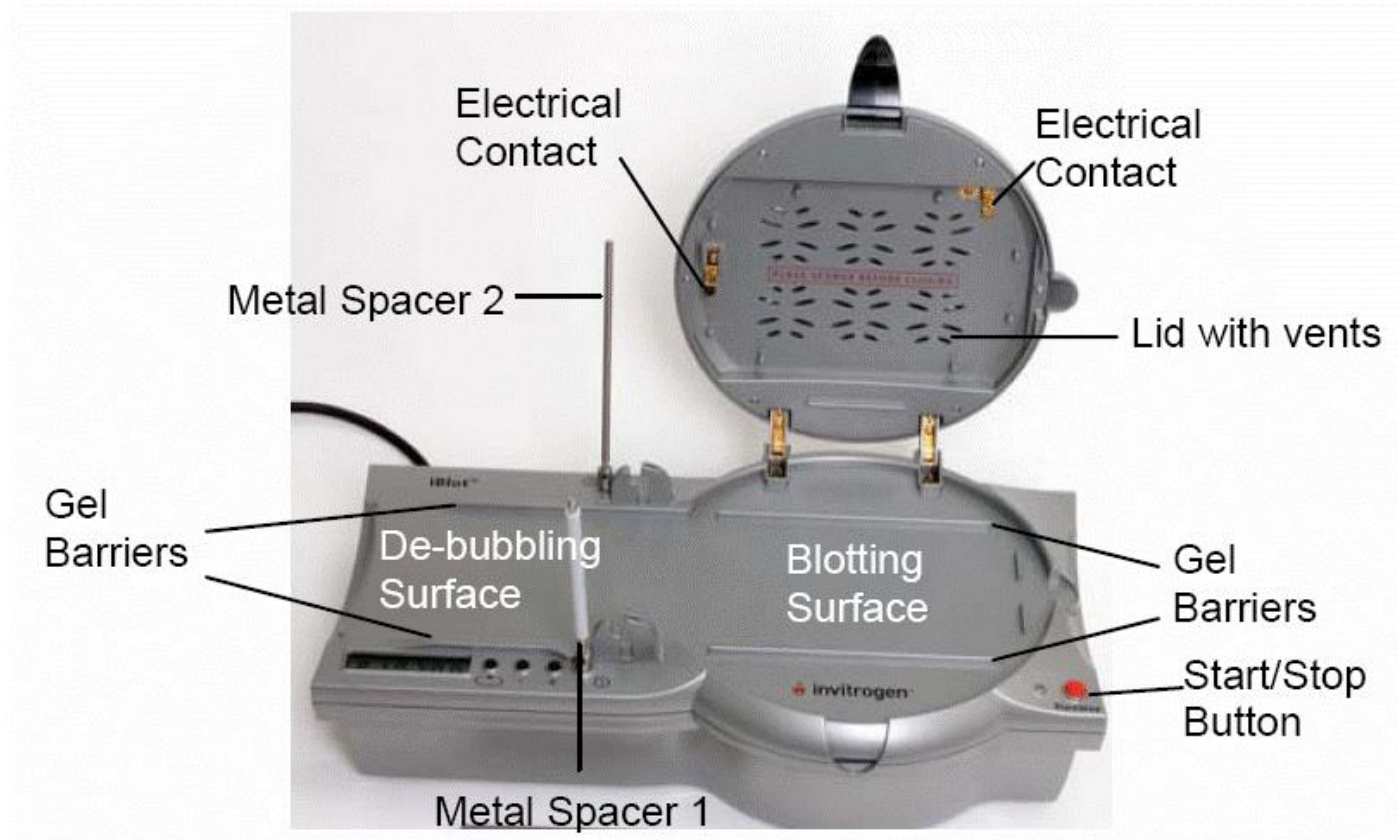
Anticorpi marcati con **cianine** (emissione in fluorescenza) anziché enzimi.

Rilevazione con sistemi di acquisizione **digitale** delle immagini.



Ciò permette di **abbandonare la camera oscura.**

TRASFERIMENTO con iBlot dry blotting system



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

Funzionamento

FILMATO

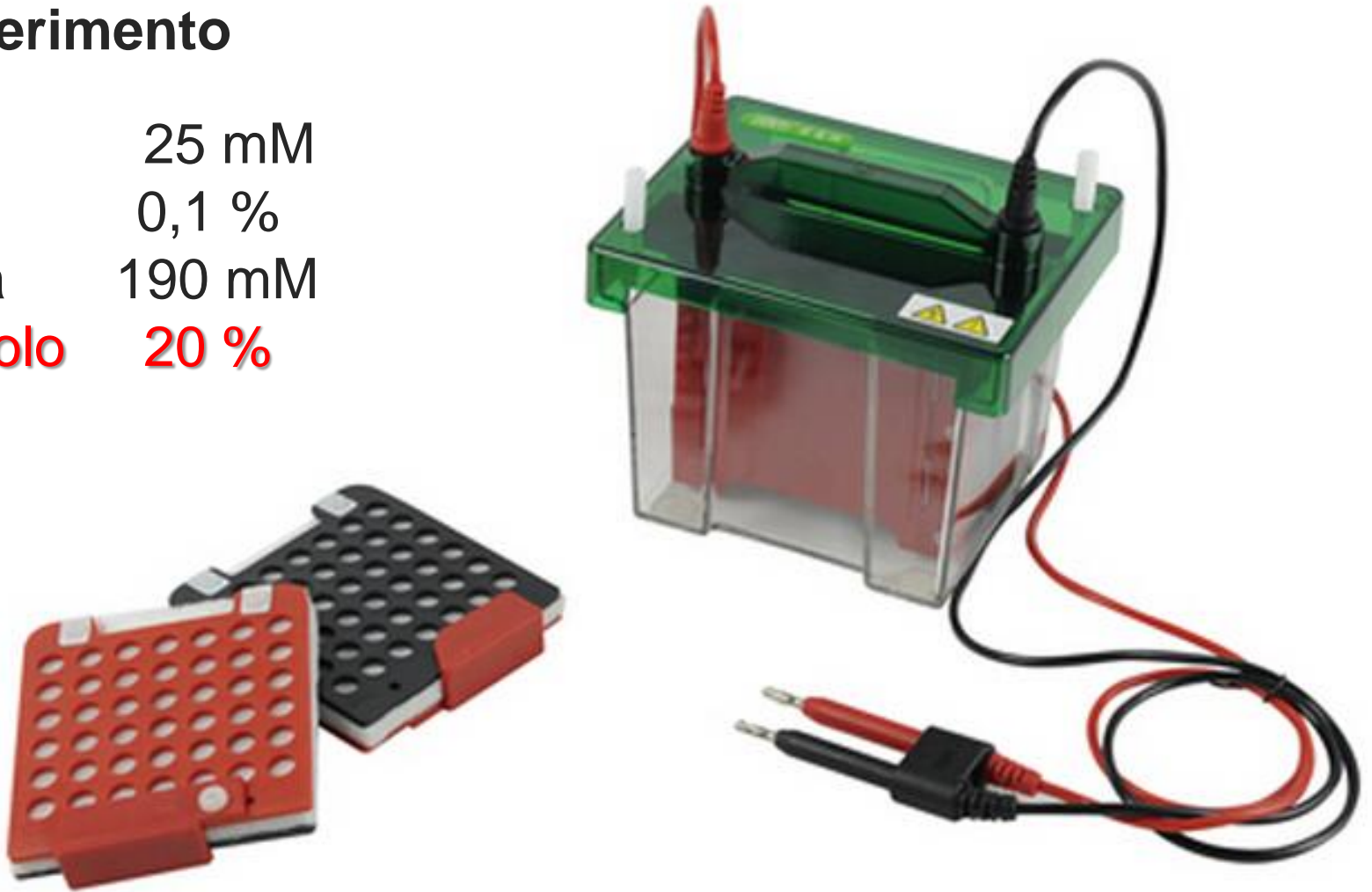
IBLOT

<http://www.youtube.com/watch?v=WXvwe1n3ZYY&feature=related>

Dal sistema classico...

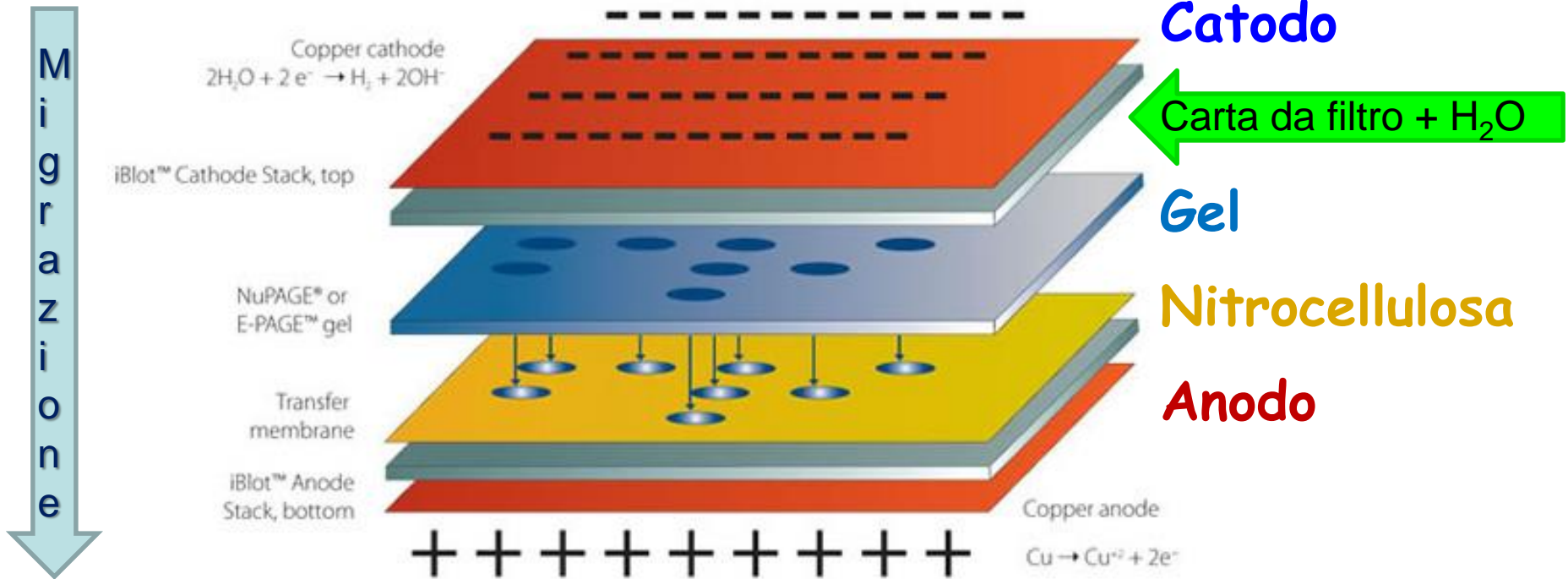
Tampone di trasferimento

| | |
|-----------------|-------------|
| Tris | 25 mM |
| SDS | 0,1 % |
| Glicina | 190 mM |
| Metanolo | 20 % |



...all'iBlot dry blotting system

ASSENZA DI TAMPONI

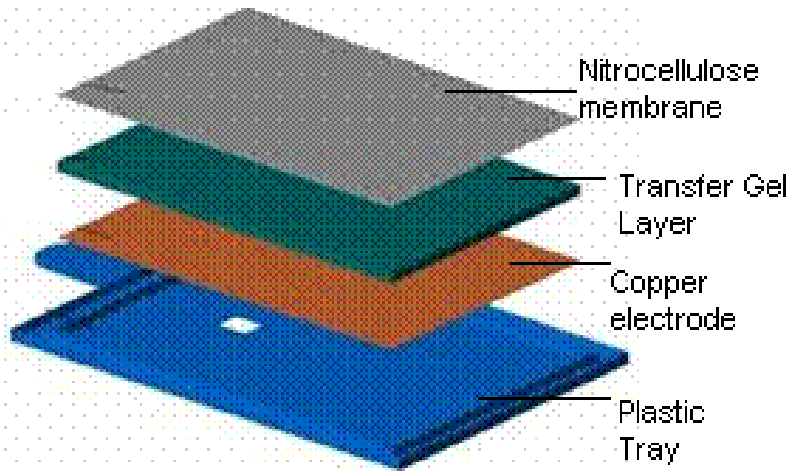


BASATO SEMPRE SU UNA ELETTROFORESI

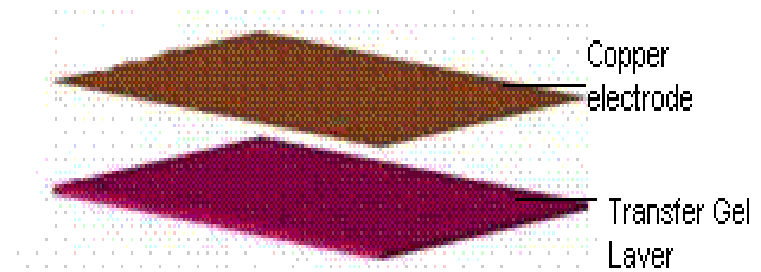
Anodo iBlot

Contiene un elettrodo di **rame**, un **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 **Transfer Gel**.

Il filtro di carta?

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

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 molto economico.
- Utilizzabile anche nelle fasi successive del WB.

DIFETTI

- **Costi** elevati dei consumabili.
- Poco efficiente con proteine ad **alto PM**.

