

Blot

In molecular biology and genetics, a blot is a method of transferring proteins, DNA or RNA, onto a carrier (for example, a nitrocellulose PVDF or nylon membrane). In many instances, this is done after a **gel electrophoresis**, transferring the molecules from the gel onto the blotting membrane, and other times adding the samples directly onto the membrane. After the blotting, the transferred proteins, DNA or RNA are then visualized by one or more different methods.

Common blot methods are :

- **Southern blot for DNA**
- **Southwestern blot for Protein-DNA**
- **Northern blot for RNA**
- **Reverse Northern blot for RNA**
- **Western blot for proteins**
- **Far-Western blot for Protein-Protein complexes**
- **Eastern blotting for post-translational modification**
- **Far-Eastern blot for Lipids, Drugs and Hormones**
- **Dot blot**
- **Slot blot**

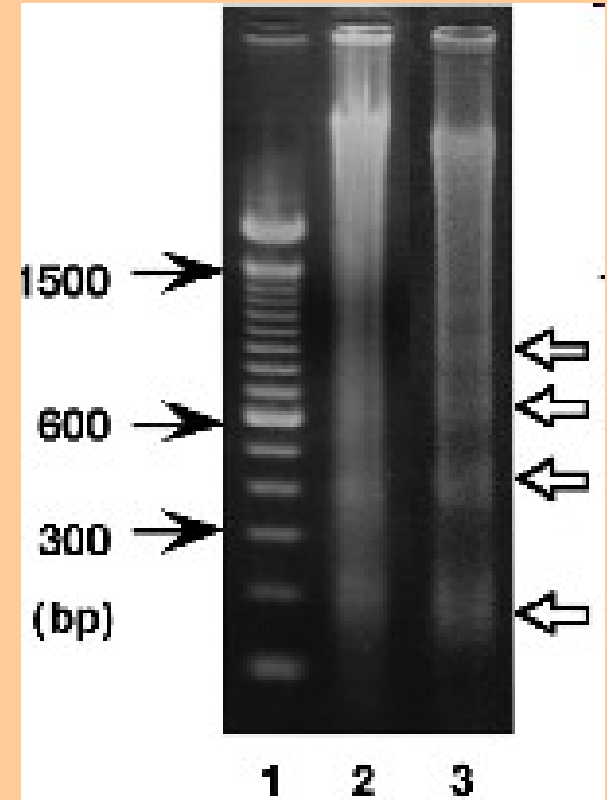
Southern Blot

Il *Southern Blot* è una tecnica usata in biologia molecolare per rivelare la presenza di **specifiche sequenze** di DNA in una **miscela complessa**. Prende il nome dal suo inventore, Edwin Mellor Southern.

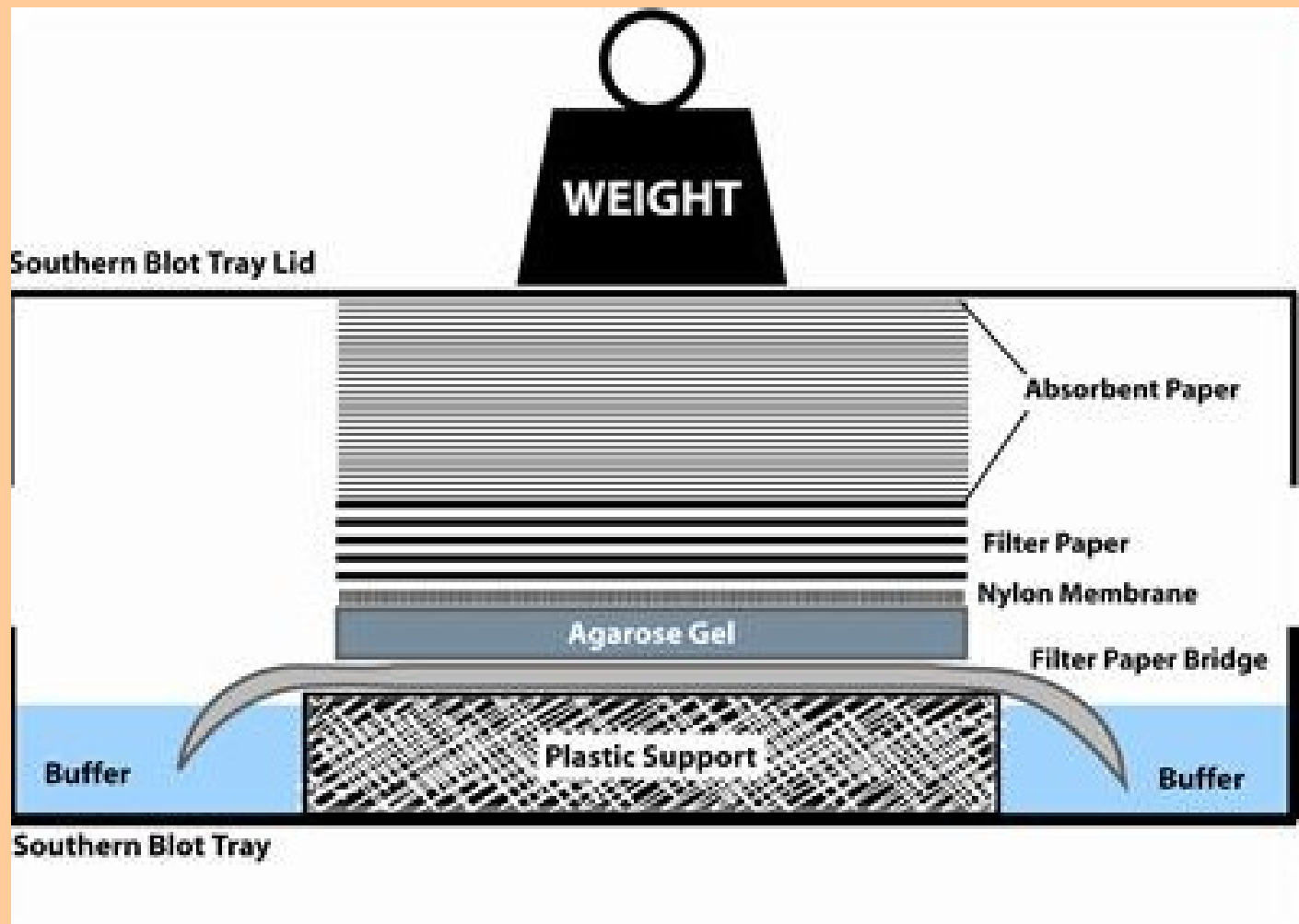
Preparazione del campione per il SB

Un campione eterogeneo di dna genomico viene trattato con enzimi di restrizione e successivamente sottoposto ad elettroforesi su gel d'agarosio o di poliacrilammide.

