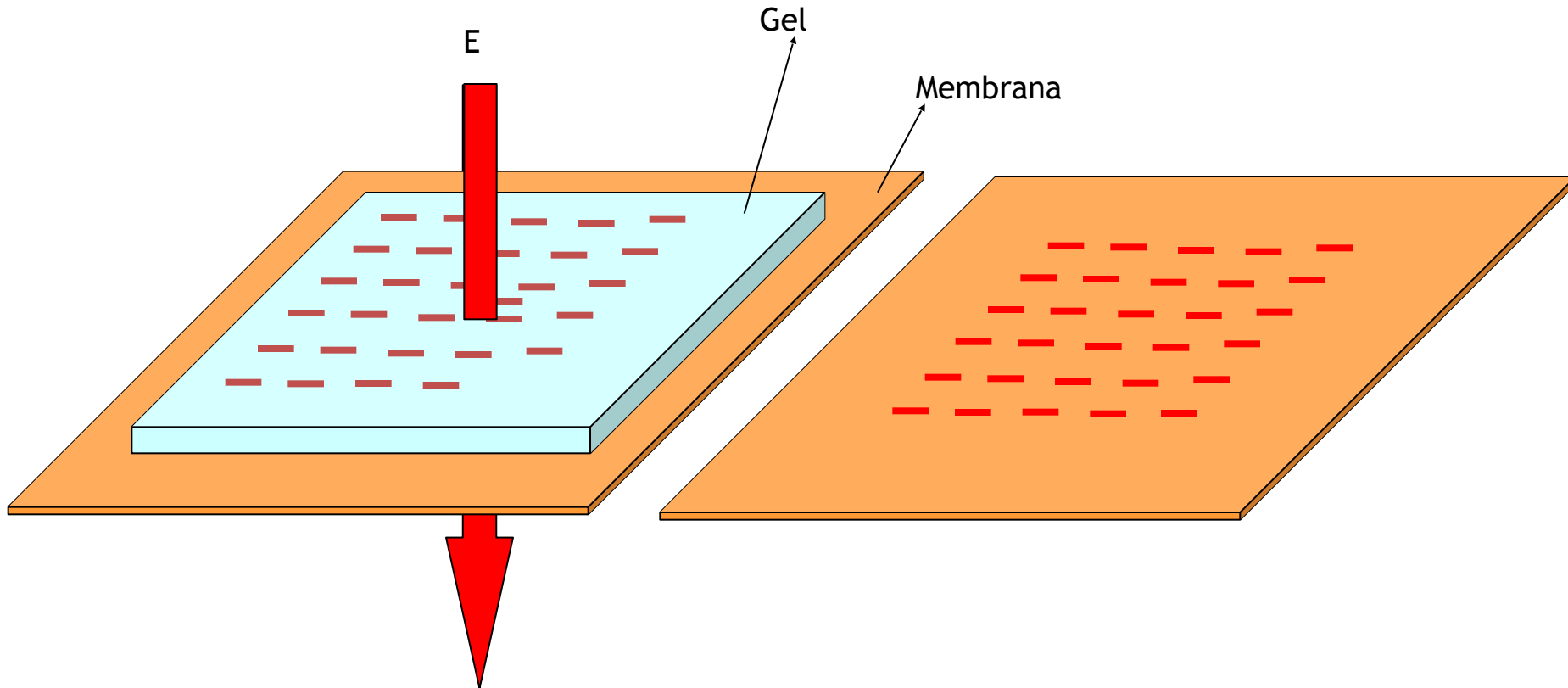


Trasferimento su membrana: Western blot (proteine) [northern (RNA) - southern (DNA)]

Prima del trasferimento

Dopo il trasferimento



Il trasferimento delle proteine su di una membrana viene fatto avvenire mediante applicazione di una differenza di potenziale. Le proteine migrano in una direzione che dipende dalla loro carica. Nel caso del trasferimento di proteine separate mediante SDS PAGE la loro migrazione è anodica dal momento che recano una carica netta negativa data dall'SDS.