Trans Blot turbo



Turbo Transfers



Intuitive Interface

System Flexibility



Ready-to-use
Prepacked
Consumables



High Throughput



Superior Transfer Efficiency



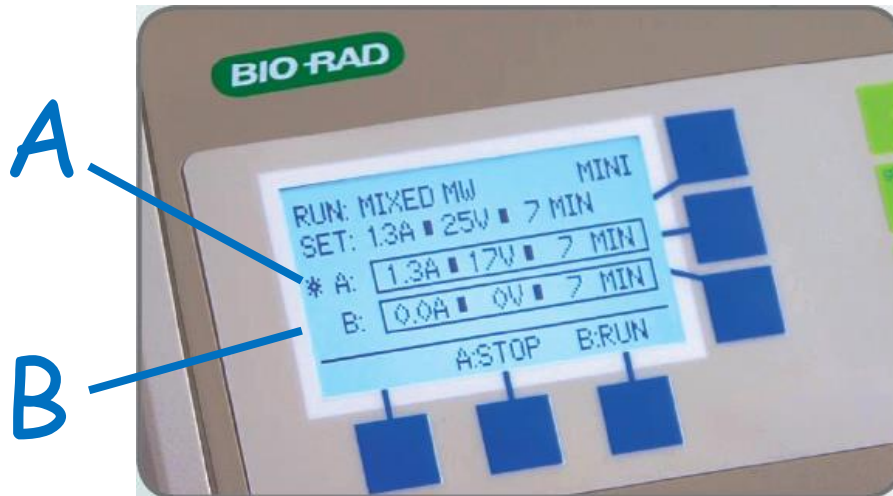
Trans Blot turbo

Caratteristiche principali



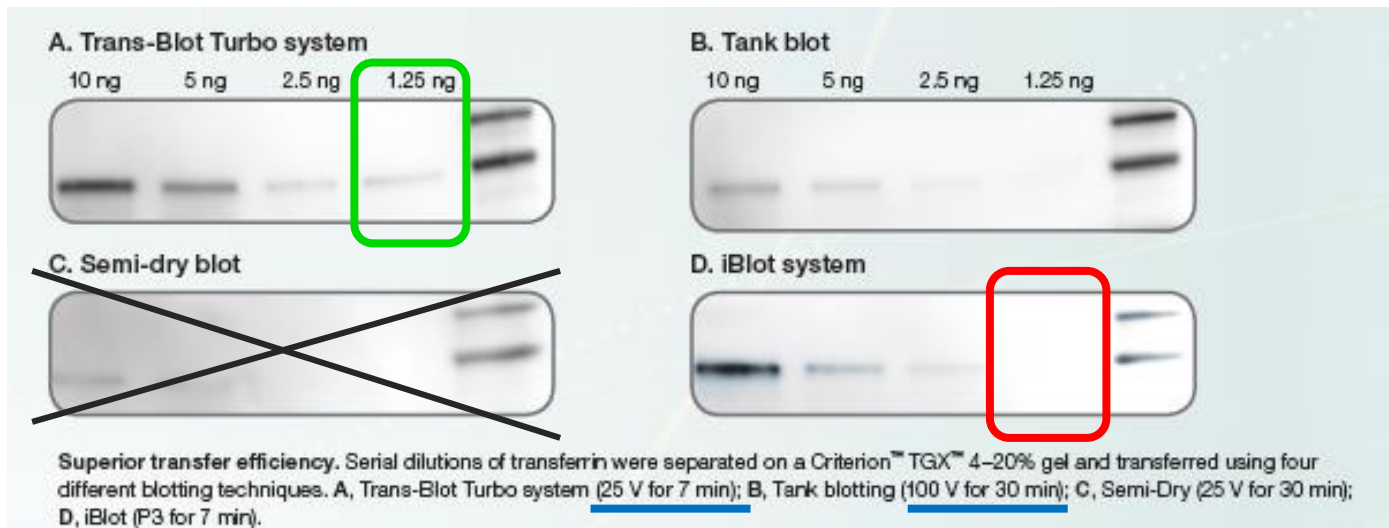
Sistema ultrarapido (3'-10') per il trasferimento di proteine da gel a membrane, in assenza di metanolo.

Trans Blot turbo - Prestazioni



Possibilità di effettuare 2 trasferimenti sfasati nel tempo.

Diluizioni seriali di Transferrina caricate su gel 4-20%



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



Sistema rapidissimo (22 minuti!) per il **Blocking** e le **incubazioni anticorpali**.

Funzionamento dello SNAP

FILMATO



SNAP

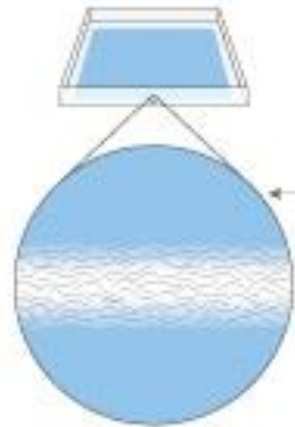
Tempistiche

| | SISTEMA CLASSICO | SNAP |
|------------------------|------------------|-------------------|
| Saturazione (Blocking) | 1-8h | 20 secondi |
| Ab 1ario | 1 h | 10 min |
| Lavaggio | 20 min | 1 min |
| Ab 2ario | 1 h | 10 min |
| Lavaggio | 20 min | 1 min |
| | Max 10 h | Max 30 min |

Funzionamento dello SNAP

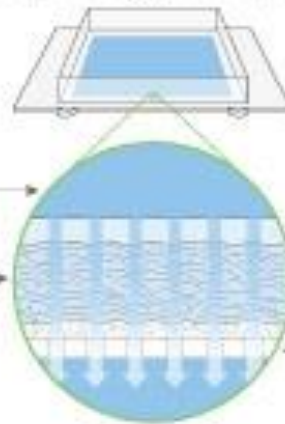
Fase di Blocking

TRADITIONAL WESTERN BLOT
(Passive reagent transport)



DIFFUSION

SNAP i.d. System
(Active reagent transport)



VACUUM

REAGENT

MEMBRANE

FLOW
DISTRIBUTOR

SPACER

BLOT HOLDER

Standard Western Blot

5% NFDM (Nonfat Dry Milk)

1 2 3 4 5 6 7 8

A

%p/V

SNAP i.d. Protein
Detection System

0.5% NFDM

1 2 3 4 5 6 7 8

B

0.1% NFDM

1 2 3 4 5 6 7 8

C

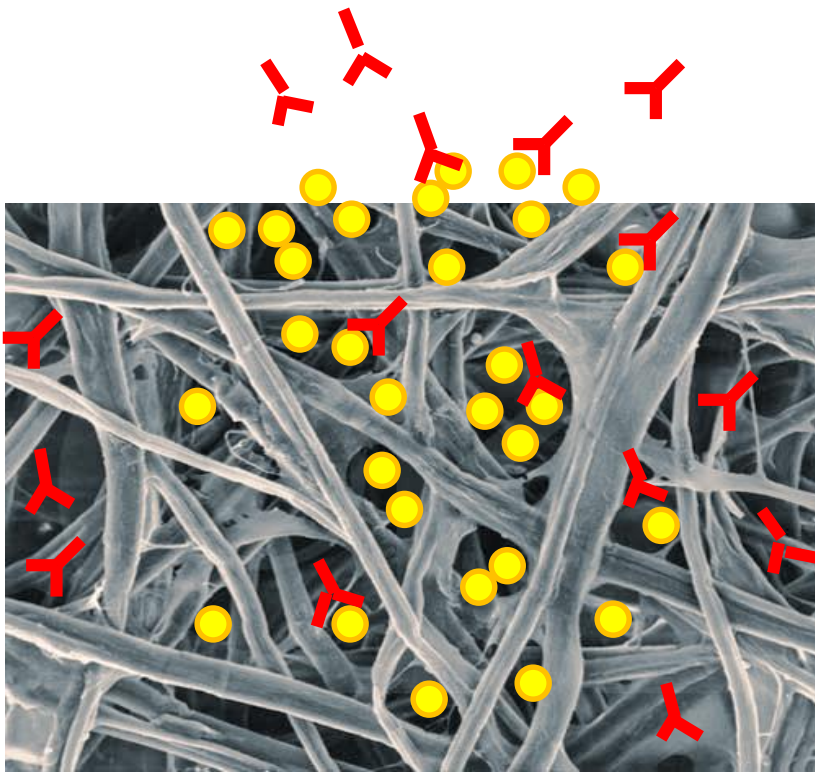
0.05% NFDM

1 2 3 4 5 6 7 8

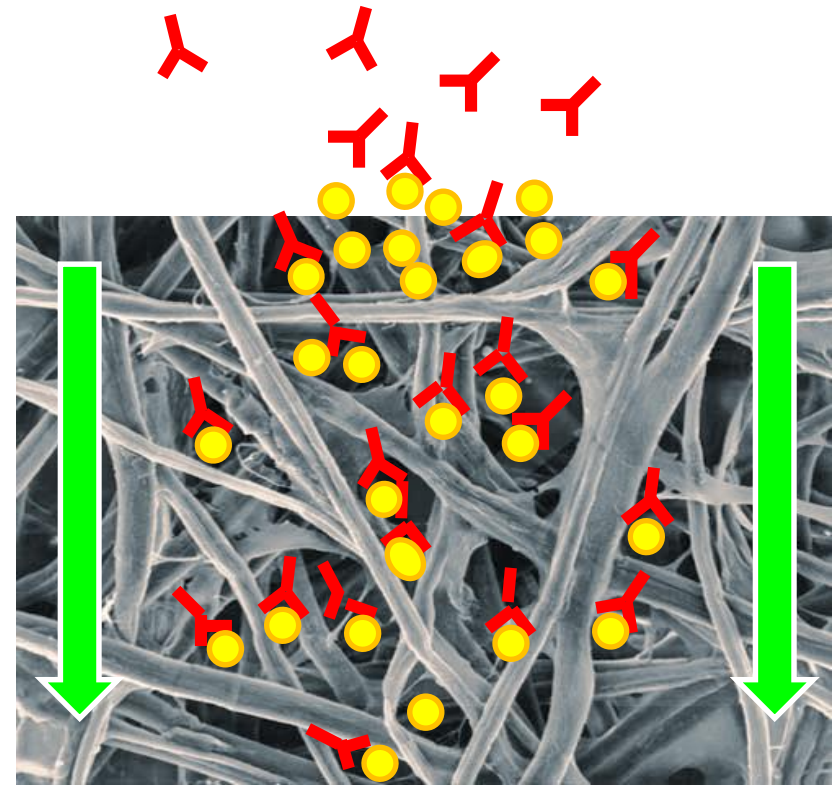
D

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

SNAP e incubazioni anticorpali



Nel Western **tradizionale** la membrana è sottoposta a fasi di **diffusione**.



Lo **SNAP** aumenta l'esposizione delle proteine intrappolate nella membrana

SNAP

Strumentazione

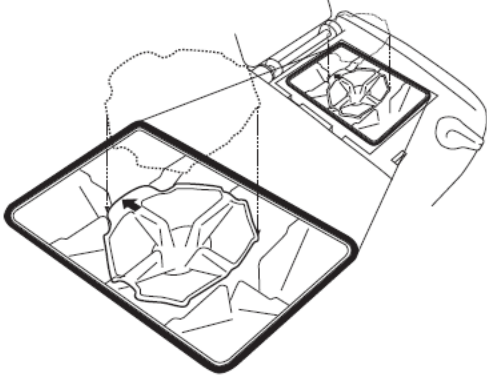


Basato su un
semplice
sistema di
aspirazione.

SNAP

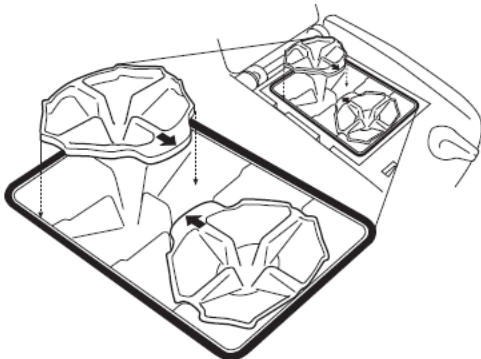
Strumentazione

Position of antibody tray
for single well blot holder:



Tab faces the back of the system

Position of antibody trays
for double well blot holder:



Tabs face each other



Vassoio per il
recupero degli
anticorpi.

Come avrà risposto la concorrenza?

2°

FILMATO

IBLOT

<http://www.youtube.com/watch?v=NI7ly7Wm73w>

iBlot 2

Do not use iBlot® Transfer Stacks in the **iBlot® 2** Gel Transfer Device, and do not mix components between iBlot® Transfer Stacks and iBlot® 2 Transfer Stacks.



Caratteristica comune di tutti questi strumenti?



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.