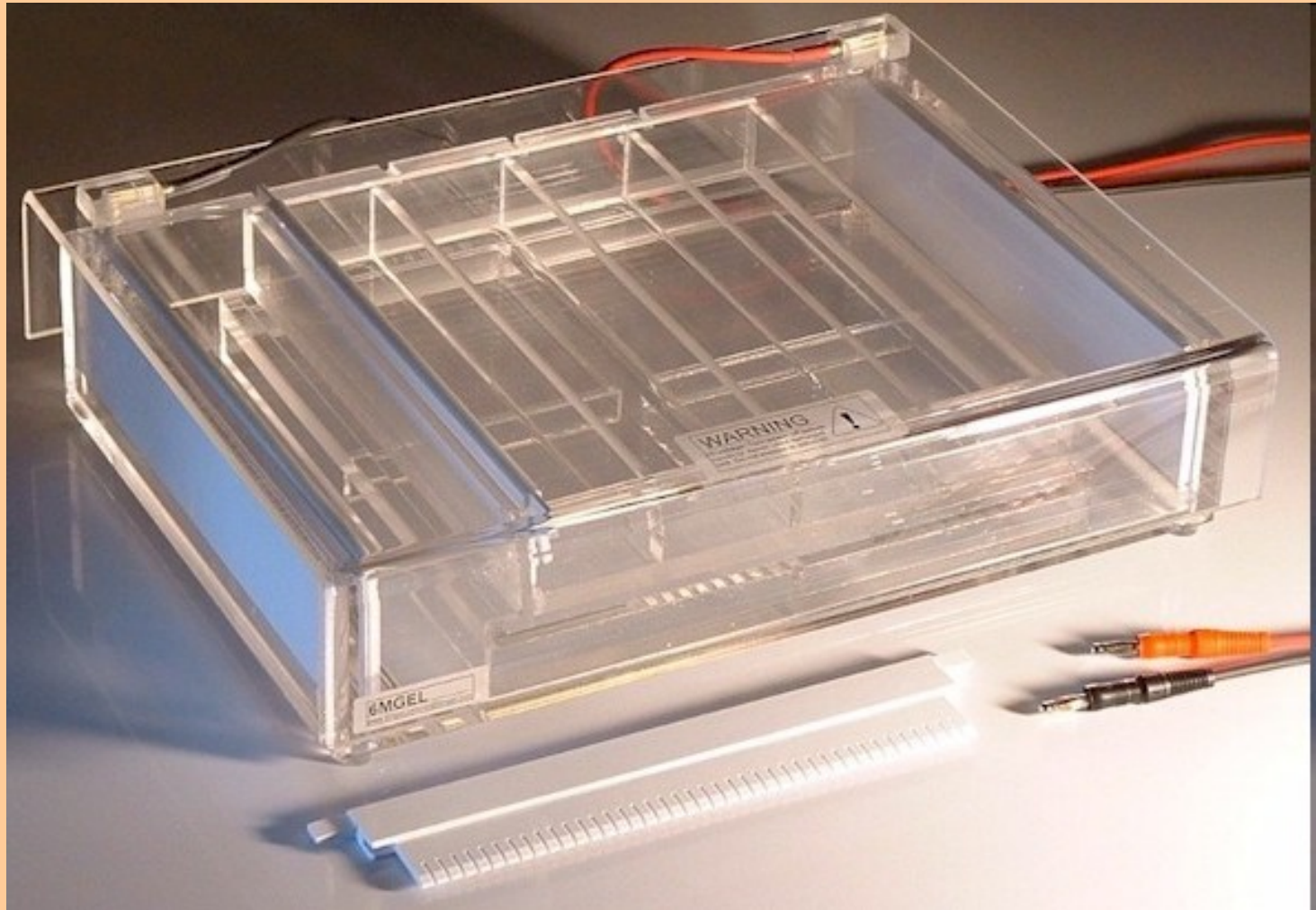
Nel gel sarà possibile osservare uno **smear**, ossia una striscia continua; non si vedranno bande nette perché il DNA genomico digerito con l'enzima di restrizione ha tantissimi punti di taglio, quindi sul gel si troveranno tantissimi frammenti che migreranno con velocità diverse in base al diverso peso molecolare.



- Il gel viene quindi immerso in una **soluzione fortemente alcalina** (NaOH) per circa 15 minuti che permette la denaturazione del DNA.
- Il gel viene quindi coperto da una **membrana di nitrocellulosa** e sopra di questa viene posta una pila di fogli assorbenti.
- Per **capillarità** la soluzione tenderà ad attraversare il gel, il foglio di nitrocellulosa e risalirà nei fogli assorbenti. I sali trascinano i segmenti di DNA perfettamente in verticale, depositandoli sullo strato di nitrocellulosa con il quale i segmenti instaurano legami elettrostatici. Da notare che in questo passaggio il DNA non sale grazie a una forza elettrica come nella prima elettroforesi ma solo per capillarità.

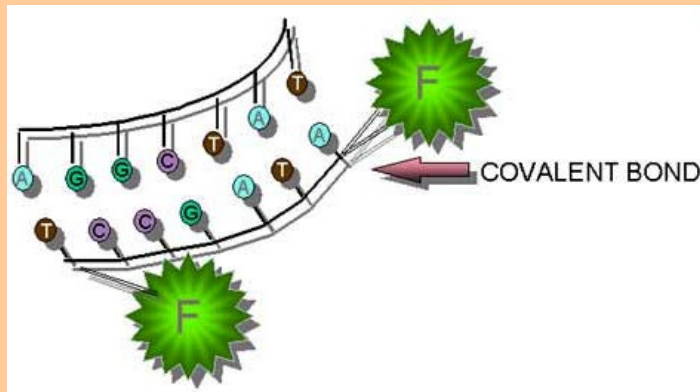


DNA southern blot & gel electrophoresis system



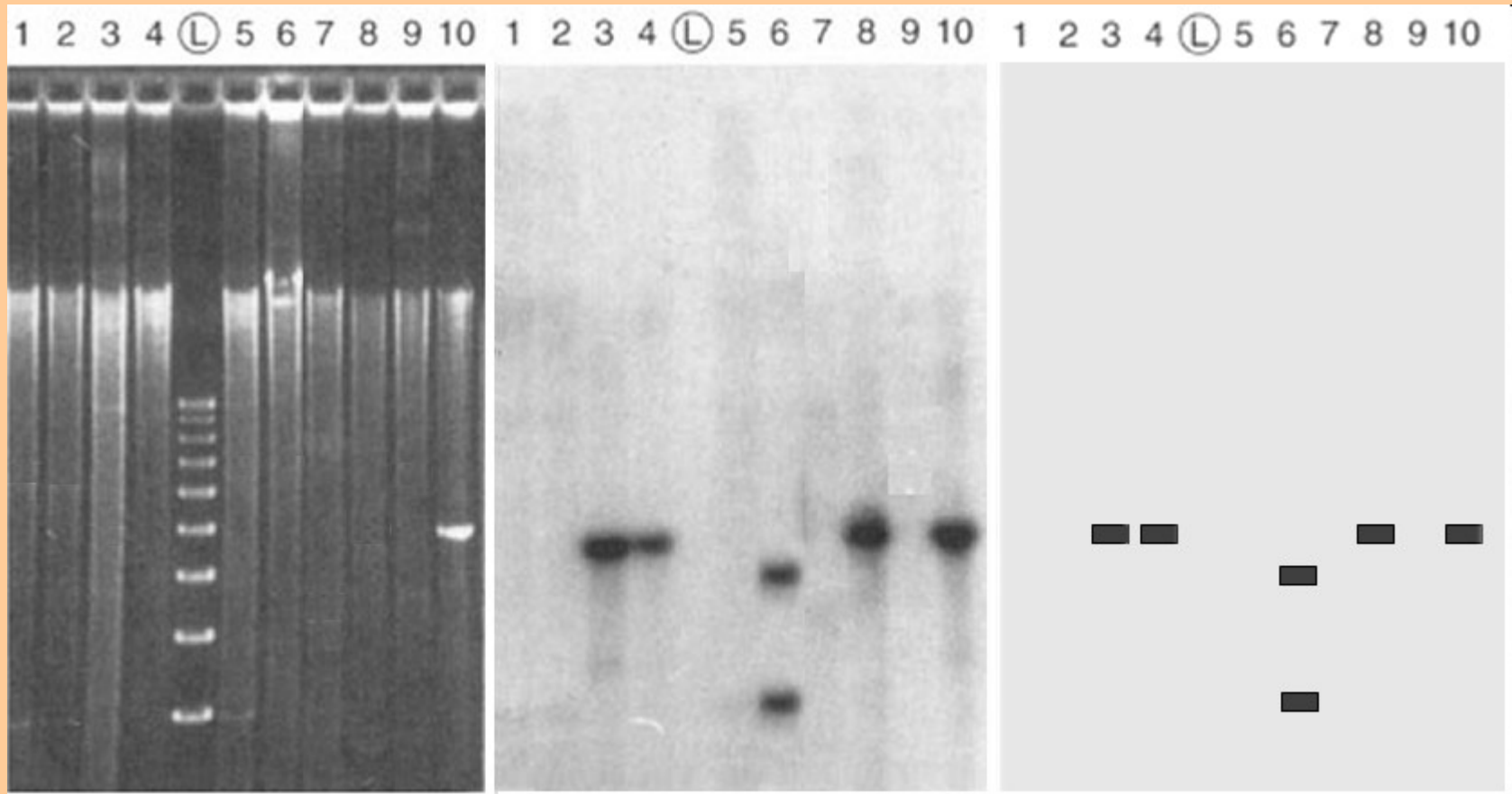
Identificazione della sequenza di interesse