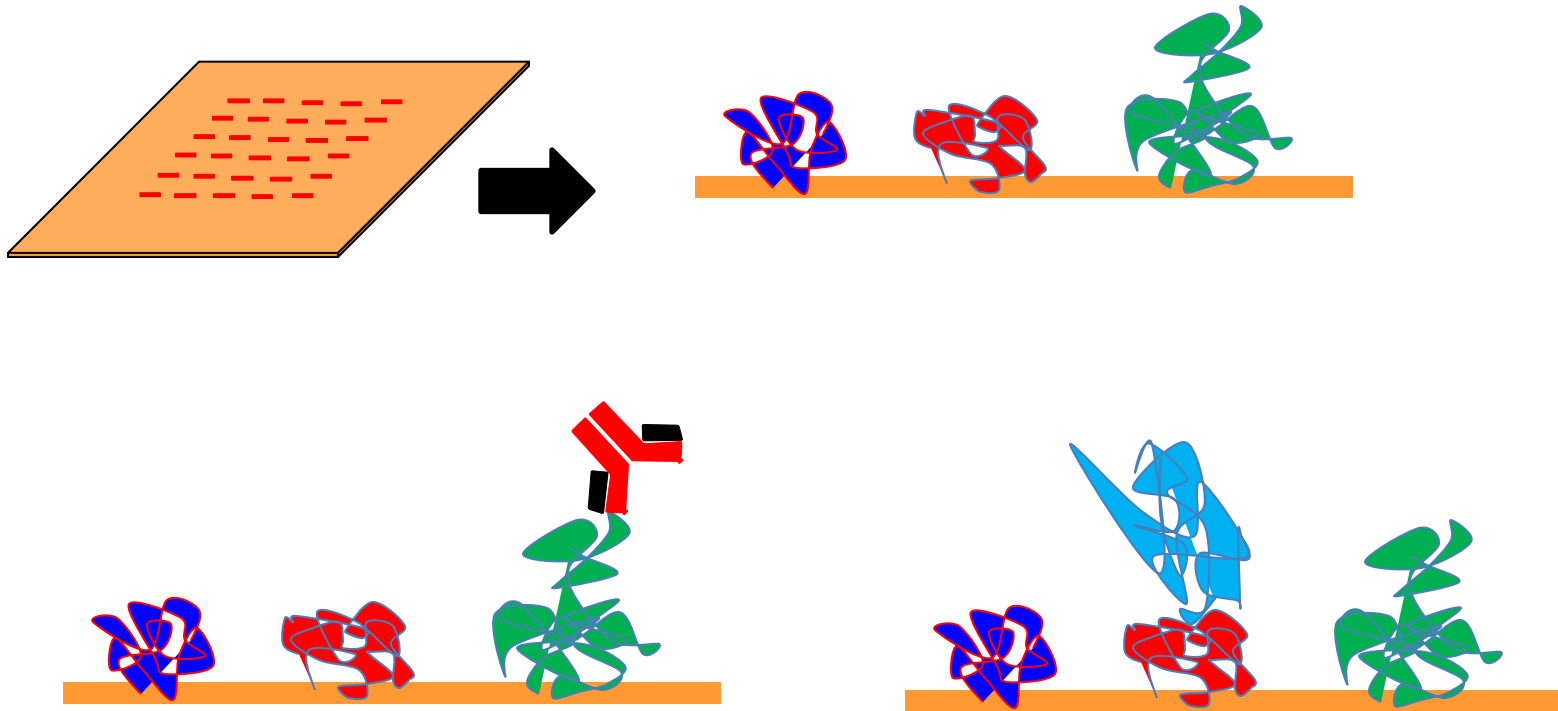
Perché è utile avere delle proteine immobilizzate su di una membrana?

Proteine immobilizzate sulla SUPERFICIE di un supporto solido

=>

DISPONIBILI per una serie di operazioni

- Riconoscimento anticorpale
- Interazioni proteina/proteina



Riconoscimento Ab

Protein/protein
(array)

PASSAGGI FONDAMENTALI di un Western Blot - trasferimento

1) Che tipo di elettroforesi è stata utilizzata?

SDS-PAGE

AU-PAGE

Altro...

Che carica hanno le proteine nel gel?

2) Scelta della metodica di trasferimento

In immersione (WET)

“semi-dry”

3) Scelta del supporto per le proteine

PVDF

Nitrocellulosa

4) Scelta del metodo per la rilevazione dell'avvenuto trasferimento

Colorazione rosso ponceau

altro...

5) Rilevazione anticorpale

Chemiluminescenza

Colorimetrica

Fluorescenza

1) Che tipo di elettroforesi è stata utilizzata?

SDS-PAGE

AU-PAGE

Altro...

Che carica hanno le proteine nel gel?

SDS conferisce carica negativa sotto azione di un campo elettrico le proteine hanno migrazione anodica.



Solitamente si sceglie di non alterare la carica delle proteine e di effettuare un trasferimento di tipo anodico.

Corse elettroforetiche condotte in ambiente acido, le proteine hanno una corsa catodica



Si può sia scegliere di effettuare un trasferimento catodico e/o anodico (lasciando le proteine nel loro stato di carica all'interno del gel) sia di condizionare le proteine in modo da fare un trasferimento anodico (ad esempio condizionando il gel in una soluzione contenente SDS). Oppure si può effettuare un trasferimento con un buffer a pH molto elevato in modo da rendere negative anche proteine con un elevato pI.
(NB: carica delle proteine dipende dal pH del mezzo in cui sono sciolte)

Dipende dal pH e dal verso della corsa elettroforetica (selezione della carica)



Tamponi per il trasferimento delle proteine

Alcuni esempi con sistemi ad immersione

Gel Type	Blotting Buffer	Transfer Membrane	Power
denaturing: SDS-PAGE (Western)	Towbin (25mM Tris/192mM Glycine/ pH 8.3/Methanol 20% (w/v)	nitrocellulose/nylon PVDF: ion-exchange	<ul style="list-style-type: none"> room temperature, 70V-100V, 200mA, 1.5- 4 hours 4°C, 180V, @160mA, 1.5-2 hours Overnight, 30V, 75mA
non-denaturing: (acidic or neutral proteins)	25mM Tris/192mM Glycine, pH 8.3 25mM sodium phosphate, pH6.5 15mM sodium borate, pH9.2	nitrocellulose; nylon PVDF; ion-exchange diazo-paper diazo-paper	<ul style="list-style-type: none"> room temperature, 60V, 200mA, 4 hours 4°C, 125V, 400mA, 1.5 hours Overnight, 30V, 100mA
IEF (native- basic proteins, acid urea gels)	0.7% acetic acid (w/v)*	nitrocellulose; nylon diazo-paper	<ul style="list-style-type: none"> room temperature, 70V, 400mA, 4 hours 4°C, 100V, 600mA, 1.5 hours Overnight, 30V, 200mA