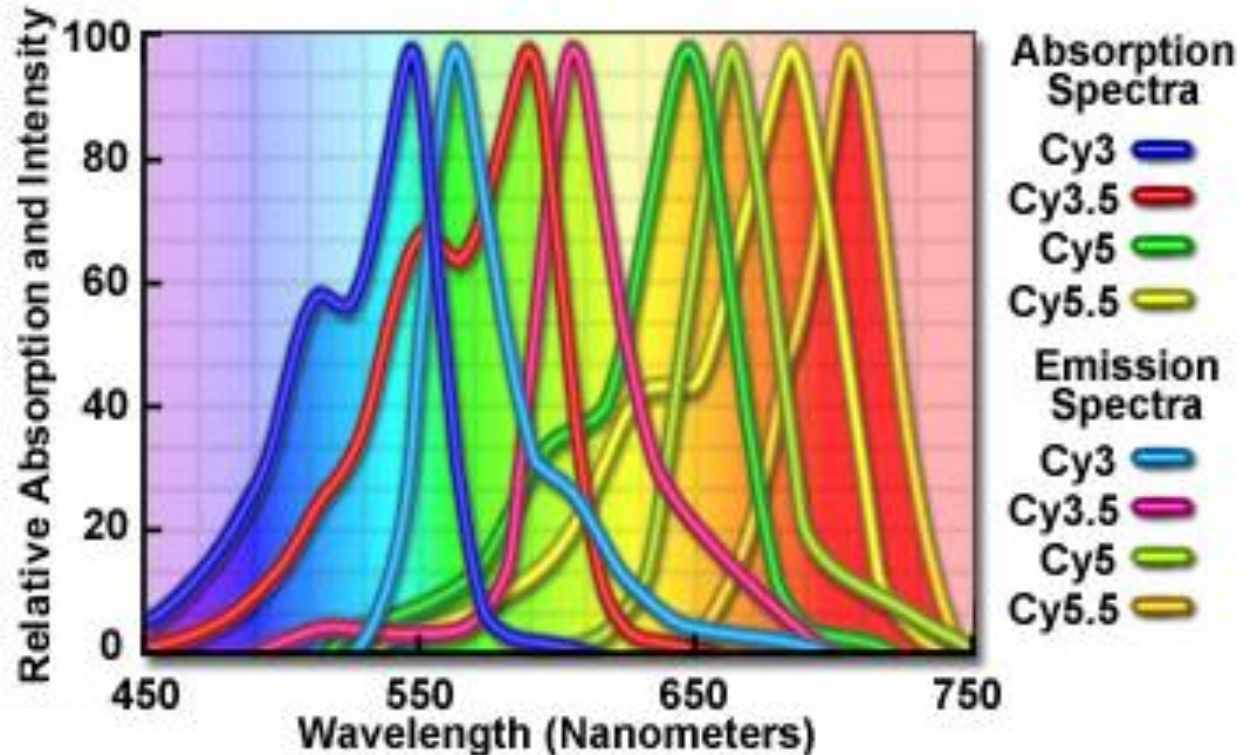
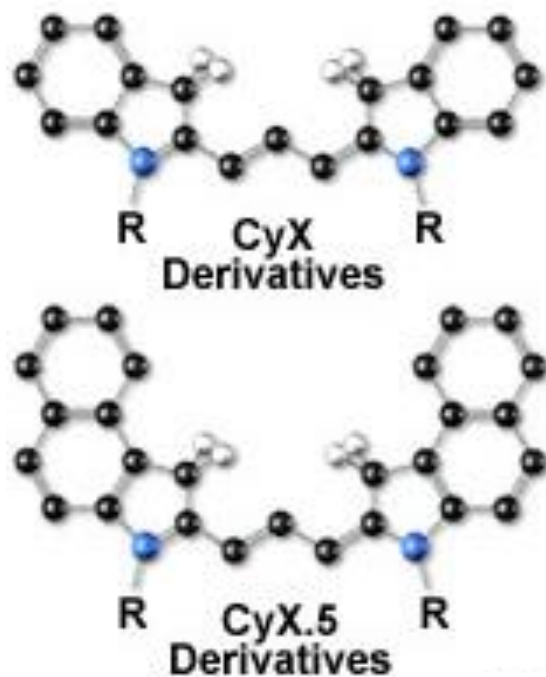


Ciò permette di abbandonare la camera oscura.



Cianine nella storia umana recente

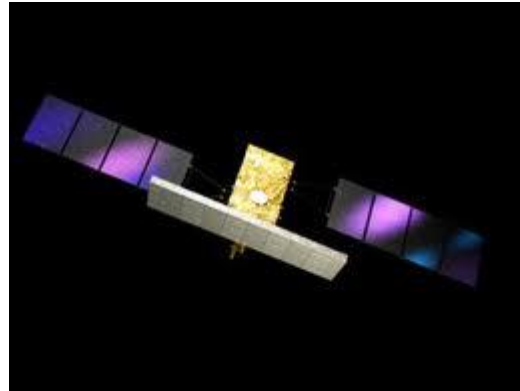
Scoperte a inizio '900 all'interno di industrie tessili per le loro evidenti proprietà coloranti.



Cianine nella storia umana recente

Scoperte a inizio '900 all'interno di industrie tessili per le loro evidenti proprietà coloranti.

Durante la **guerra fredda** sono state utilizzate come **sensibilizzatori fotografici** nel vicino IR.



Anche in presenza di cielo coperto, satelliti spia hanno potuto fotografare impianti militari e strategici ad oltre 500 km di distanza.

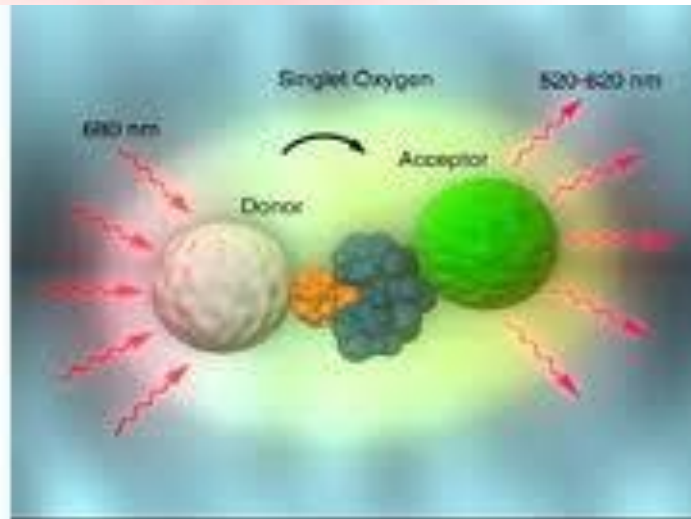
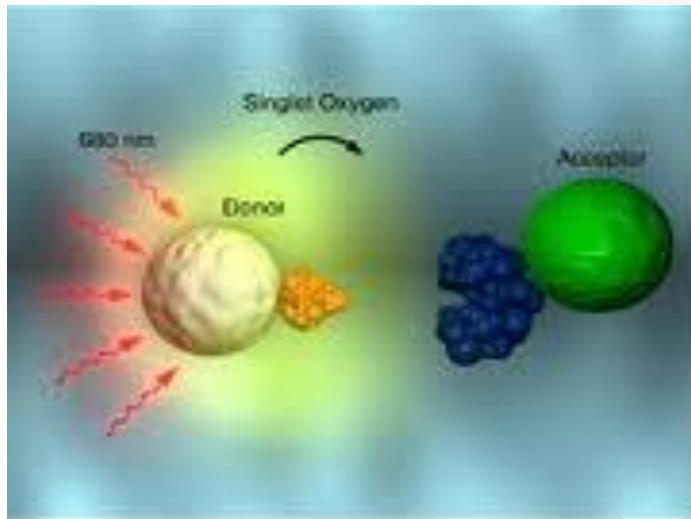
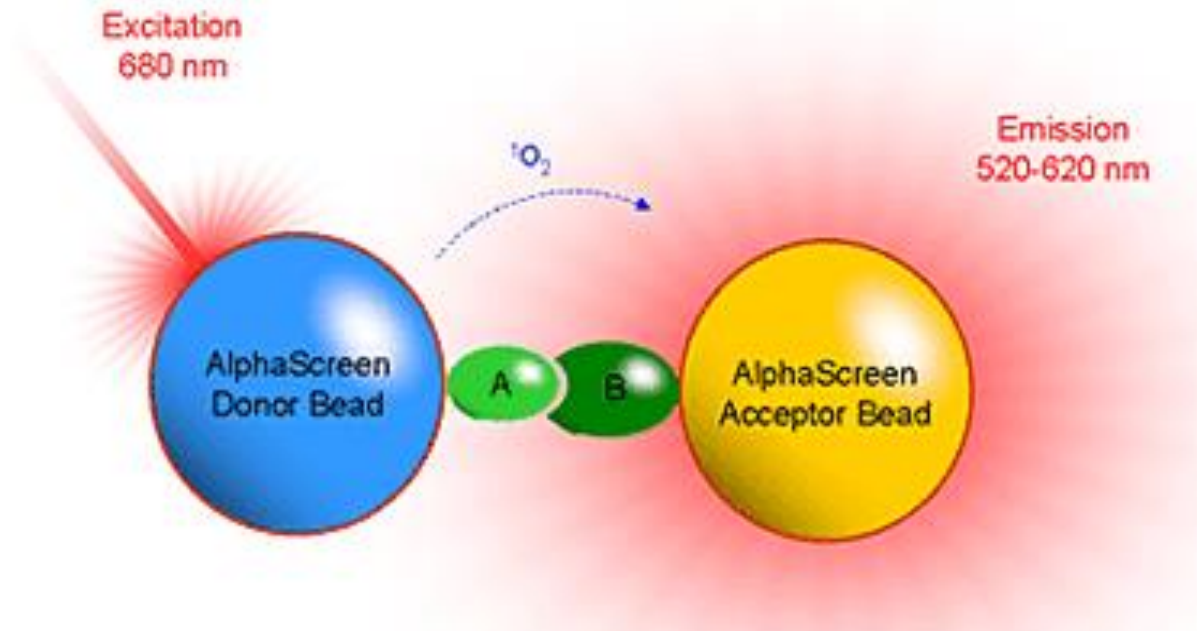
Alla fine degli anni '80 le cianine sono state largamente impiegate nella **registrazione ottica**, nei CD e fino a oggi in DVD e Blu-Ray.

O
G
G
I



Cianine nella ricerca biomedica

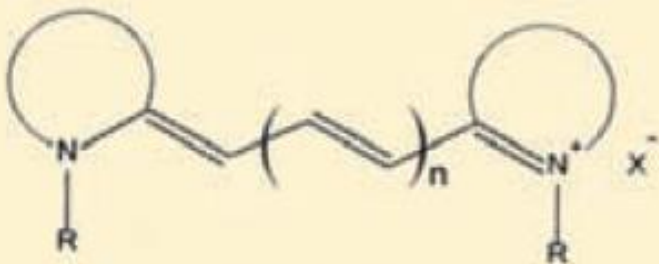
Tecnologia Alpha



Cianine nella ricerca biomedica

Composti solubili, fluorescenti a basso ingombro sterico.

Ideali per marcare **proteine** e **DNA**

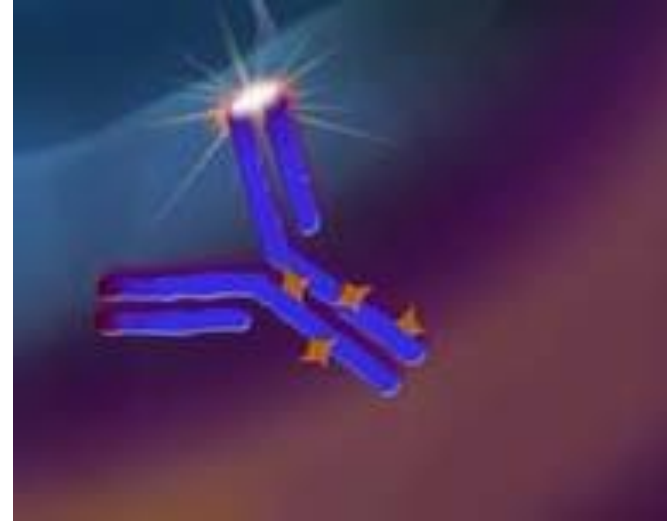


- n = 0** monomethincyanines
- n = 1** trimethincyanines (Cy3)
- n = 2** pentamethincyanines (Cy5)
- n = 3** heptamethincyanines (Cy7)

Il vicino infrarosso è molto conveniente per le misure di fluorescenza e tra i pochi marcatori in questa zona dello spettro, le cianine sono la categoria più importante.

Anticorpi marcati con cianine

- Adatti al Western Blot.
- Sistema **stabile** per **settimane**.
- Indubbio il **risparmio** di tempo e denaro.
- Si ottengono **immagini digitalizzate** anziché dover effettuare scansioni di lastre (con perdita di dettaglio).
- Sistema con grande **linearità di risposta** alle concentrazioni del campione.



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.



Sistemi per l'Imaging

Rilevazione con sistemi di acquisizione digitale delle immagini.



Queste piattaforme permettono:

- Applicazioni multiple con un singolo strumento.
- **Abbandonare** la camera oscura.