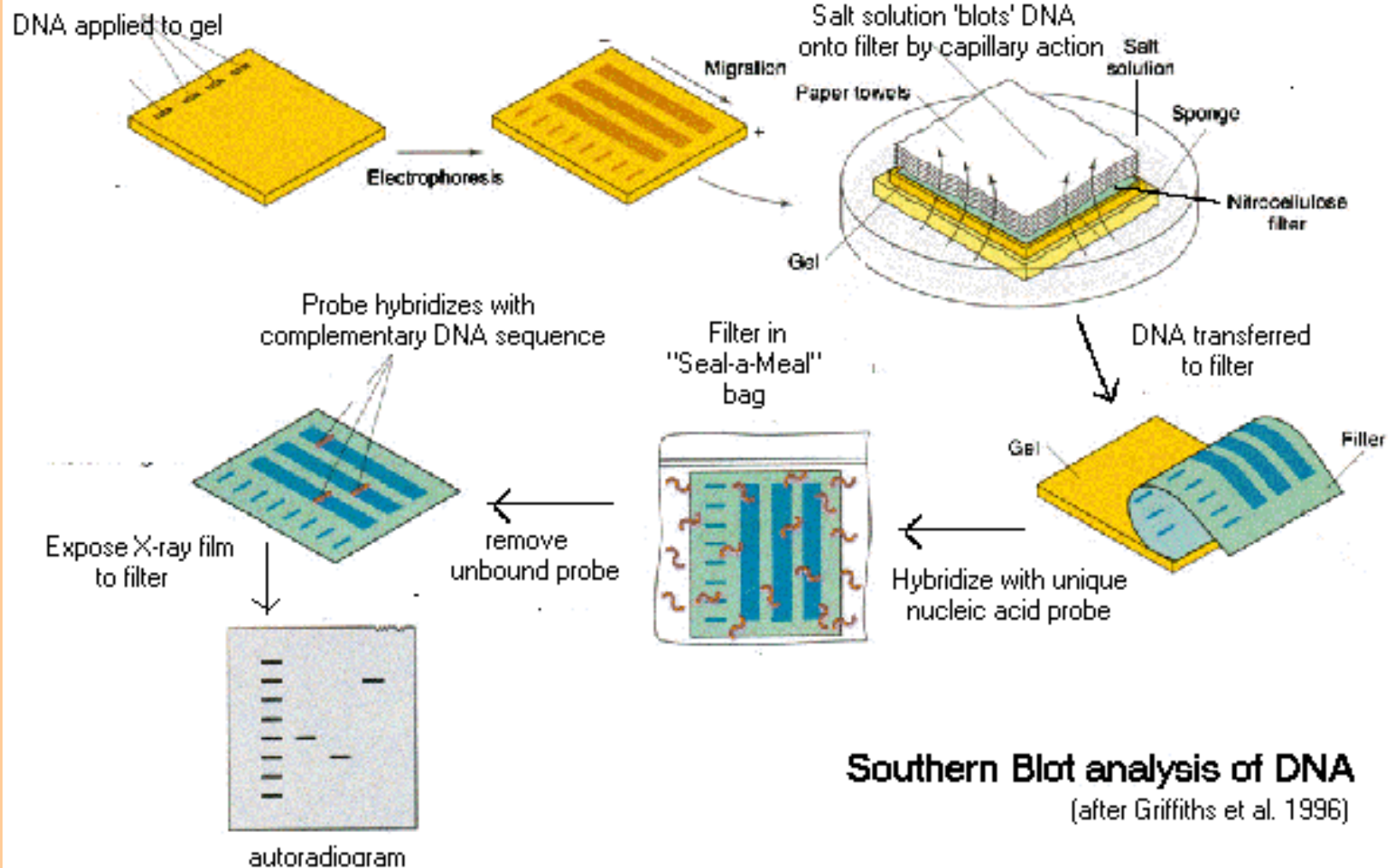
- Il foglio di nitrocellulosa viene separato dal gel e immerso in una soluzione contenente una **sonda marcata** in vario modo (fluorescenza, radioattività, ecc..) che ibridizza con sequenze di DNA complementari presenti sul foglio, identificandole. L'ibridizzazione della sonda con il DNA può avvenire con diversi gradi di "stringenza" a seconda delle finalità dell'esperimento, consentendo una ibridizzazione con specificità anche inferiore al 100%.
- A seguito di lavaggio della nitrocellulosa per eliminare le sonde non ibridate, si fa una lastra fotografica che metta in evidenza dove la sonda ha legato il dna genomico.