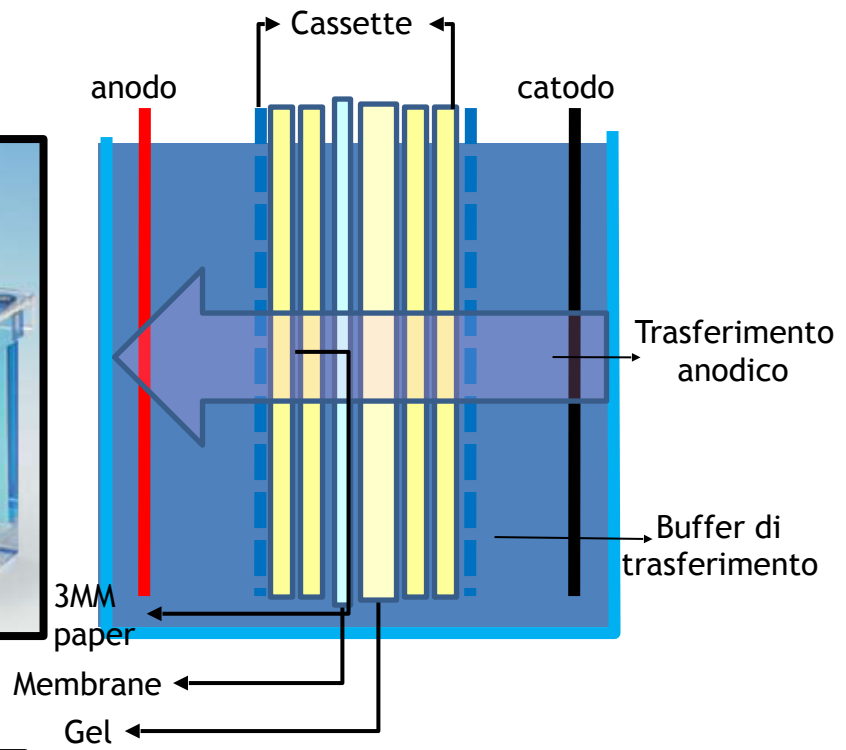
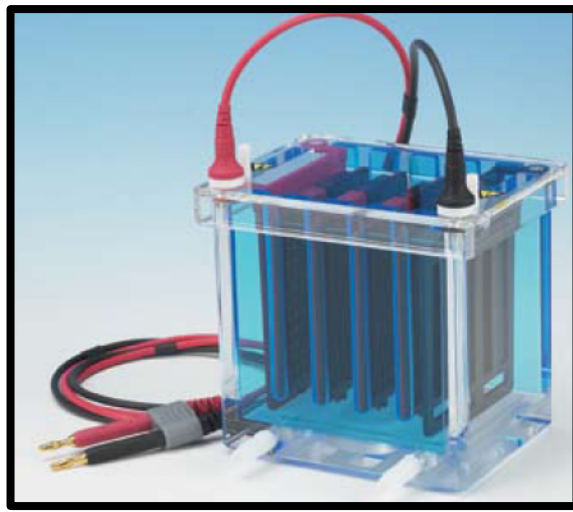
Metanolo: aiuta il legame delle proteine alla membrana in quanto rende meno forte il legame del SDS alle proteine (soprattutto nitrocellulosa).

SDS: può essere incluso nei tamponi (ca.0.1%) per aiutare il trasferimento delle proteine ad elevato peso molecolare. NB: corsa di tipo anodico. Interferisce però con il legame delle proteine alla membrana