Sistemi per l'Imaging

Due sistemi principali:



A camera

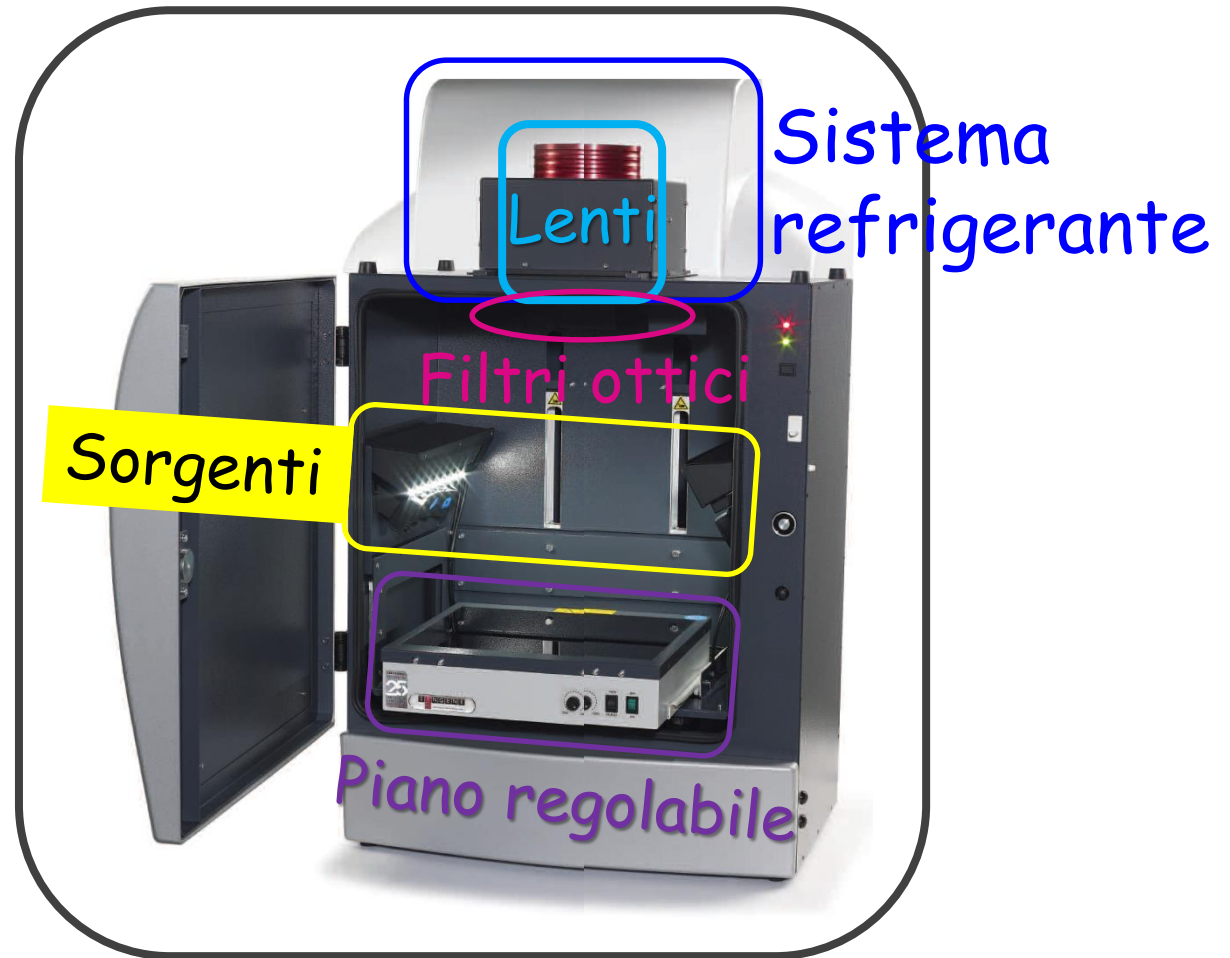


A scanner

Sistemi per l'Imaging a «camere»

«Scatola nera»

SCHEMA
STRUTTURALE

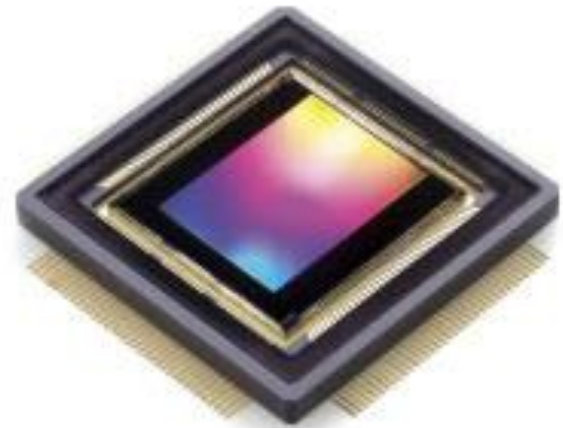


Sistemi per l'Imaging a «camere»

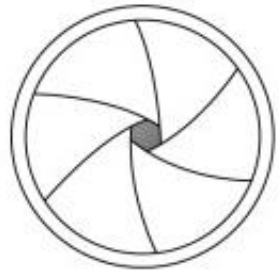
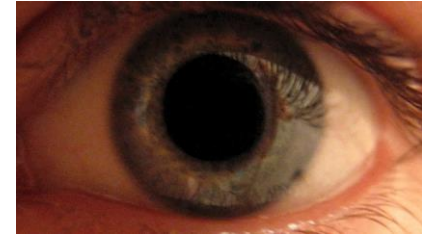
SISTEMI OTTICI



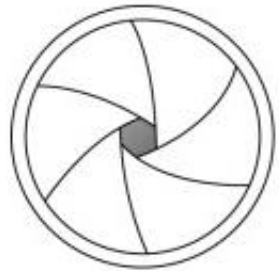
SENSORI



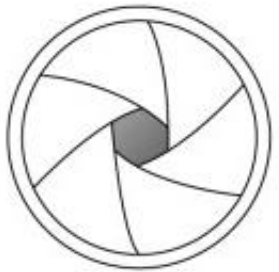
Sistema ottico



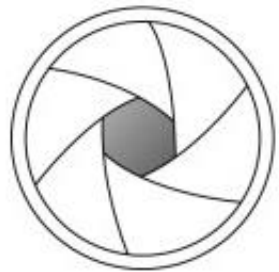
f/16



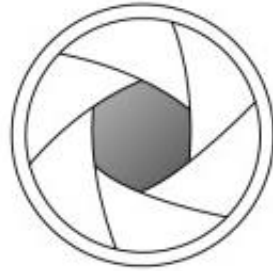
f/11



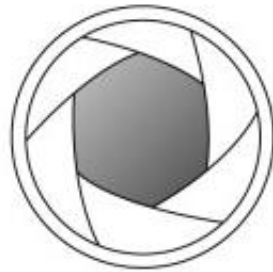
f/8



f/5.6



f/4



f/2.8



f/2

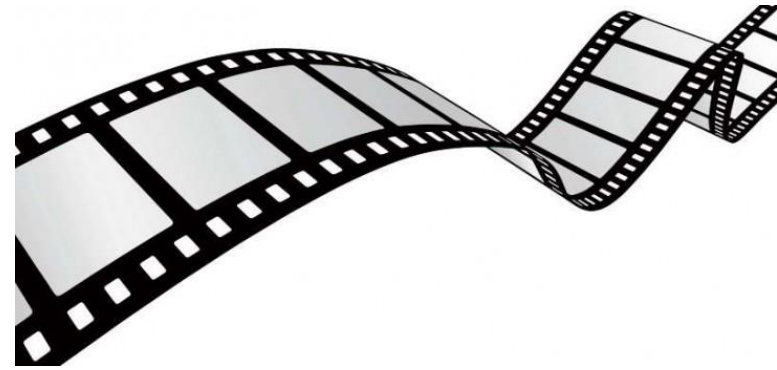
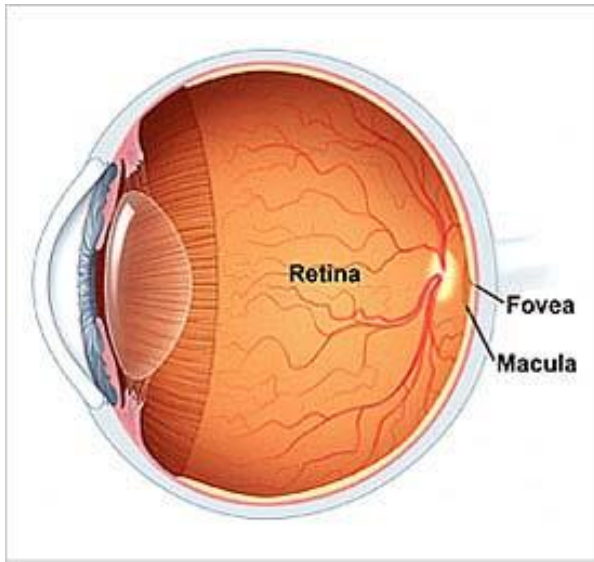
DIAFRAMMA

f/0,85 - 0,95



Obiettivi straordinariamente luminosi.

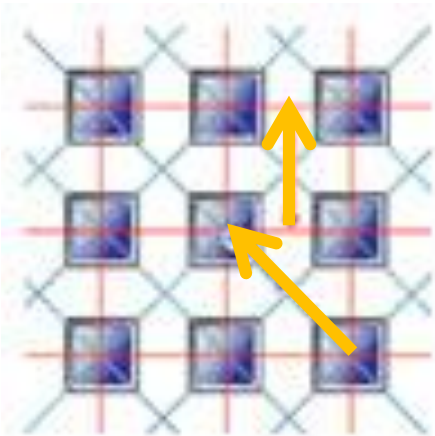
Sensori



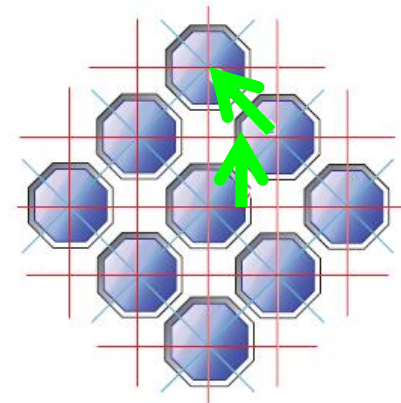
Sensori

Da 3,2 a 6,3 Mpixels

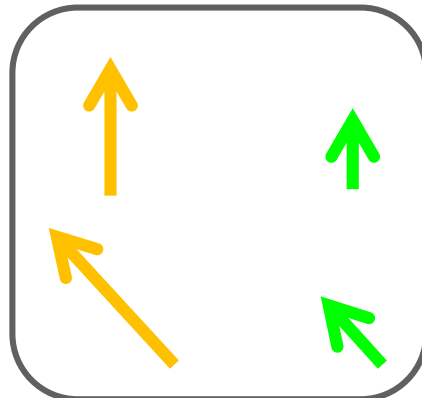
A pixel normale



A pixel ottagonale



Confronto

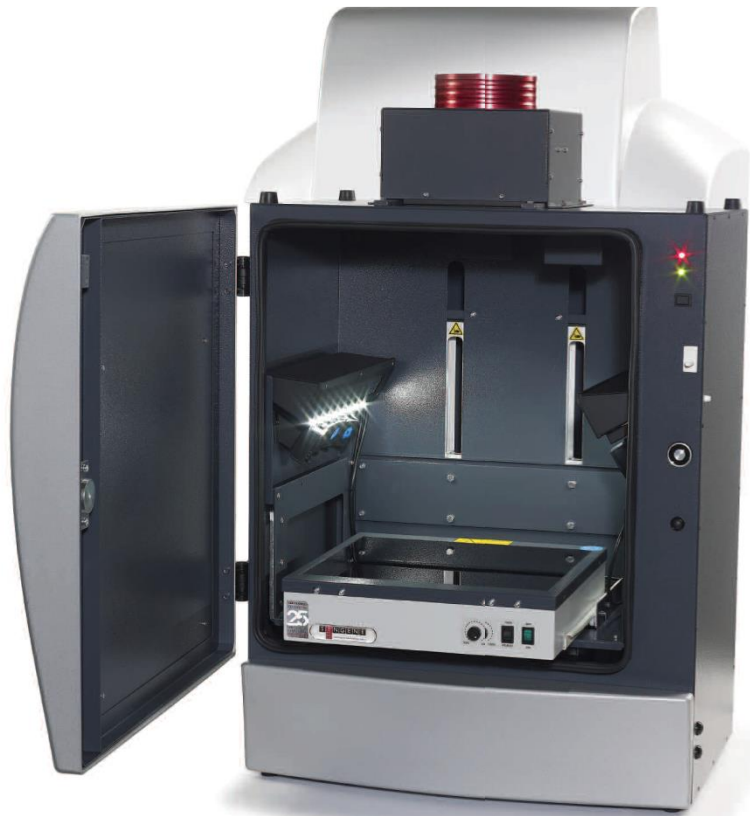


Il pixel ottagonale offre una matrice più densa per una **cattura + efficiente della luce.**

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

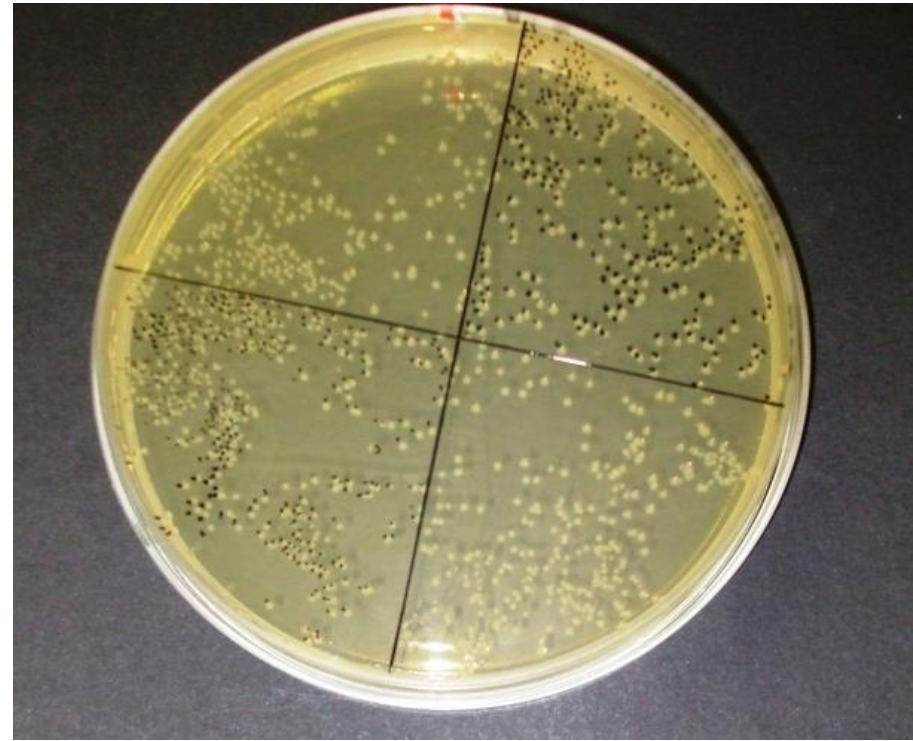


In più misurano anche la **chemiluminescenza**.