Sonda fluorescente

Risultato di un Southern Blot





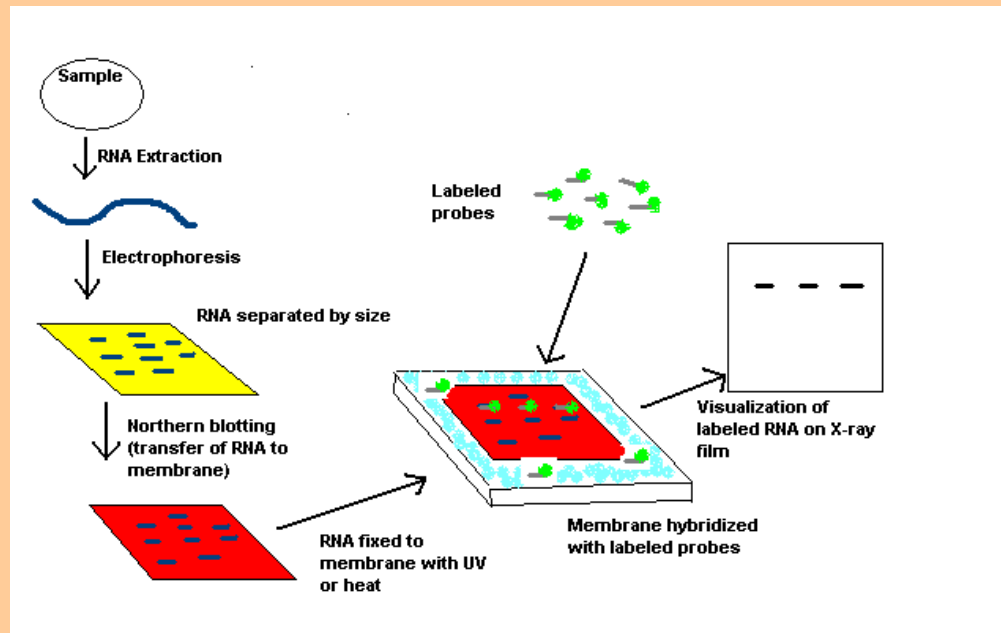
Northern Blot

Il *Northern Blot* è una tecnica che permette di visualizzare ed identificare l'**RNA** purificato da un campione, in particolare per studiare l'espressione genica.

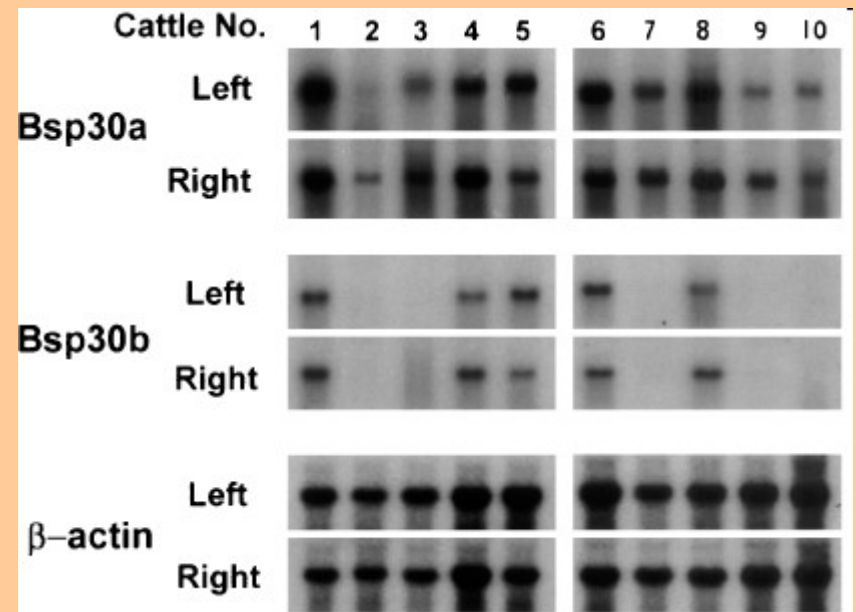
Il nome è derivato per assonanza dalla tecnica analoga per il DNA (Southern blot).

Dal punto di vista operativo la tecnica è simile al southern blot usato per il DNA, con alcune differenze:

- **l'RNA è molto più sensibile alle nucleasi usare tamponi preparati con acqua DEPC e materiale autoclavato ed indossare sempre i guanti.**
- **l'RNA tende a formare strutture secondarie stabili in soluzione; per fare in modo che la mobilità elettroforetica sia solo dipendente dalla lunghezza del frammento, l'RNA deve essere preventivamente denaturato (solitamente esponendolo ad alte temperature). Inoltre, la corsa elettroforetica deve essere eseguita in presenza di agenti denaturanti, solitamente **formaldeide** e **formammide**.**
- **il legame del RNA con la membrana è debole, viene quindi stabilizzato mediante irradiazione con raggi UV che creano legami covalenti (crosslinking).**



Esempio di utilizzo di NB per valutare l'espressione genica.



Western Blot

Il western blot o immunofissazione è una tecnica biochimica che permette di identificare una determinata **proteina** in una miscela complessa mediante il riconoscimento da parte di **anticorpi specifici**; in generale, per facilitare il riconoscimento, la miscela di proteine viene prima separata in base alle loro dimensioni (o peso molecolare) utilizzando un **gel di poliacrilammide**. Successivamente le proteine vengono trasferite su di un supporto, che comunemente è una membrana di nitrocellulosa o PVDF, e quindi si procede al riconoscimento vero e proprio della proteina mediante l'utilizzo di un anticorpo specifico.

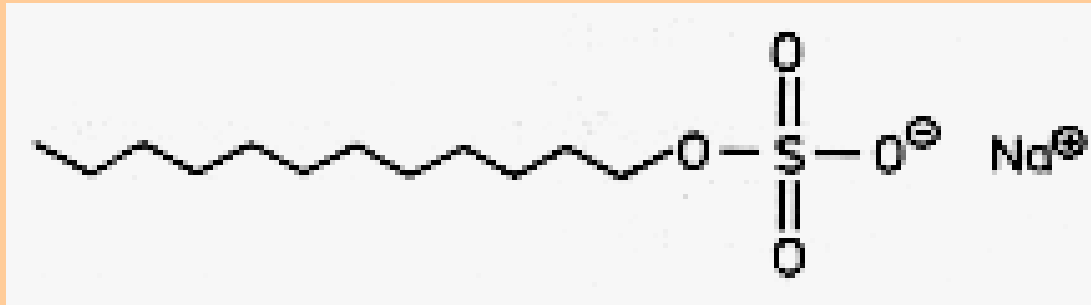
Sodium DodecylSulphate PoliAcrylamide

Gel Electrophoresis

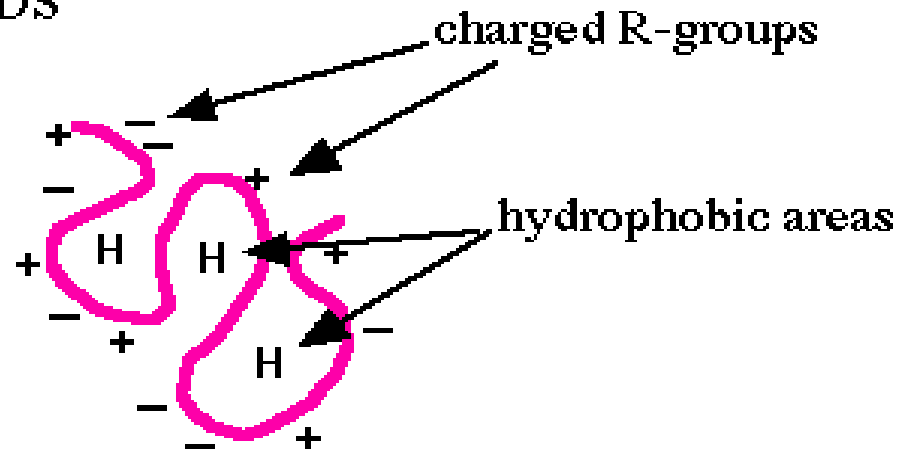
SDS-PAGE

L'**SDS-PAGE** (Sodium Dodecyl Sulphate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis, ossia elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di sodio dodecil solfato) è una tecnica analitica che permette l'analisi di estratti proteici.

Il principio su cui si basa questa tecnica è **l'attività denaturante dell'SDS**; questo è un detergente composto da una testa idrofilica ed una coda idrofobica ed è in grado di interagire con le proteine in un rapporto costante 1.4g SDS ogni g di proteina. La separazione avviene quindi per differenza fra pesi molecolari visto che il rapporto massa carica per ogni proteina denaturata con SDS rimane costante.