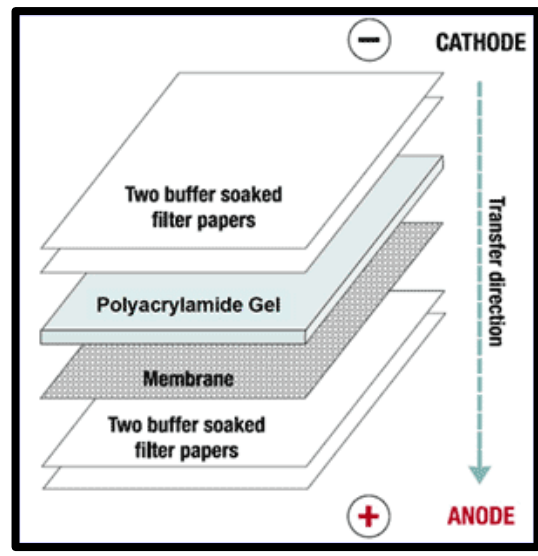
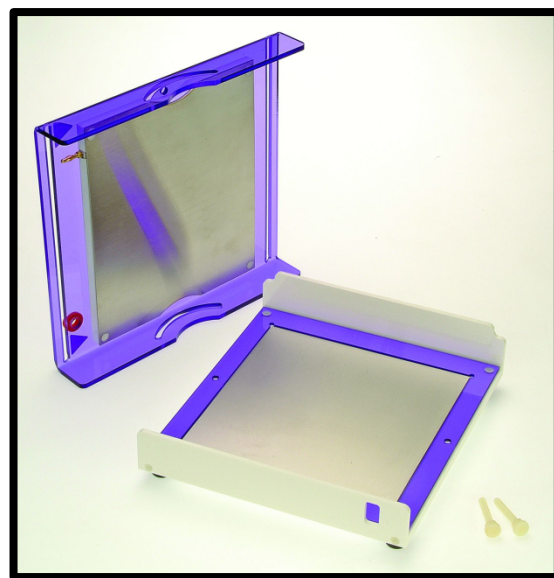
NB: vengono offerte diverse opzioni di trasferimento in termini di tempo richiesto. Ogni analisi di trasferimento deve essere ottimizzata valutando il tempo minimo richiesto per avere il massimo di trasferimento della proteina d'interesse. La scelta tra diverse tempistiche di trasferimento a volte viene fatta in base alle necessità operative, ovvero in quanto tempo avere il risultato finale del WB.



2) TRASFERIMENTO di PROTEINE - apparati

Wet



Semi Dry



Caratteristica	 Trasferimento Semi-dry	 Trasferimento Wet (Tank)
Velocità	VANTAGGIO: Molto veloce (15-60 minuti). Trasferimento "lampo".	SVANTAGGIO: Molto lento (da 1 ora a overnight).
Volume di Buffer	VANTAGGIO: Bassissimo (5-250 mL per esperimento). Economico e poco inquinante.	SVANTAGGIO: Altissimo (1-2 litri). Costoso e richiede smaltimento.
Allestimento e Pulizia	VANTAGGIO: Semplice e rapido. Meno ingombro, niente bagni di ghiaccio, pulizia minima.	SVANTAGGIO: Laborioso. Richiede assemblaggio complesso (spugne), preparazione buffer, pulizia dell'apparato.
Efficienza su proteine >100 kDa	SVANTAGGIO: SCONSIGLIATO. Bassa efficienza; le proteine grosse rimangono intrappolate nel gel.	VANTAGGIO: IDEALE. Eccellente, specialmente con trasferimenti lenti (overnight) a 4°C.
Efficienza su proteine <20 kDa	SVANTAGGIO: Rischio di "over-transfer" (la proteina attraversa la membrana e si perde).	VANTAGGIO: Maggiore controllo e ritenzione anche dei peptidi piccoli.
Qualità bande / Chiarezza	SVANTAGGIO: Rischio di bande indistinte o distorte. Problematico con membrane PVDF.	VANTAGGIO: Bande nitide, sharp. Massimo assorbimento delle proteine da parte della membrana.
Capacità	VANTAGGIO: Eccellente. Può trasferire più gel contemporaneamente (fino a 3-5).	SVANTAGGIO: Limitata (1-2 gel per tank standard).
Gestione calore	SVANTAGGIO: Riscaldamento. L'apparato è chiuso e può surriscaldarsi; richiede rigido controllo della tensione.	VANTAGGIO: Dissipazione ottimale. Il tampone freddo e il bagno di ghiaccio prevengono il surriscaldamento.

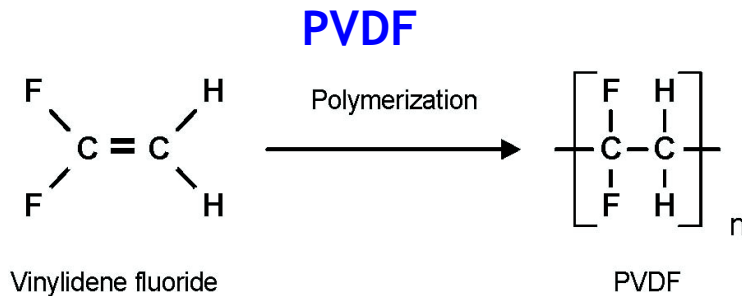
TRASFERIMENTO di PROTEINE - Scelta della membrana

Nitrocellulose:

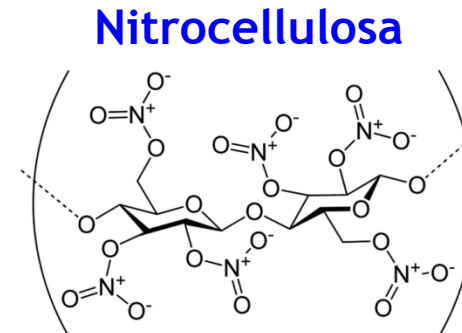
...”Despite the considerable amount of research that has been conducted since nitrocellulose was first used as a protein-binding membrane, the exact mechanism of that binding remains unknown.⁶ It is known that a number of forces are at work—specifically, **hydrophobic interactions**, **hydrogen bonding**, and **electrostatic interactions**—but a clear understanding of the exact effect and significance of each force has remained elusive”...