Sistemi per l'acquisizione di immagini di gel,
filtri (nitrocellulosa, PVDF, nylon) e colonie cellulari.

RIVELAZIONE DI COLONIE IN LUCE BIANCA

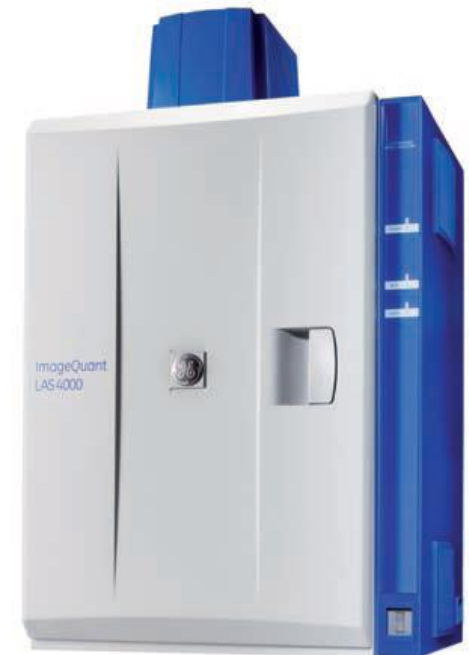


Software appositi per la **conta automatica**.

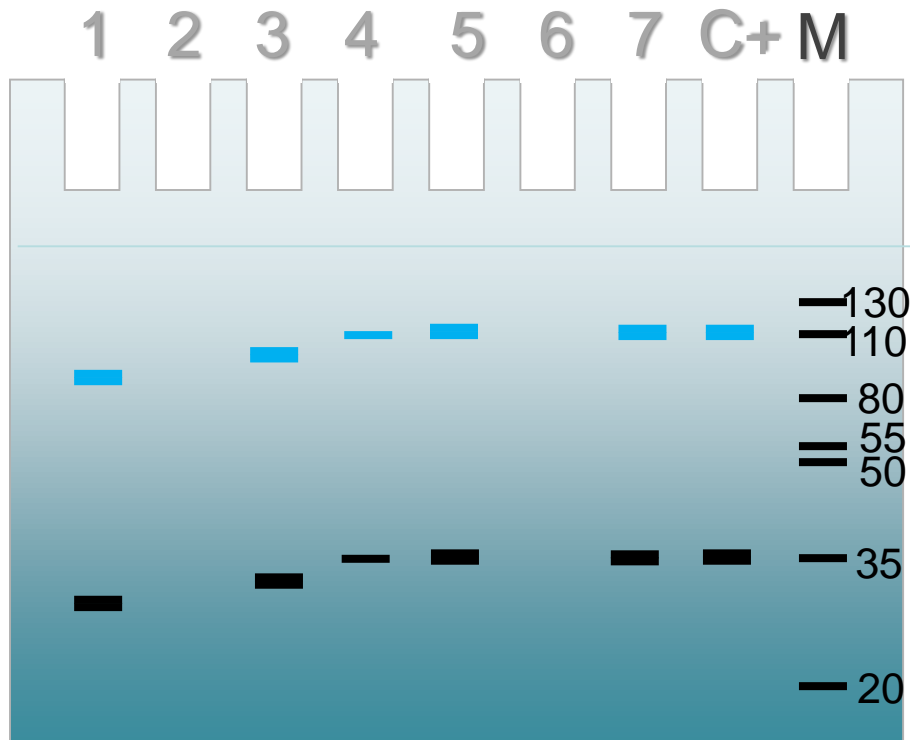
ImageQuant™ LAS 4000 Biomolecular imager



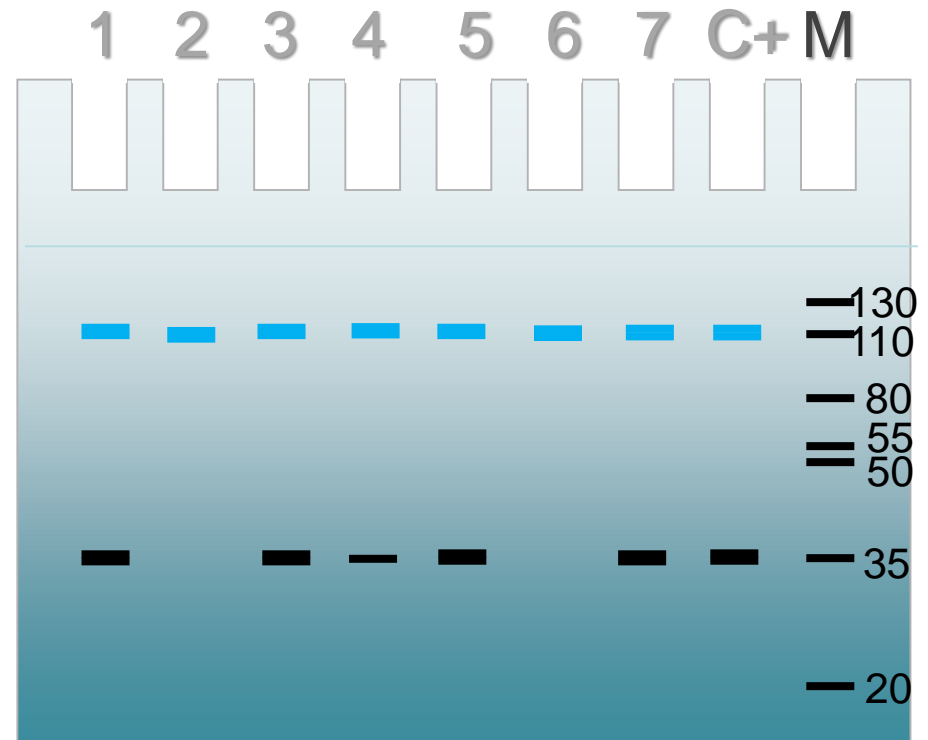
- **Risoluzioni** elevate (4,2 Mpixel).
- **Rumore** di fondo ridotto, lavorando con una camera a -30°C (permette esposizioni anche molto lunghe).
- **Sensibilità**: fino a **40 pg** di proteina.
- Quantificazione **uniforme**.
- Analisi multiplex: rilevazione di più fluorescenze **simultaneamente**.



PROTEINA INDIPENDENTE



Banda attesa 35 kDa



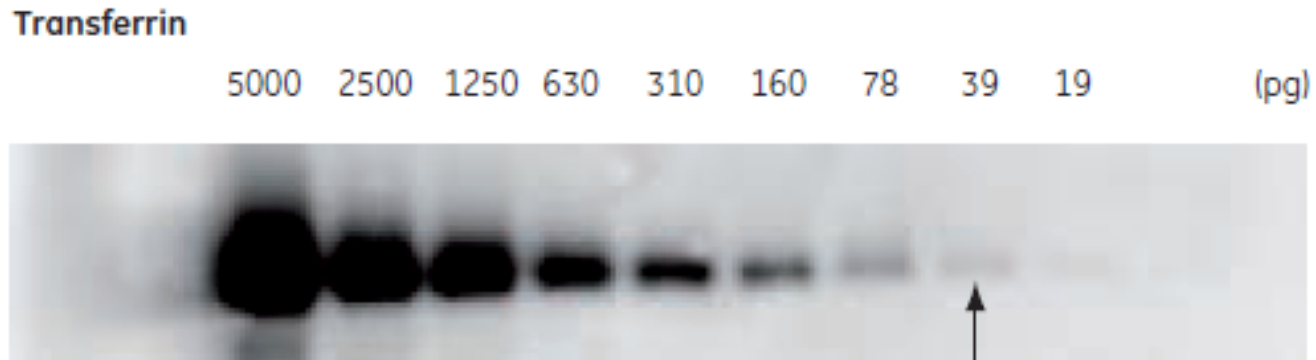
Banda attesa 35 kDa

Necessaria per evidenziare errori di:

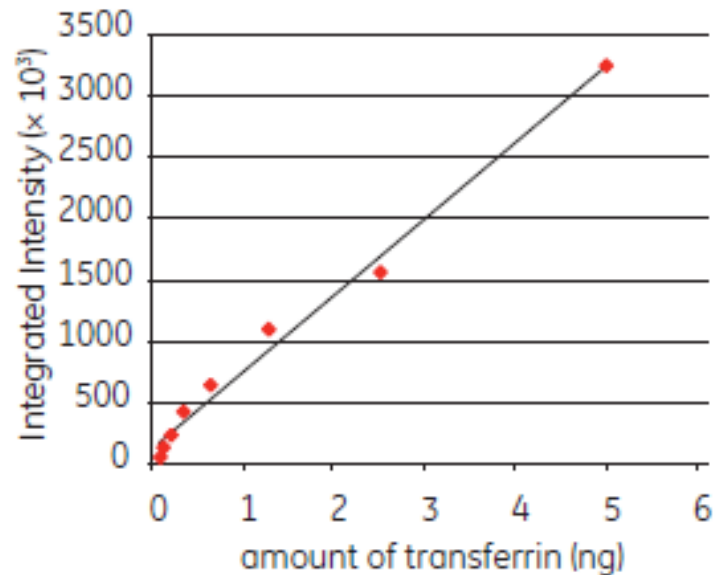
caricamento,
corsa,
trasferimento,
legame anticorpale,
ecc.

ImageQuant™ LAS 4000

Prestazioni su WB



Sample: Transferrin dilution series
Mode: Chemiluminescence
Binning: 1 × 1
LOD: 39 pg transferrin
L: $R^2 = 0.9897$



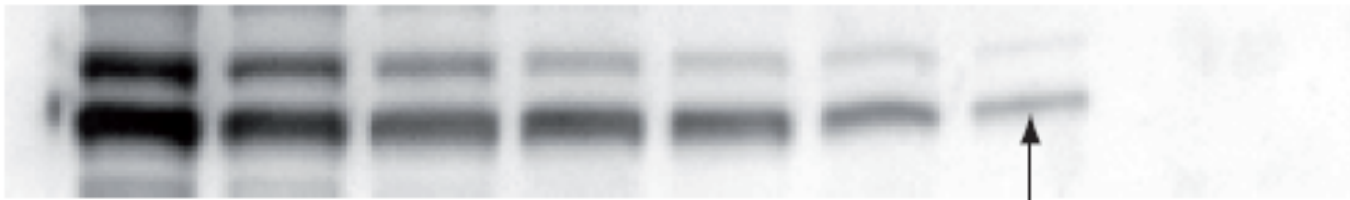
**WB su purificato:
da 0,6 pg a 5 ng**

ImageQuant™ LAS 4000

Prestazioni su WB

CHO cell lysate

5000 2500 1250 630 310 160 78 39 (ng)