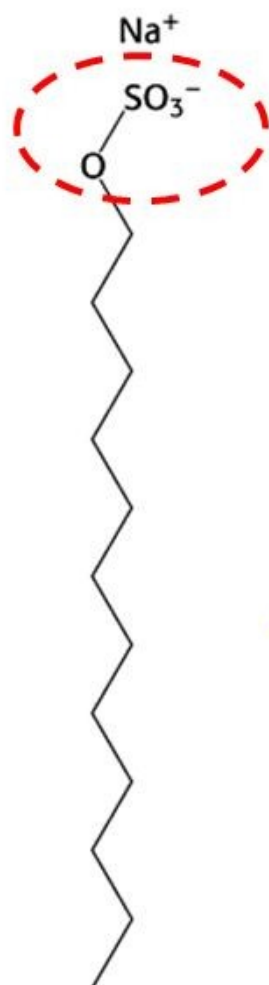
BEFORE SDS



AFTER SDS



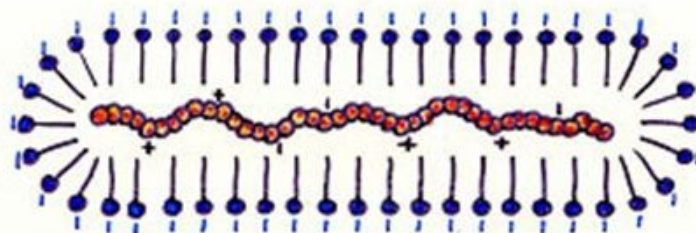
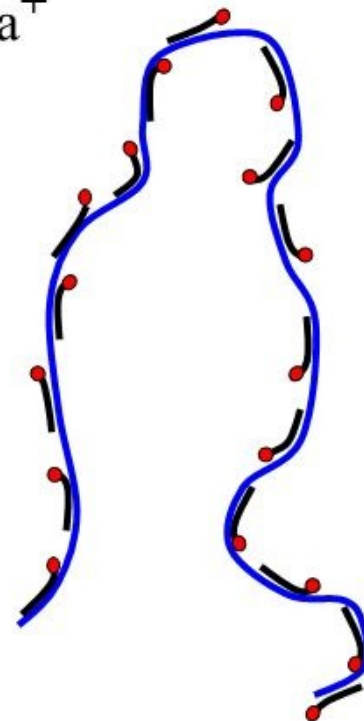
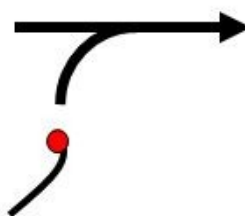
Sodio Dodecil Solfato



Sodio dodecil solfato
(SDS)

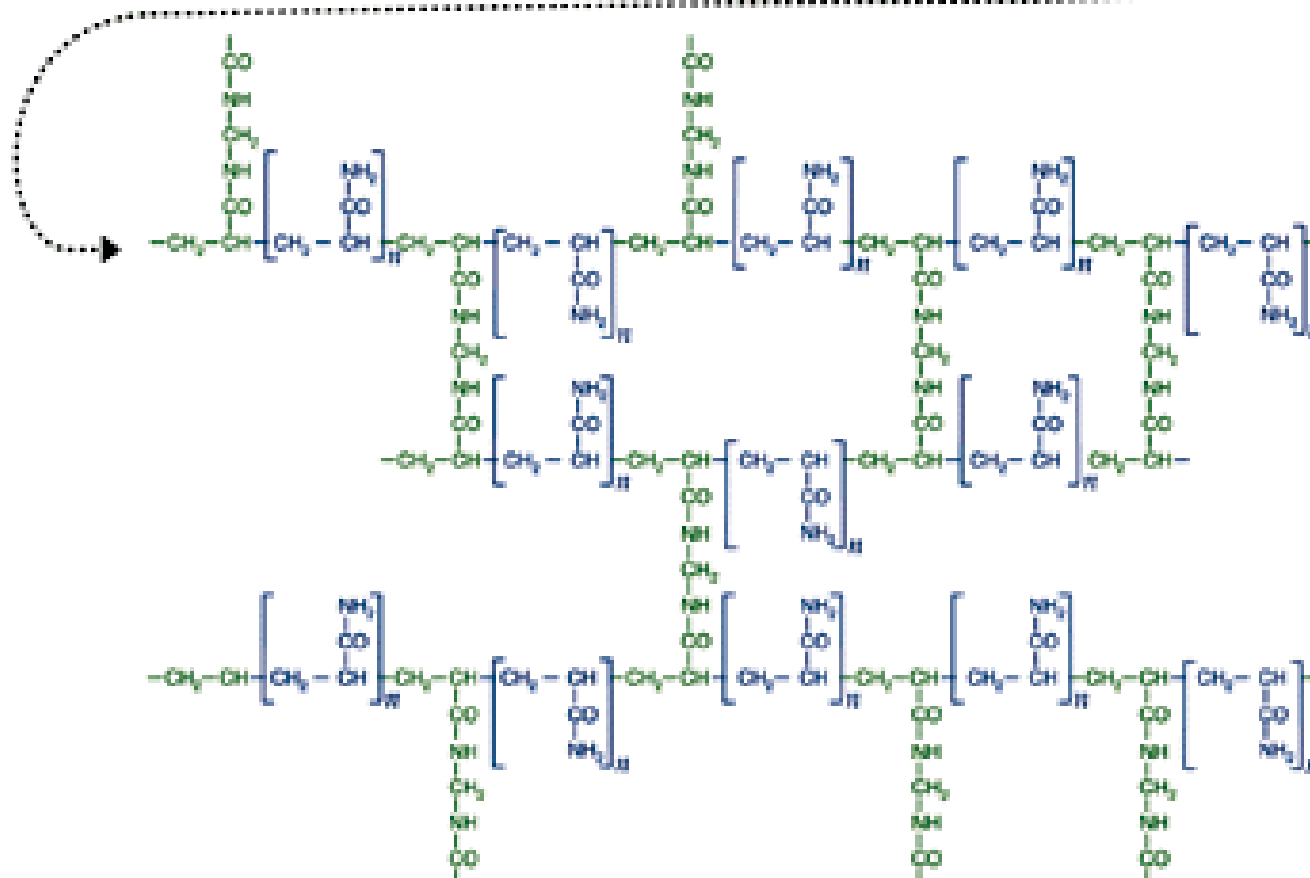
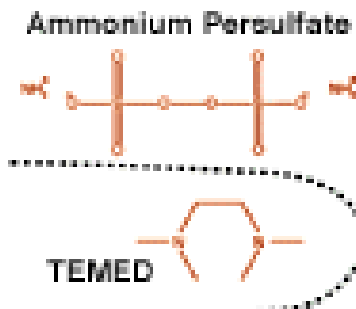
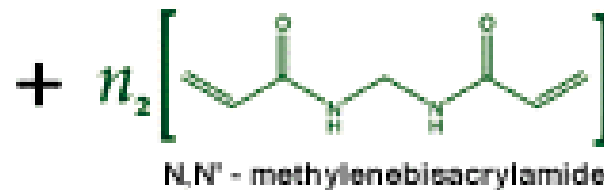