Polyvinylidene difluoride:

...”PVDF membrane was originally introduced to protein use as an ideal medium for the harsh chemical environment of N-terminal, or Edman degradation, sequencing. Even though PVDF is **very hydrophobic** and requires a prewetting step in alcohol, its high protein binding capacity, target retention, and resistance to cracking have made it an appealing membrane for general laboratory techniques”...



Resistente
Alta sensibilità
Possibile alto background



Facilmente idratabile
Basso background
Poco resistente

Importante: **scelta dei pori della membrana:**

0.45 μm - superiori ai 20 KDa
0.22 μm - circa 10-20 KDa
0.10 μm - minore 7 KDa

TRASFERIMENTO di PROTEINE - Scelta della membrana

Alcune considerazioni sulla scelta dei pori

E' difficile dare dei numeri circa le dimensioni delle proteine al momento che le dimensioni finali dipendono dalla strutturazione delle proteine (quando sono nella loro conformazione nativa) e dalla struttura che esse assumono quando sono denaturate e complessate con i vari detergenti. Il fatto che ad esempio ci si riferisca a una conformazione bastoncellare quando le proteine sono legate dall'SDS è una semplificazione.

R_{min} for proteins of different mass (assumendo una conformazione globulare - R_{min} o lineare - SDS rod)

Pori Membrana (Ø nm)	100	220	220	450	450	450	450
Protein M (kDa)	5	10	20	50	100	200	500
R_{min} (nm)	1.1	1.42	1.78	2.4	3.05	3.84	5.21
SDS rod (nm)	3.7	7.4	14.8	37	74	148	370
Beta sheet ext. (nm)	17	34	68	170	340	680	1700

Poro (Ø nm) R_{min} proteina (nm)

$$220 / 1.42 = 155$$

$$220 / 1.78 = 124$$

$$450 / 2.4 = 187$$

$$450 / 3.05 = 147$$

Il valore del rapporto si può assumere descrivere la probabilità che la proteina vada a collidere con la membrana. Più alto è il diametro del poro e più basso è il valore del raggio della proteina minore sarà la probabilità che la proteina vada a contattare la membrana e quindi a legarsi sopra.

Importante: **scelta dei pori della membrana:**

0.45 µm / 450 nm - superiori ai 20 KDa

0.22 µm / 220 nm - circa 10-20 KDa

0.10 µm / 100 nm - minore 7 KDa

PVDF and Nitrocellulose: Which Should You Use?

Protein binding capacity. PVDF has a protein binding capacity of 170 to 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.
Nitrocellulose has a protein binding capacity of 80 to 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Since PVDF has a higher protein binding capacity => higher sensitivity => higher background noise.

Binding interactions. Nitrocellulose: hydrophobic interactions
PVDF: hydrophobic and dipole interactions.

NB: nitrocellulose requires the use of methanol in the transfer buffer which may reduce the pore size of the gel and cause high molecular weight proteins to precipitate.

Physical characteristics. Nitrocellulose is brittle and fragile
PVDF is more durable and has higher chemical resistance (stripping and reprobing)

Pore size. Both membranes come in typical pore sizes of 0.1, 0.2 or 0.45 μm .

When you are detecting a protein loaded at low levels or when quantification is considered critical, you should always choose the smaller size membrane.

TIPS:

Nitrocellulose is ideal in detecting low molecular weight proteins
PVDF is more suitable for detecting higher molecular weight proteins.

TRASFERIMENTO di PROTEINE - Visualizzazione delle proteine

Perchè è importante visualizzare le proteine dopo trasferimento su membrana?

- Qualità del trasferimento (problemi dovuti a bolle, etc.);
- Verifica della normalizzazione del campione - metodo elettivo per dimostrare normalizzazione tra campioni;
- Permette di “tagliare” la membrana per effettuare riconoscimenti multipli;
- Orientamento del gel - corrispondenza campione-tracciato elettroforetico.

Ponceau S Staining (il più diffuso)

Ponceau S (sodium salt) may be used to prepare a stain for rapid reversible detection of protein bands on nitrocellulose or PVDF membranes (Western blotting), as well as on cellulose acetate membranes. Common stain formulations include 0.1% (w/v) Ponceau S in 5% acetic acid or 2% (w/v) Ponceau S in 30% TCA and 30% sulfosalicylic acid. Destaining is made in blocking solution.

Revert 700 Total Protein Stain - (LI-COR)

Revert 700 Total Protein Stain (licor.com/revert) is a near-infrared fluorescent membrane stain used for total protein detection and normalization. Revert staining is imaged at 700 nm, and fluorescent signals are proportional to sample loading. (da LI-COR manuals)

Stain-Free Imaging Technology (Biorad)

Stain-free technology utilizes a proprietary trihalo compound to enhance the fluorescence of tryptophan amino acids when exposed to UV light. A 58 Da moiety is covalently bound to the tryptophan (UV photoactivation), enabling the detection of proteins down to 20-50 ng. The addition of the moiety does not interfere with downstream steps and allows detection of the proteins in the gel, as well as following transfer during Western blotting. (Da BIO-RAD manuals)

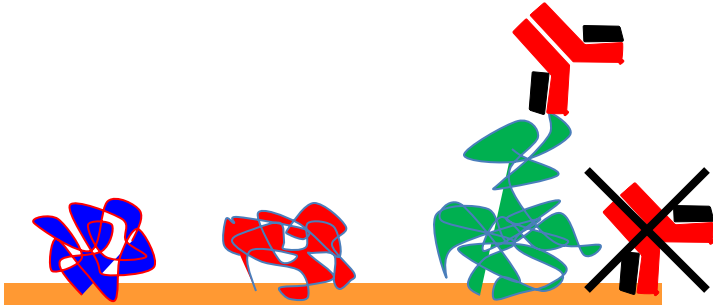
Others..