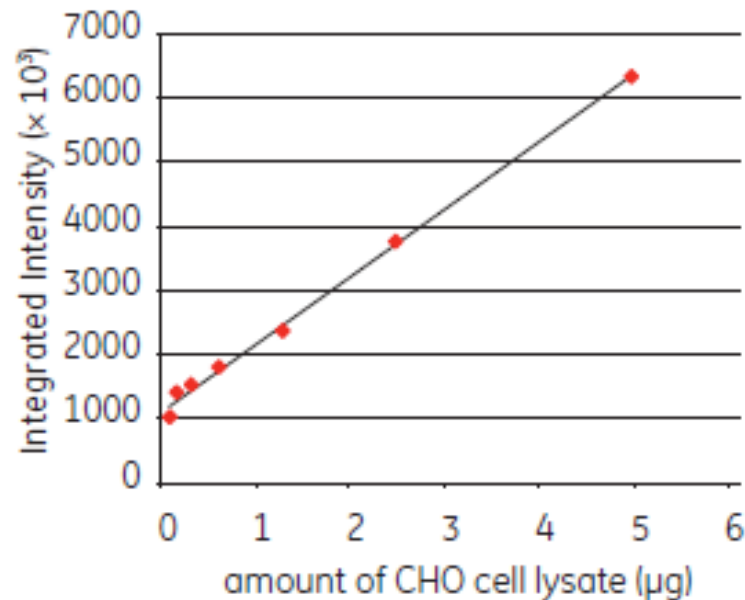
Sample: CHO cell lysate; ERK

Mode: Chemifluorescence

Binning: 1 × 1

LOD: 78 ng lysate

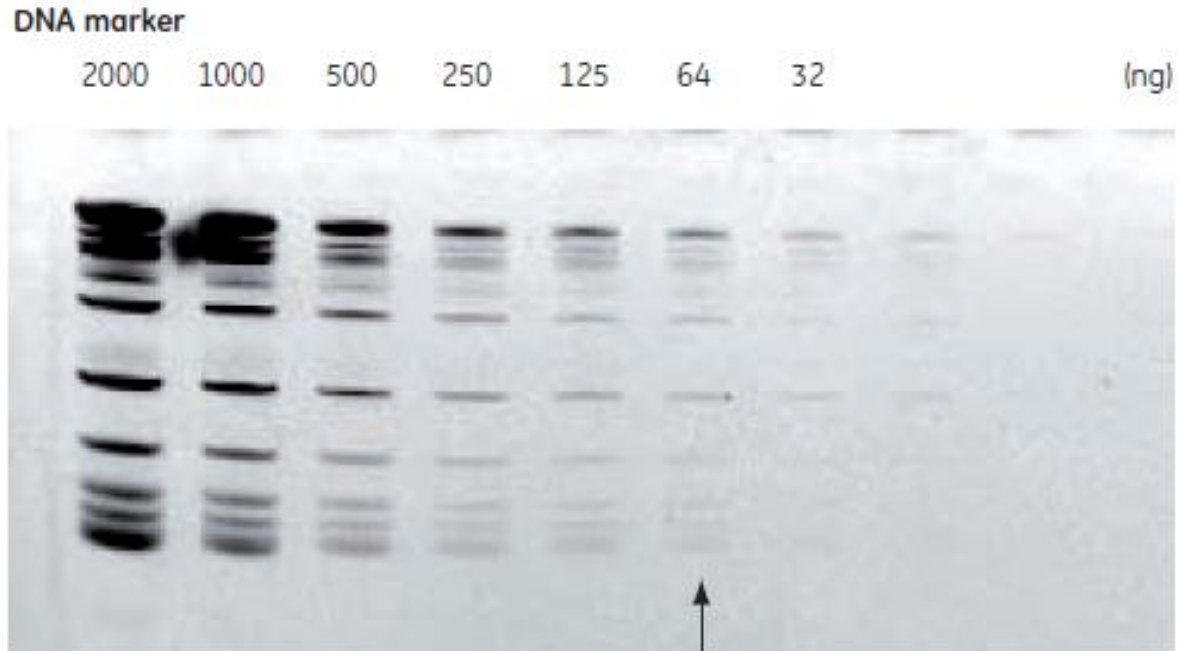
L: $R^2 = 0.9974$



**WB su lisato,
da 39 ng a 5 ug
(2000 volte peggio!)**

ImageQuant™ LAS 4000

Prestazioni su GEL

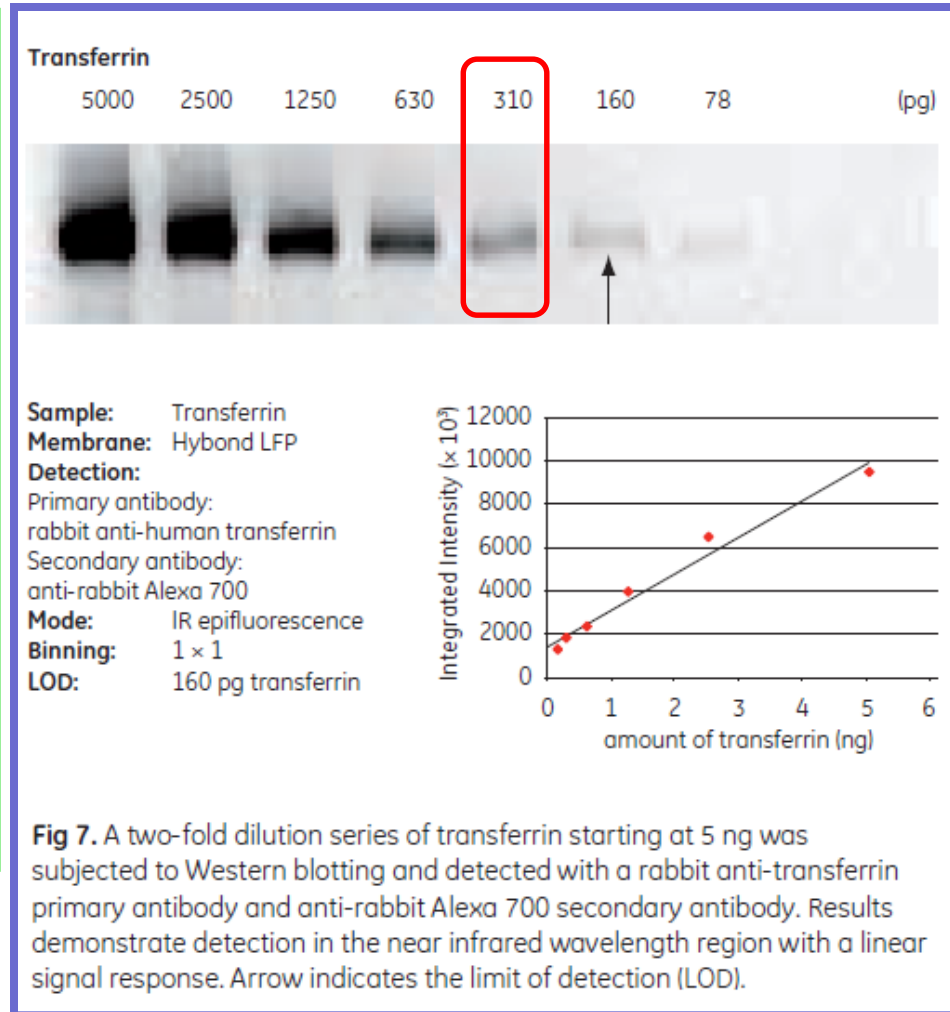
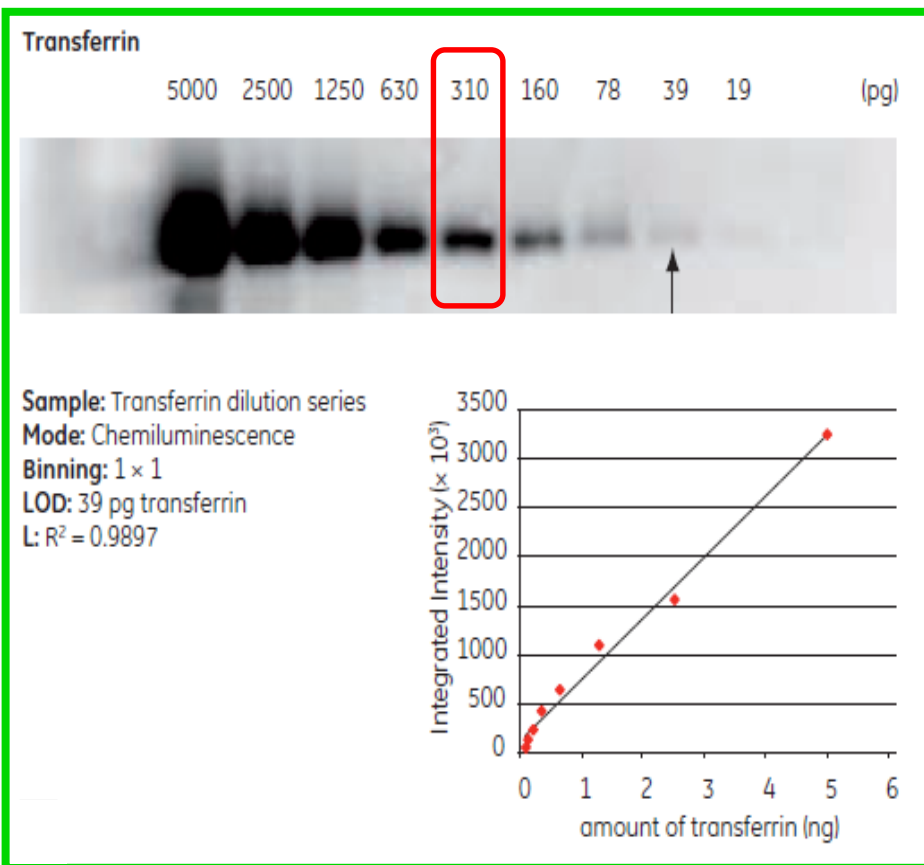


Sample: DNA marker
Stain: EtBr
Mode: UV epifluorescence
Binning: 1 × 1
LOD: 64 ng
L: $R^2 = 0.9968$

DNA marker
da 3,8 ng a 2 ug

ImageQuant™ LAS 4000

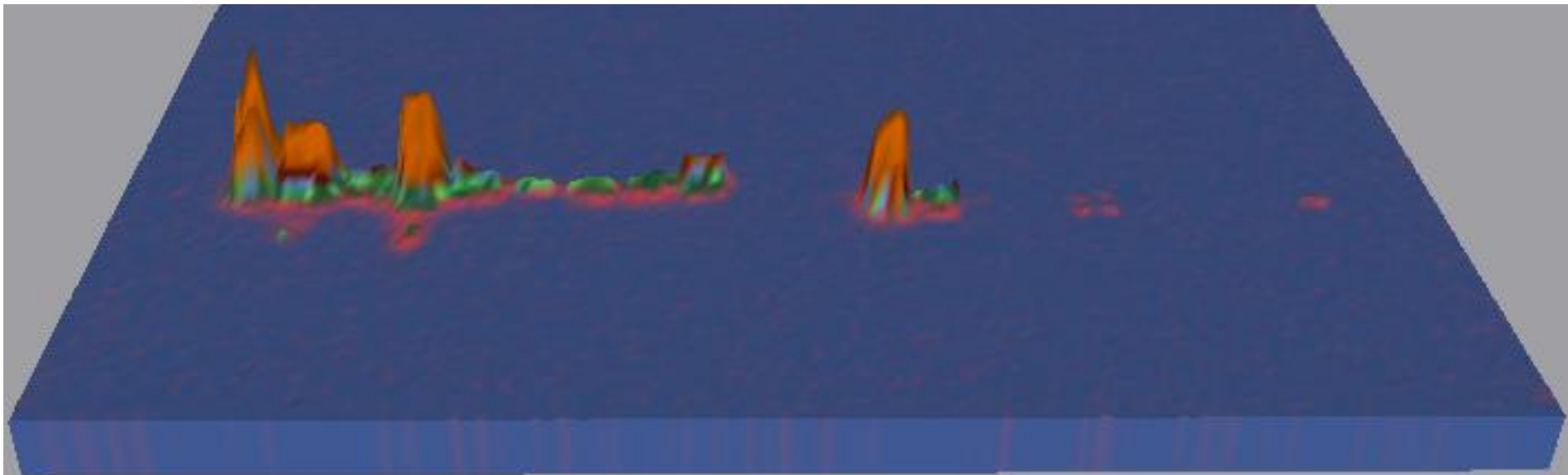
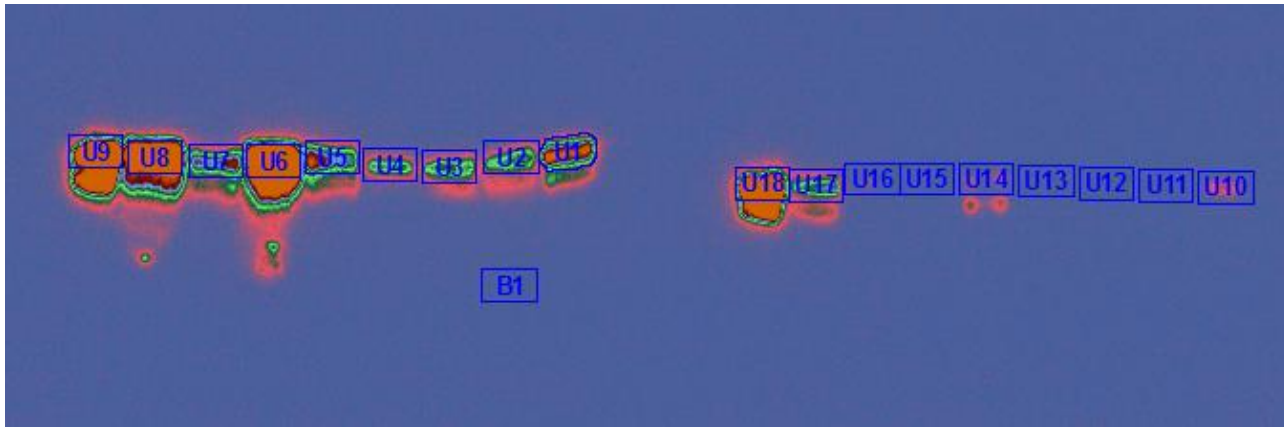
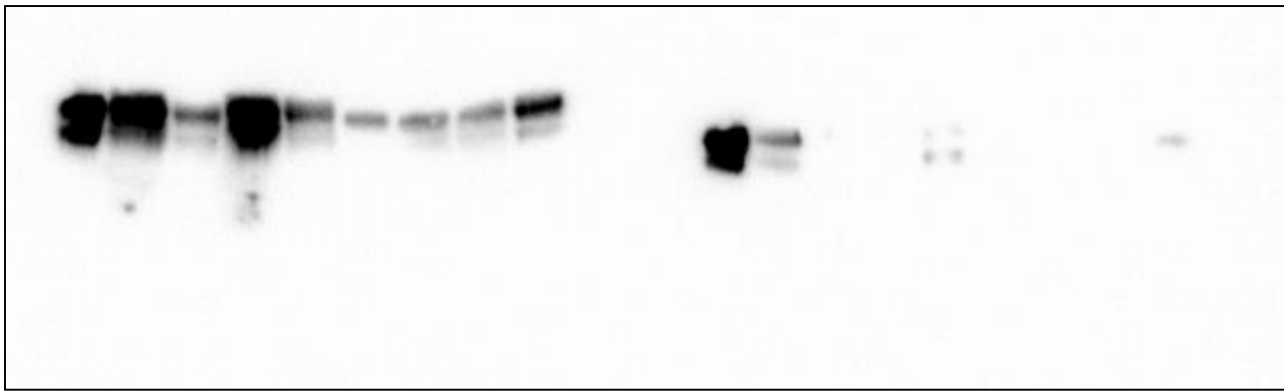
Confronto fra chemi/fluorescenza