proteina

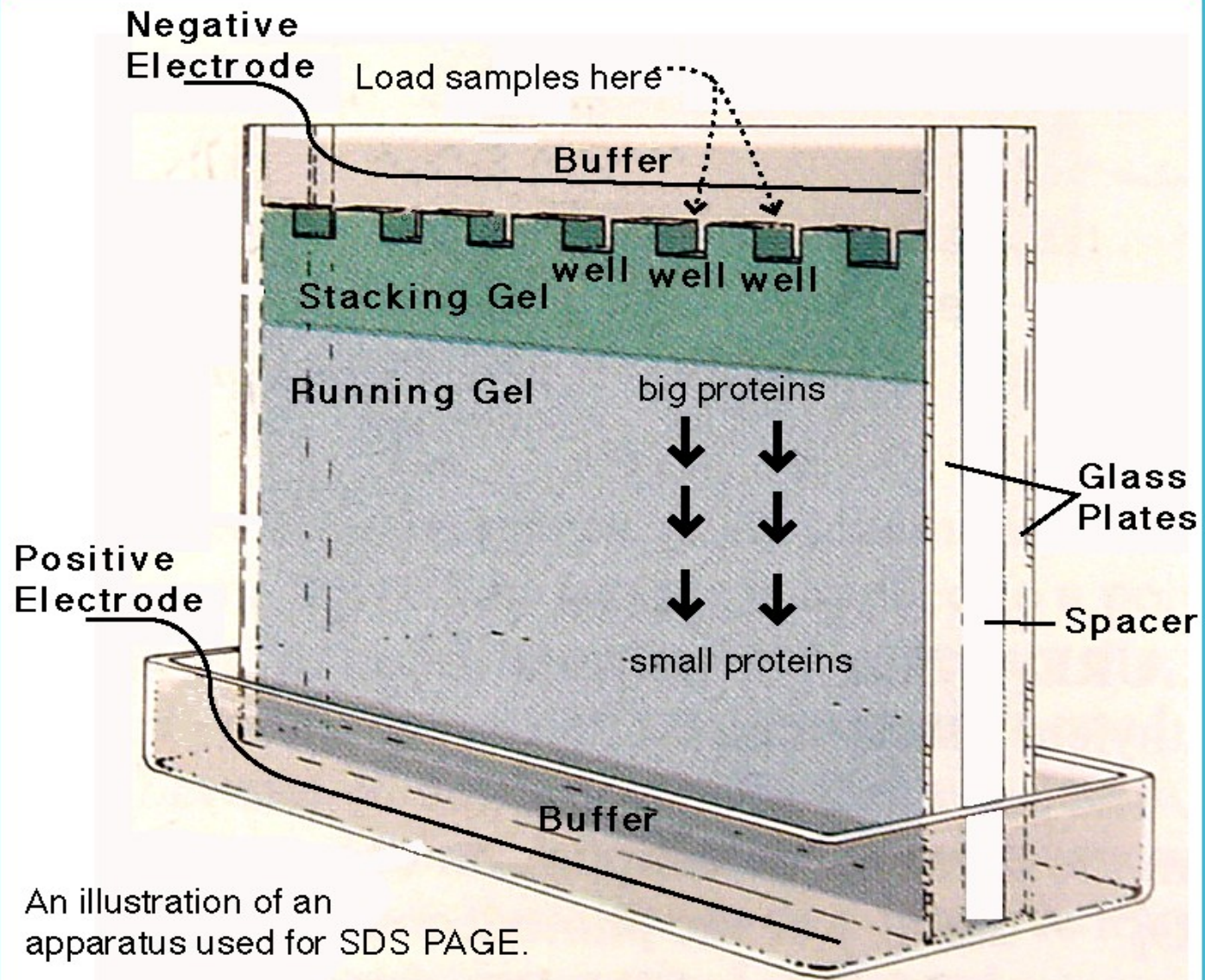


Polyacrylamide Gel

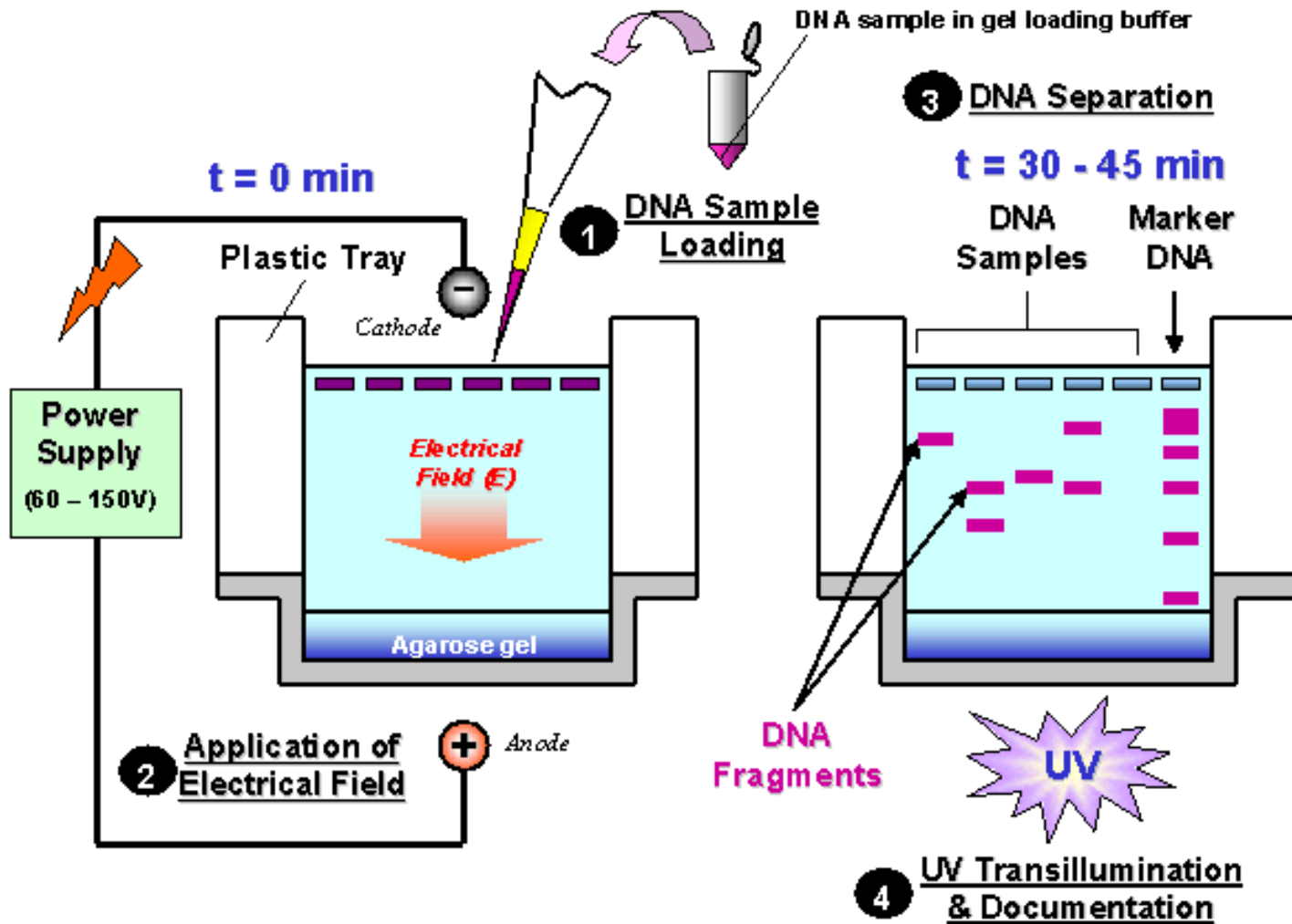
- E' un gel costituito dalla polimerizzazione di monomeri di acrilamide.
- Può essere continuo o discontinuo (stacking gel + running gel).
- Può contenere SDS (gel denaturante) oppure no (gel nativo).