Quale scegliere? => Compatibilità con le analisi che devono seguire

a) se devo solo visualizzare le proteine - scelta dipende dalla sensibilità

b) se devo effettuare un riconoscimento anticorpale => il legame del colorante/sistema di rilevazione delle proteine non deve alterare il riconoscimento anticorpo/antigene (solitamente si utilizzano delle colorazioni reversibili come quella con Rosso Ponceau)

TRASFERIMENTO di PROTEINE - Riconoscimento anticorpale



E' necessario evitare che gli anticorpi si leghino in modo aspecifico alla membrana (sono proteine che possono legarsi alle membrane al pari delle proteine sottoposte al trasferimento WB!)

Passaggi in un riconoscimento anticorpale:

1) Bloccaggio della membrana con una soluzione proteica

Solitamente BSA 5% (g/v) - SATURAZIONE

2) Riconoscimento con anticorpo primario

Se l'anticorpo primario non è marcato in modo da permettere il suo rilevamento diretto (ad esempio coniugato con un fluoroforo) è necessario procedere all'utilizzo di un anticorpo secondario

3) Riconoscimento con un anticorpo secondario

Solitamente coniugato con un enzima che catalizza una reazione che ne permette la rilevazione.

L'anticorpo secondario è un'anticorpo in grado di riconoscere le porzioni costanti degli anticorpi, e deve essere scelto in modo che riesca a riconoscere l'anticorpo primario. Ad esempio, se **l'anticorpo primario** è stato sviluppato in **coniglio**, **l'anticorpo secondario** deve essere in grado di legare le porzioni costanti degli anticorpi di coniglio e quindi deve essere stato sviluppato in un altro organismo.

Bloccaggio della membrana

1) Prima opzione: soluzione fatta con NFDM (Non Fat Dry Milk 3-5%)

Attenzione al fatto che ad esempio il latte contiene le caseine che sono proteine altamente fosforilate e che quindi potrebbero dare problemi di “sottrazione anticorpale” quando nei riconoscimenti vengono utilizzati anticorpi anti fosfo serine, treonine, tirosine;

Il latte contiene biotina e quindi se il metodo di rilevamento prevedono l'intervento del sistema biotina/streptavidina potrebbe dare problemi;

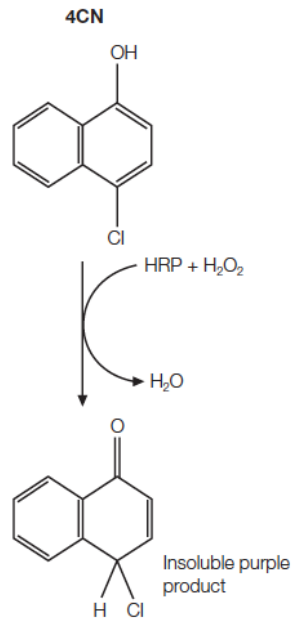
2) Seconda opzione: soluzione fatta con BSA (3-5%);

3) Terza opzione: composti non proteici.

NB: cosa è coinvolto nel sistema di riconoscimento? Nella soluzione di bloccaggio non devono essere presenti molecole che interferiscano.

Metodi colorimetrici

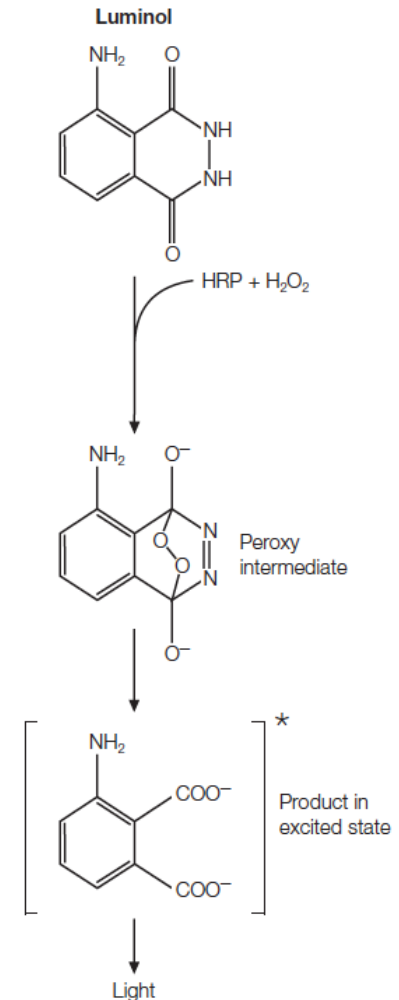
Si sfrutta una reazione enzimatica dove l'enzima coniugato all'anticorpo catalizza la formazione di un colorante insolubile che quindi precipita a livello della banda proteica legata dal ab. La rilevazione avviene sulla membrana dove sono state trasferite le proteine.