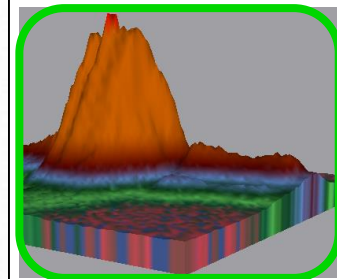
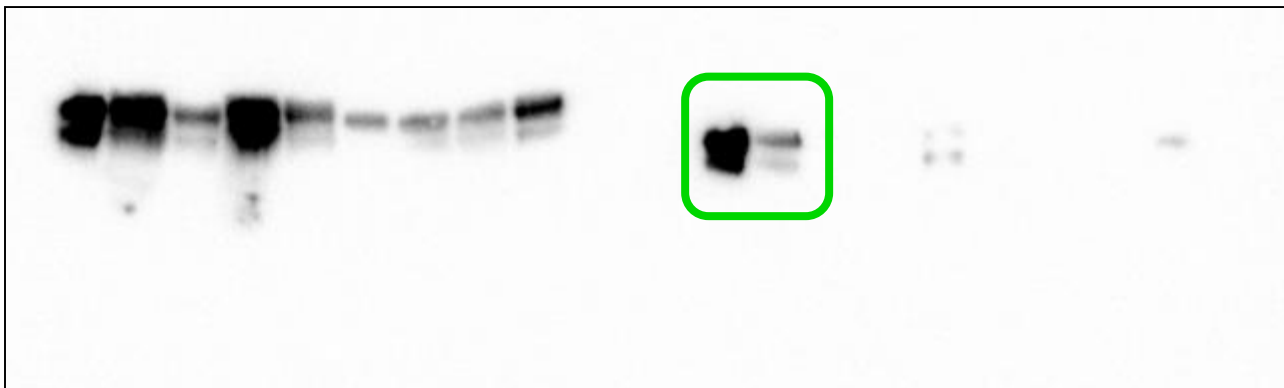
Chemiluminescenza

Fluorescenza

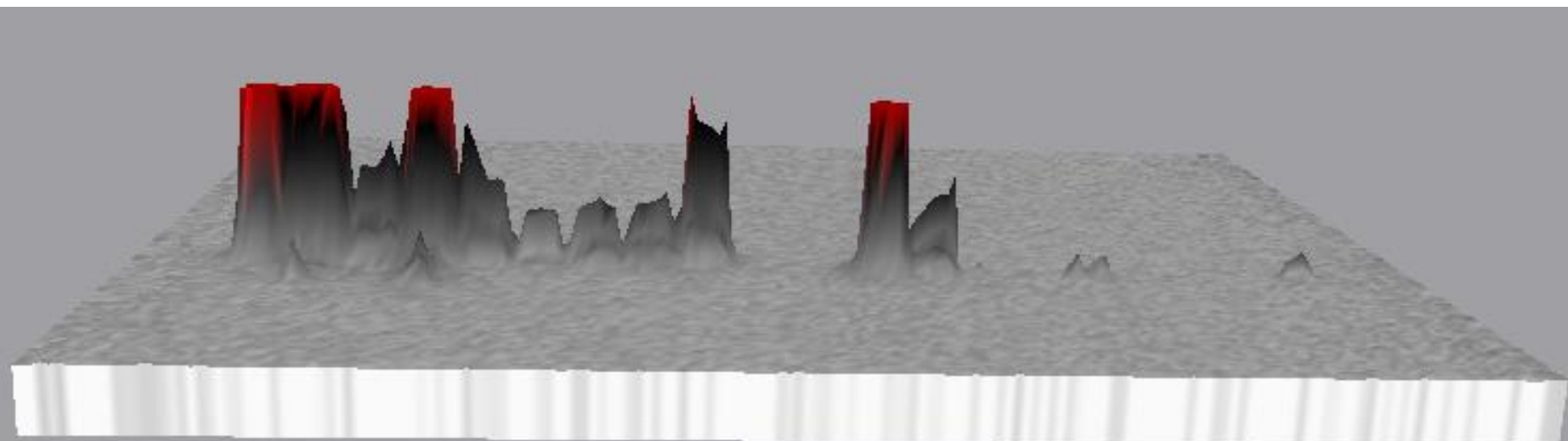
Dati
reali



**Dati
reali!**



Sovraesposizione con saturazione



Sistemi per l'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.

Sistemi per l'Imaging a SCANNER



Sistemi per l'Imaging a SCANNER

Pharos FX



- Sistema **laser** per la **scansione** ad altissima risoluzione di marcatori fluorescenti, radioisotopi e semplici colorazioni.

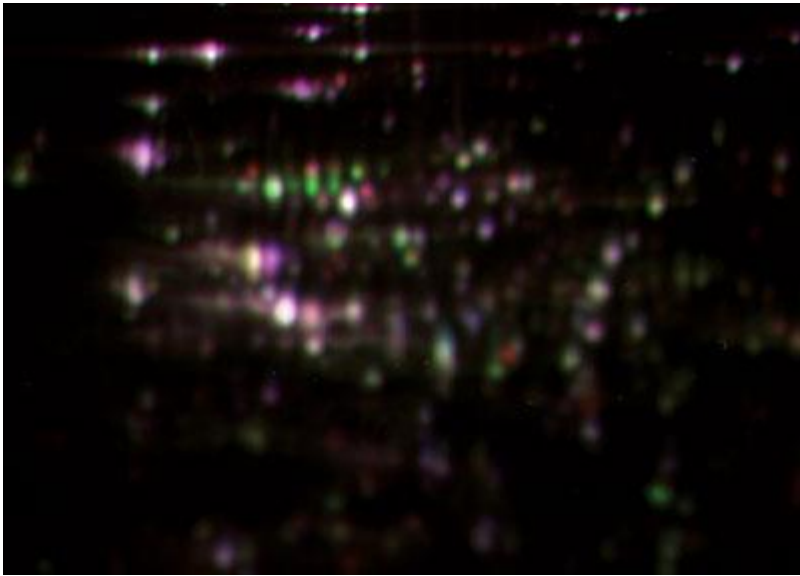
- Adatto ad analisi di mappe bidimensionali.

- Compatibile con **tre colori** simultaneamente.



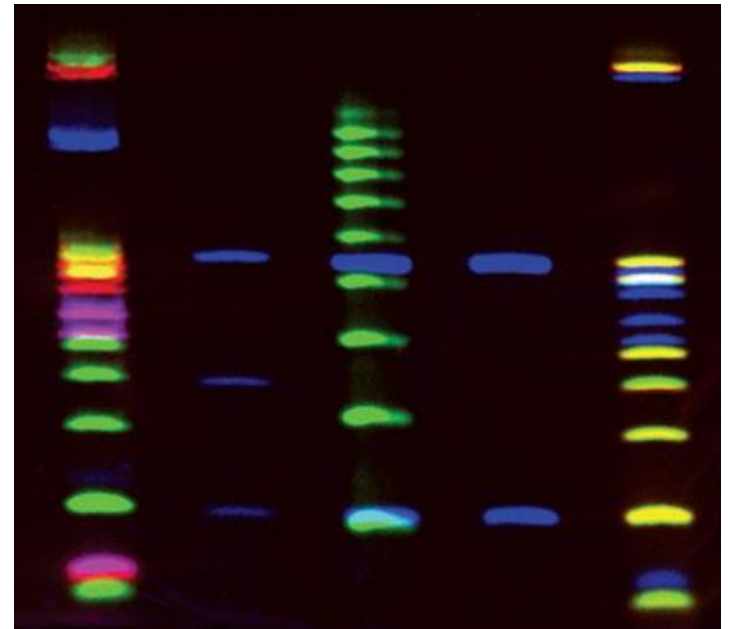
Odyssey

Applicazioni



DIGE con Cy2/Cy3/Cy5.

Il sistema Pharos FX ha **laser multipli** che ne aumentano la flessibilità di utilizzo.



DNA marcato con FITC/Cy3/Cy5.

Pharos FX - caratteristiche

Il Pharos FX utilizza un massimo di 3 laser; uno **interno**, con emissione a **532 nm**, e due laser **esterni** che emettono a **488 nm** e **635 nm**.

Presenta inoltre 8 slot per i **filtri ottici** che permettono di personalizzare la rilevazione di più sonde, quali:

Ethidium bromide, SYBR® Green I, SYBR® Gold, SYPRO Orange, SYPRO Red, Nile Red, SYPRO Ruby, Deep Purple, Alexa Fluor 488, 532, 546, and 635, FITC, FAM, **Cy2, Cy3, Cy5**, HEX, R6G, TAMRA, Texas Red, Pro-Q Diamond, and Pro-Q Emerald.

Pharos FX - caratteristiche



Testina a
traslazione
bidimensionale
direttamente
sopra il campione.

In grado di leggere campioni con elevata risoluzione (800-200-100-50 μm), altissima precisione e grande linearità di risposta (5 ordini di grandezza).

Pharos FX - impieghi

Il PharosFX™ può esser usato per catturare immagini di vari campioni (**gel**, **filtri** e **micropiastre**).

Utilizzabile con:

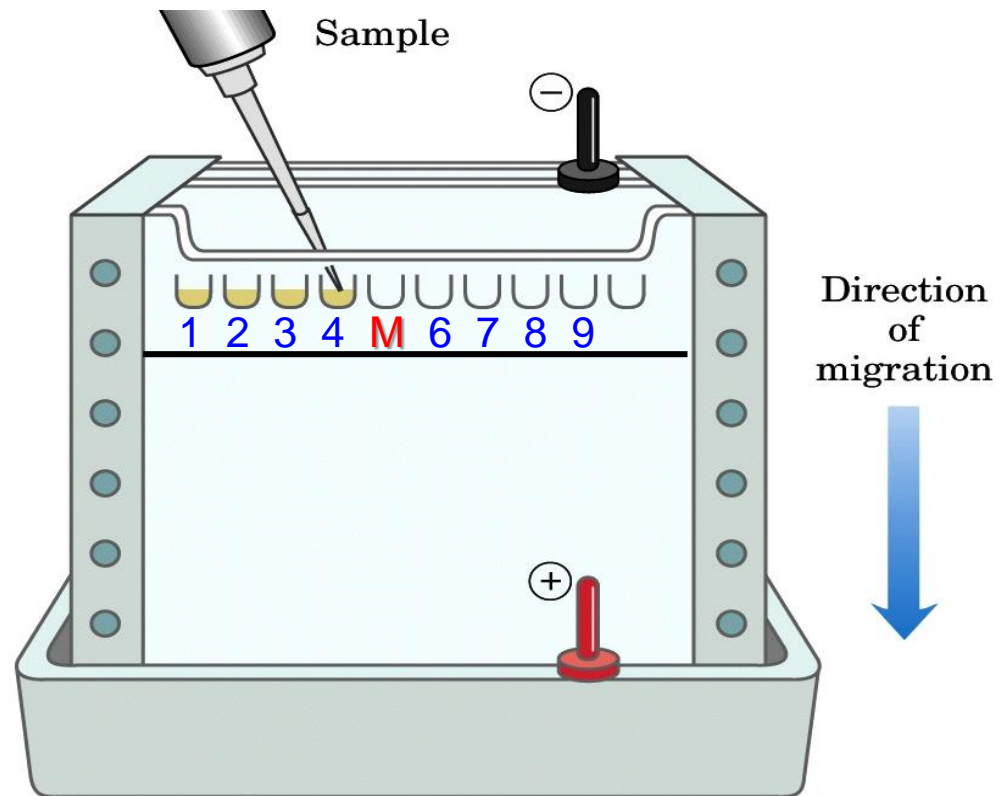


- Applicazioni in fluorescenza, sensibili e a colorazione singola o **multipla**.
- Quantificazioni altamente sensibili e precise di **radioisotopi**.
- Campioni **visibili** quali **gel** colorati con Coomassie e Silver Stain.