The Polyacrylamide Matrix

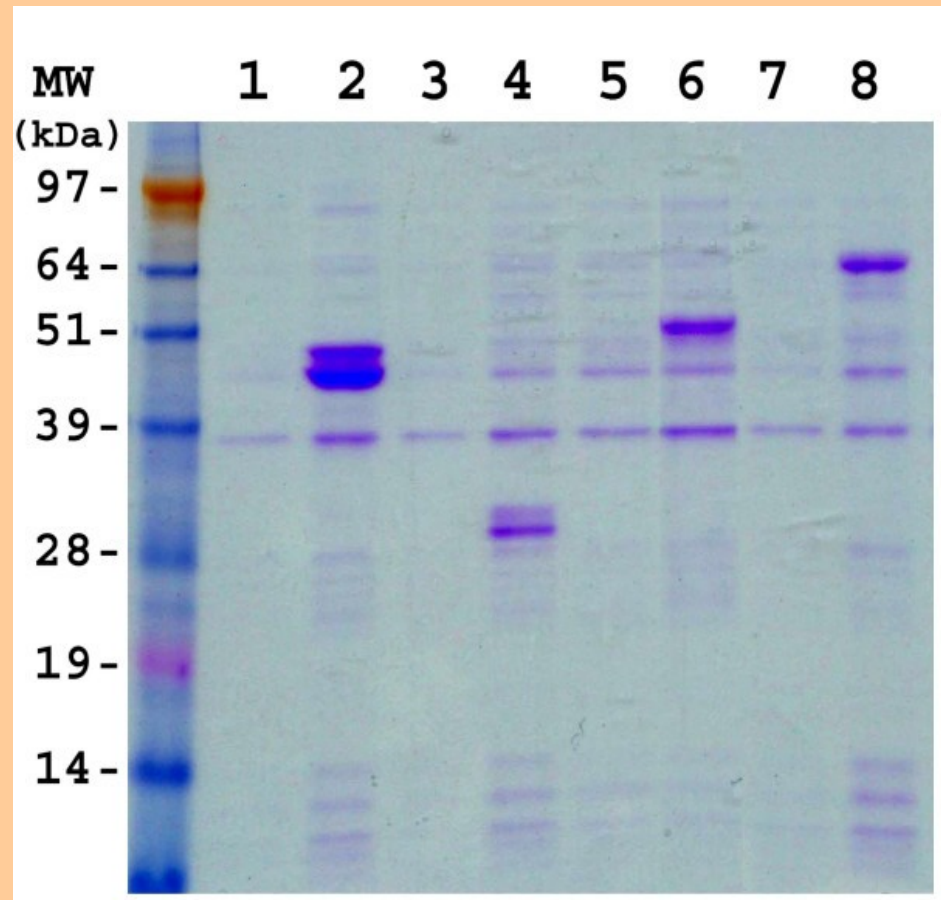


PoliAcrylamide Gel for DNA

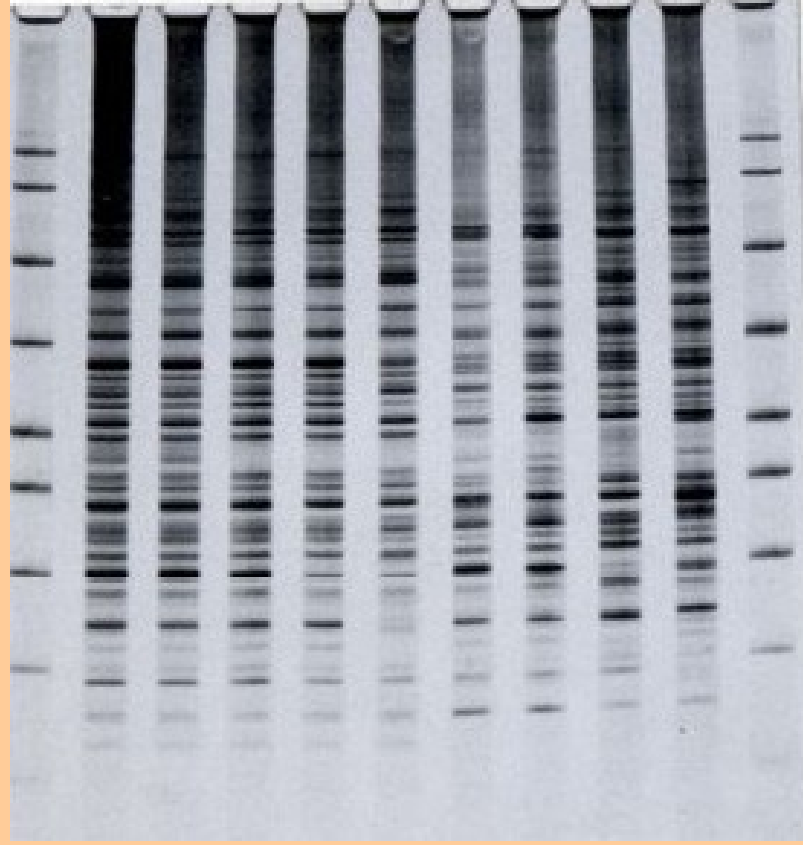


Una volta corso il gel, le proteine possono essere visualizzate mediante colorazione con blu di Comassie oppure trasferite sulla membrana per il Western Blot.

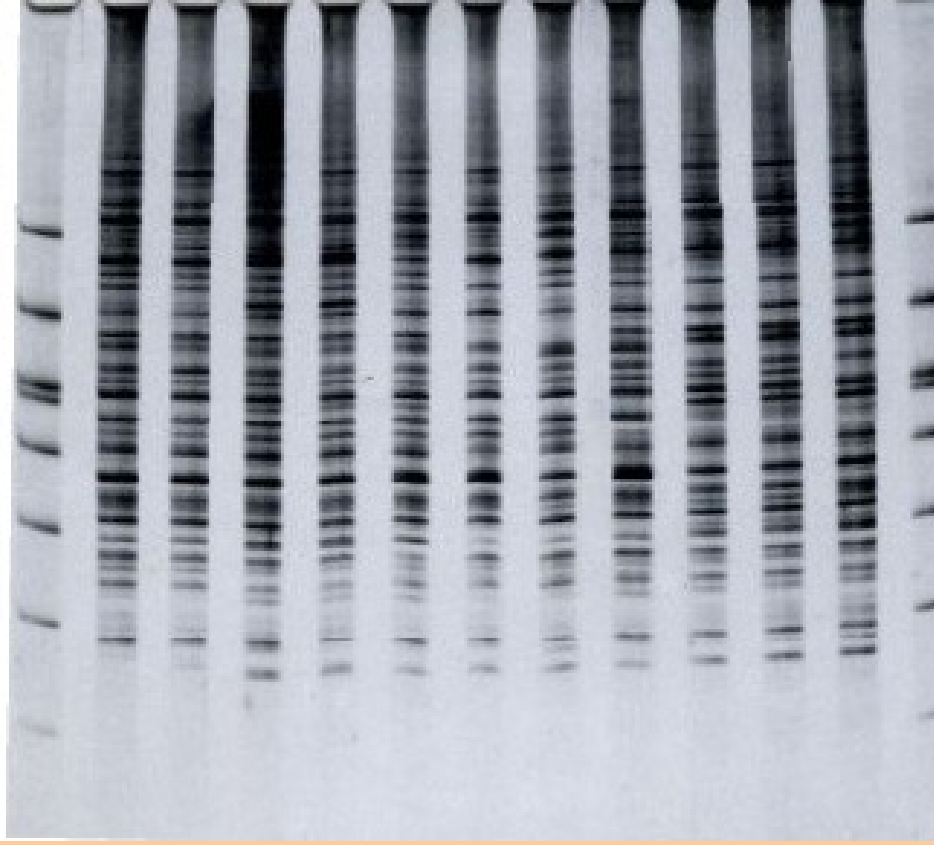
Esempio di gel colorato con Blu di Comassie