NB: è ovvio che i due metodi offrono sensibilità diverse. In pratica i sistemi basati sulla chemiluminescenza sono più sensibili rispetto ai metodi colorimetrici. Per fornire qualche indicazione di massima, i metodi colorimetrici in genere possono fornire delle sensibilità che si aggirano tra i 500-100-10 pg, mentre i metodi di chemiluminescenza si spingono fino a circa 1 pg. La sensibilità del metodo è comunque un fattore complicato e multifattoriale che dipende, oltre che dal sistema di rilevazione, anche da altri fattori, come ad esempio la bontà del trasferimento, gli ab primari e secondari utilizzati, etc...

Metodi chemiluminescenza

Si sfrutta una reazione enzimatica dove l'enzima coniugato all'anticorpo catalizza una reazione che porta all'emmissione di fotoni. La rilevazione prevede l'utilizzo di una lastra autoradiografica.

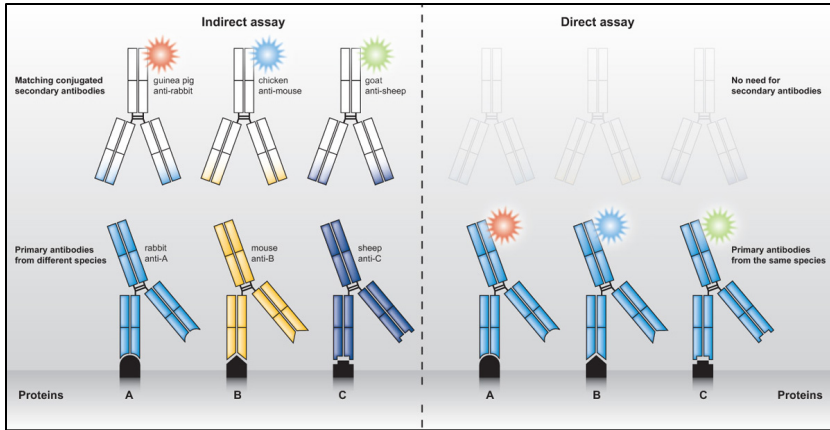


Fluorescence-based detection in WB analysis

Secondary Ab

Primary Ab

Indirect vs direct assay



Easy procedures for labeling antibodies with fluorophores

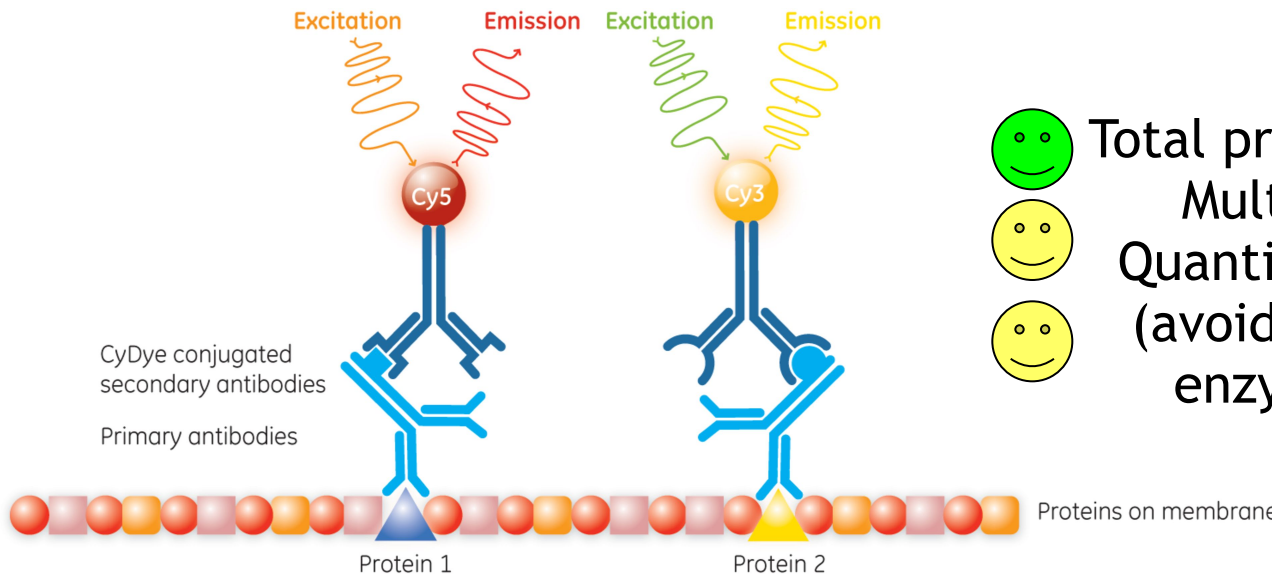
Filters

Exc. Em.