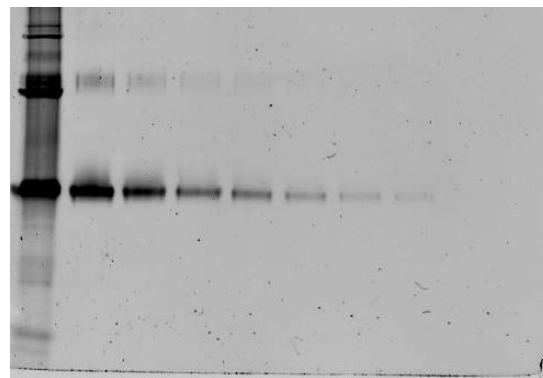
Esempi

Gradiente di BSA

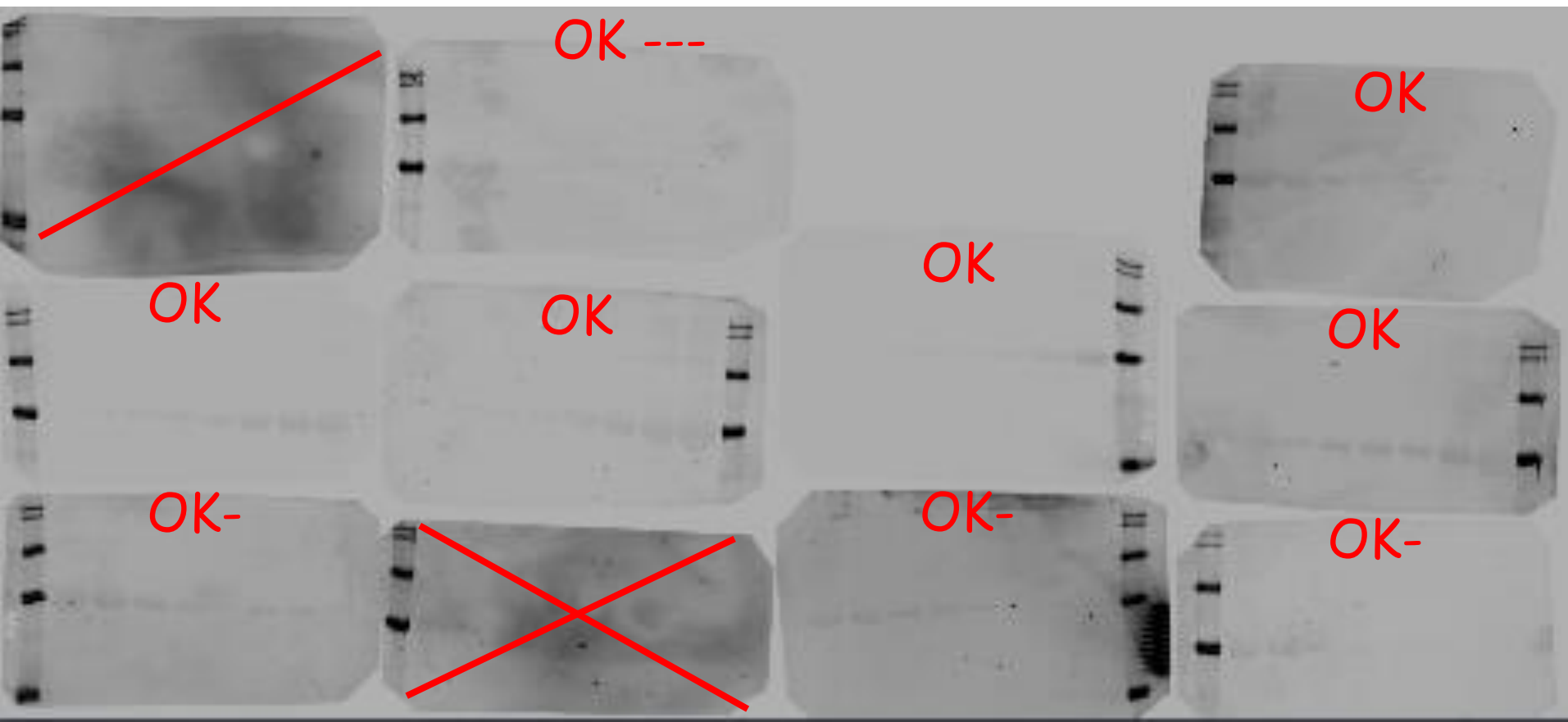
1. 2000 ng/uL (Madre: 13,75 ug/uL)
2. 1000 ng/uL
3. 500 ng/uL
4. 250 ng/uL
5. **Marker**
6. 250 ng/uL
7. 500 ng/uL
8. 1000 ng/uL
9. 2000 ng/uL



RISULTATI DI LABORATORIO



Acquisizione ad alta sensibilità e a 50 um

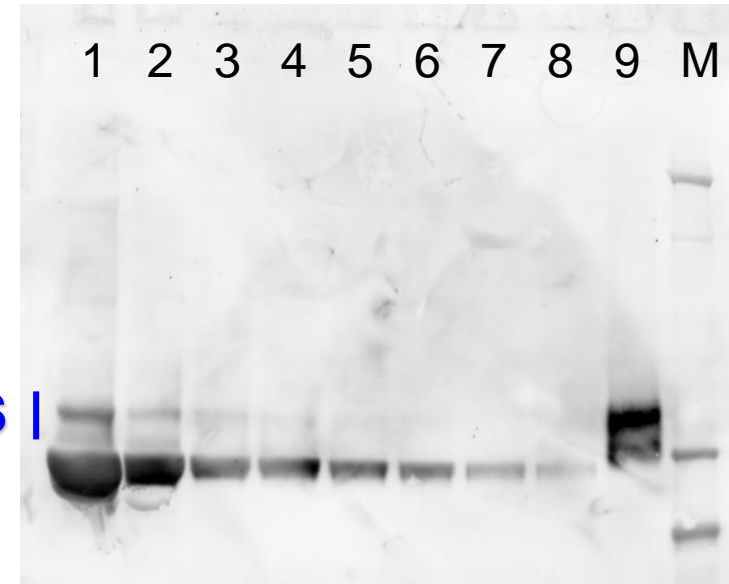


WB con cianine

Esempi REALI

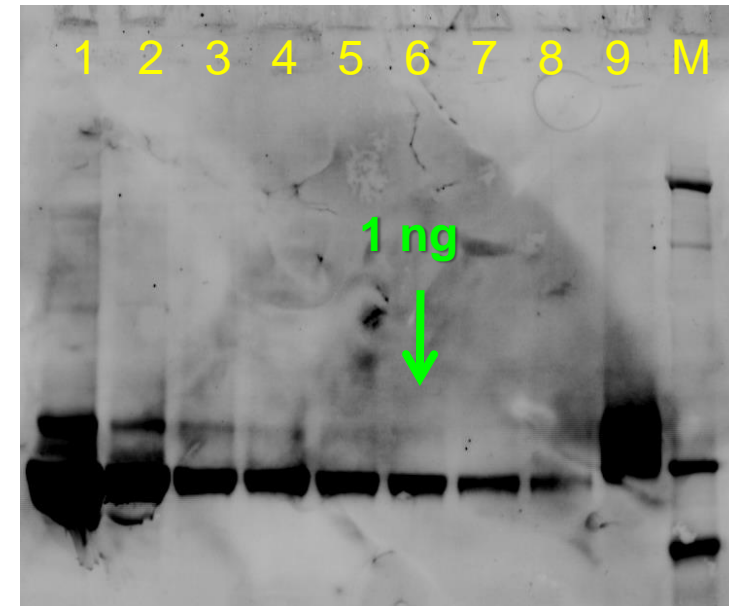
- 1 - Pnp dil 1/20 (12.5 ng di PS ng)
- 2 - Pnp dil 1/80
- 3 - Pnp dil 1/320
- 4 - Pnp dil 1/640
- 5 - Pnp dil 1/1280
- 6 - Pnp dil 1/2560
- 7 - Pnp dil 1/5120
- 8 - Pnp dil 1/10240 (0.236 ng campione)
- 9 - Campione purificato (138 ng)
- M - Marker

PS |
BSA →



2 proteine con dimensioni sufficientemente diverse (PS = 69 kDa, BSA = 64 kDa) e con diversa affinità per gli Ab. Questo test serve per comprendere l'efficienza del sistema, anche in condizioni non ottimali.

Il campione presente nei pozzetti 7 e 8 (0.48-0.24 ng) risulta prossimo al limite di sensibilità dello strumento.



WB con 2 Ab marcati con Cy5

Esempi
REALI

- 1 - Pnp dil 1/20, 10 uL (241.5 ng di PS ng)
- 2 - Pnp dil 1/40
- 3 - Pnp dil 1/80
- 4 - Pnp dil 1/160
- 5 - Pnp dil 1/320
- 6 - Pnp dil 1/640
- 7 - Pnp dil 1/1280 (3.8 ng di PS ng)
- 8 - PS purificata (138 ng)
- 9 - FX_{zim} purificato (117.6 ng)
- M – Marker

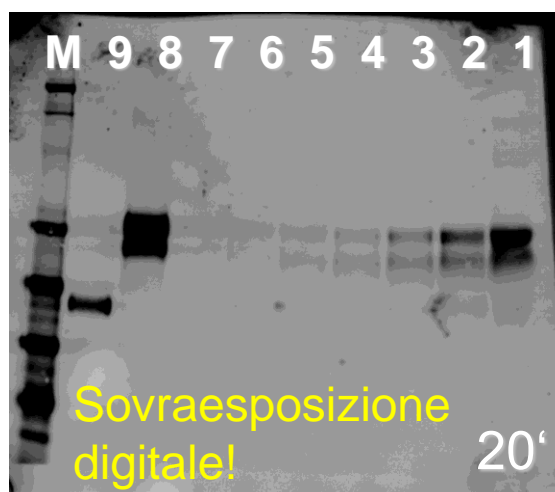
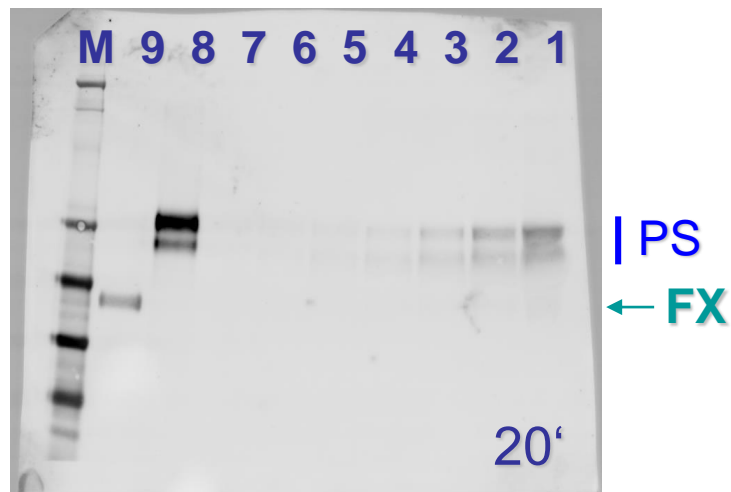
Corsa: 45' a 200V

Blot: 1h a 0.3A su nitrocellulosa

Rabbit Anti-PS: 1/1000 (4 ng/L)

Rabbit Anti-FX: 1/1000 (4 ng/L)

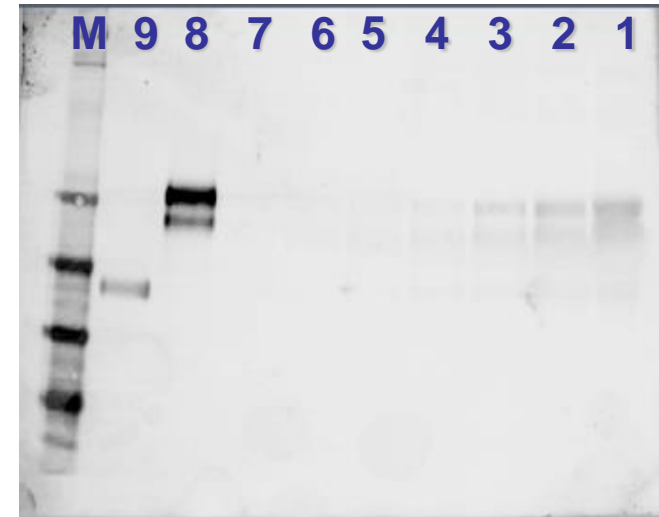
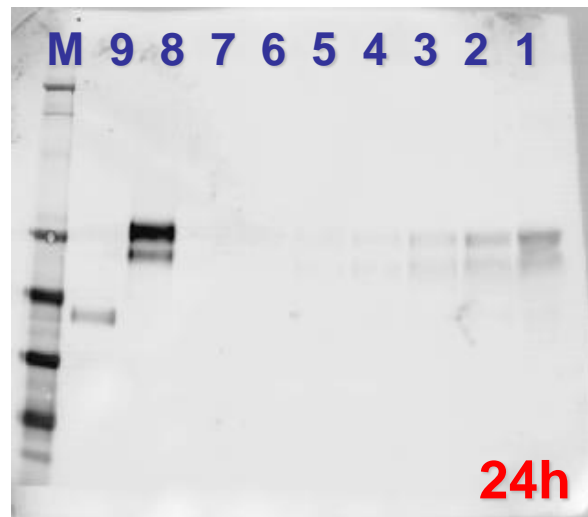
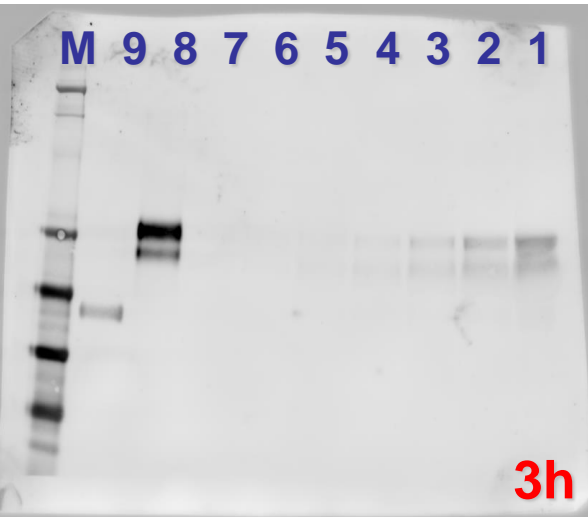
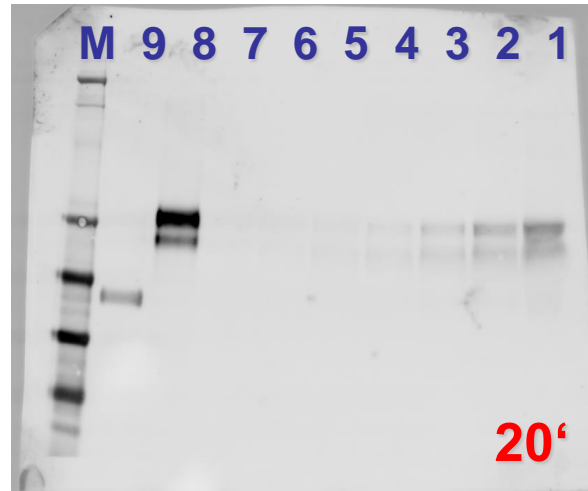
Anti-rabbit Cy5 1/3000 (4 ng/L)



Si nota bene il gradiente plasmatico di PS (Ab **policonale**), meno quello di FX (Ab **monoclonale**)

Stabilità del sistema

Esempi
REALI



L'intensità non scema
nemmeno dopo **5 giorni!**