460/490 - 518/546
 520/545 - 577/613
 625/650 - 675/725
 650/675 - 700/730
 755/777 - 813/860

SCANNER

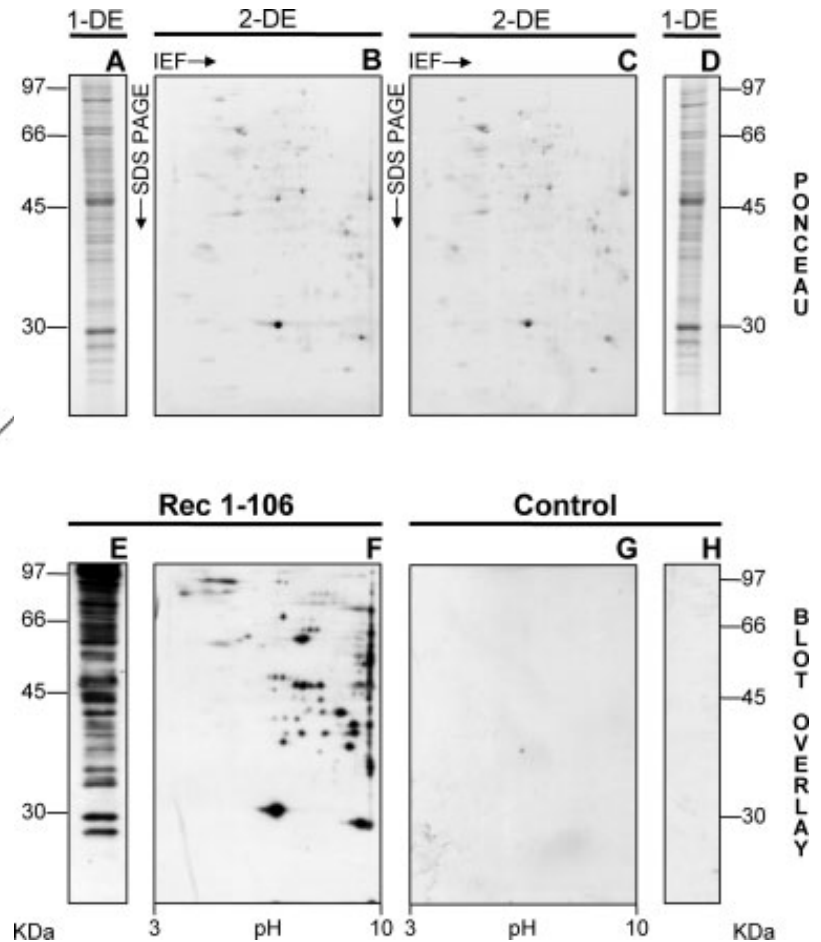
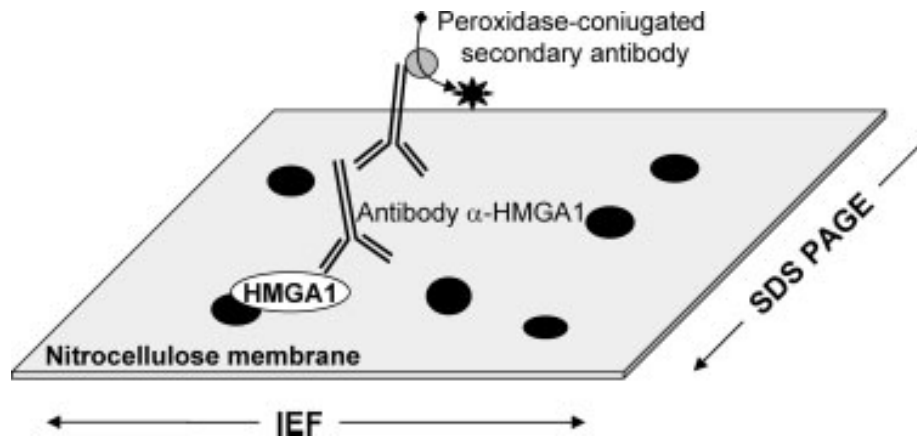
CCD-based instruments



Total protein normalization
 Multiplex detection
 Quantitative information
 (avoid the variability of enzymatic reaction)

TRASFERIMENTO di PROTEINE

Utilizzo del riconoscimento anticorpale in esperimenti d'interazione proteina/proteina
(trattata più approfonditamente nelle interazioni proteina/proteina)



NB: quando si parla di riconoscimento anticorpale o riconoscimento p/p si deve considerare il fatto che l'interazione possa avvenire. Nel caso di interazioni p/p le proteine interagenti devono preservare la loro struttura nativa. Nel caso di riconoscimenti anticorpali, l'epitopo riconosciuto deve essere nella sua forma nativa. Molto spesso gli epitopi riconosciuti dagli Abs vengono riconosciuti anche nel contesto di una proteina denaturata come nel caso di un riconoscimento effettuato dopo SDS-PAGE, in altri casi, l'epitopo è un cosiddetto epitopo conformazionale (ovvero l'ab riconosce un epitopo che è formato da parti distanti lungo la sequenza primaria che sono a contatto e formano l'epitopo solo nella conformazione strutturata della proteina) che viene perso durante il processo di denaturazione che avviene per la presenza del SDS.