marker
0124
0125
0128
01220
01212
0123
01217
01218
01214
marker

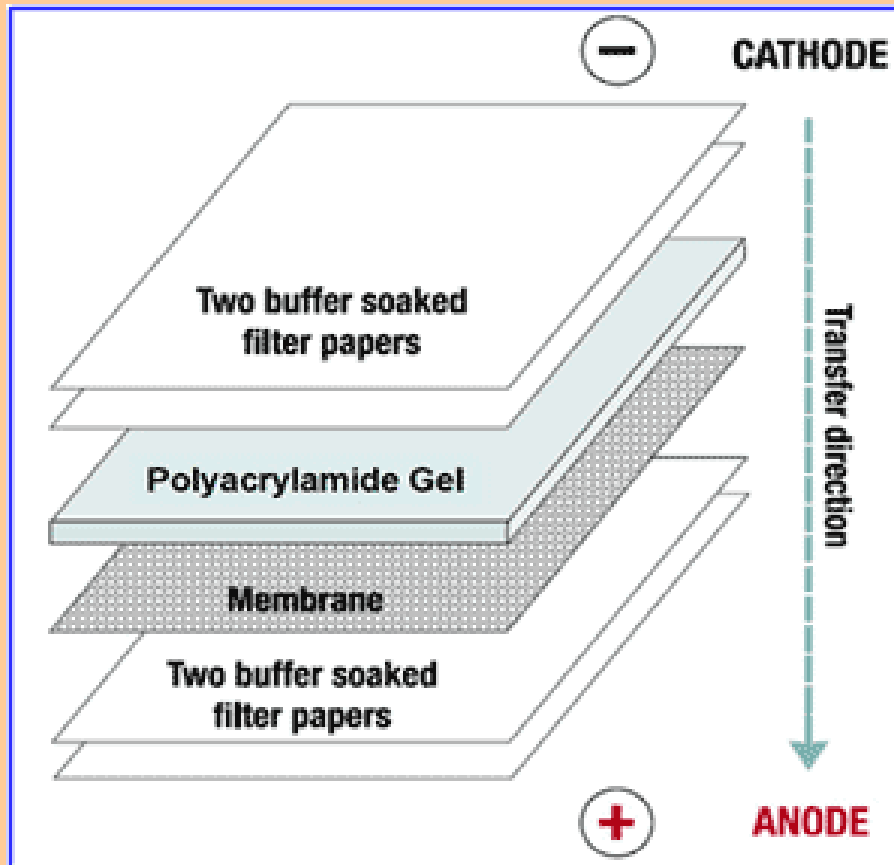


marker
0120
01215
0129
01211
0126
01219
01210
0122
01213
01216
0121
marker

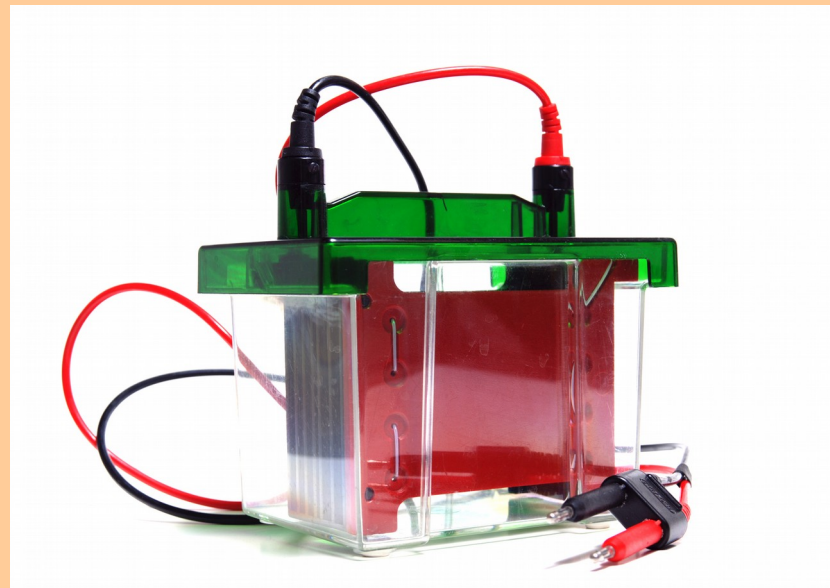
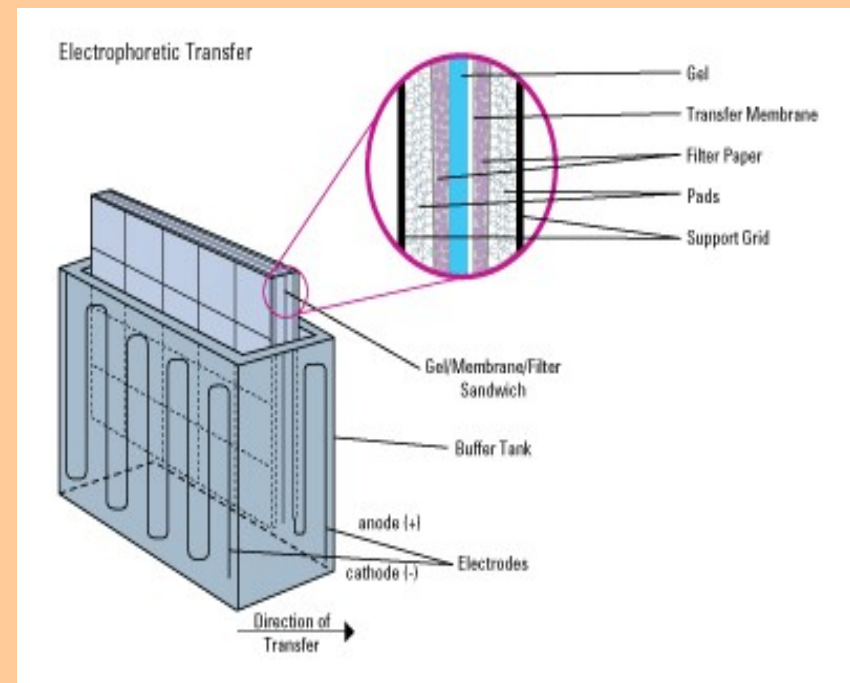


Western Blot

A differenza del Southern Blot, dove il trasferimento avviene per capillarità, in questo caso avviene mediante l'applicazione di un campo elettrico.

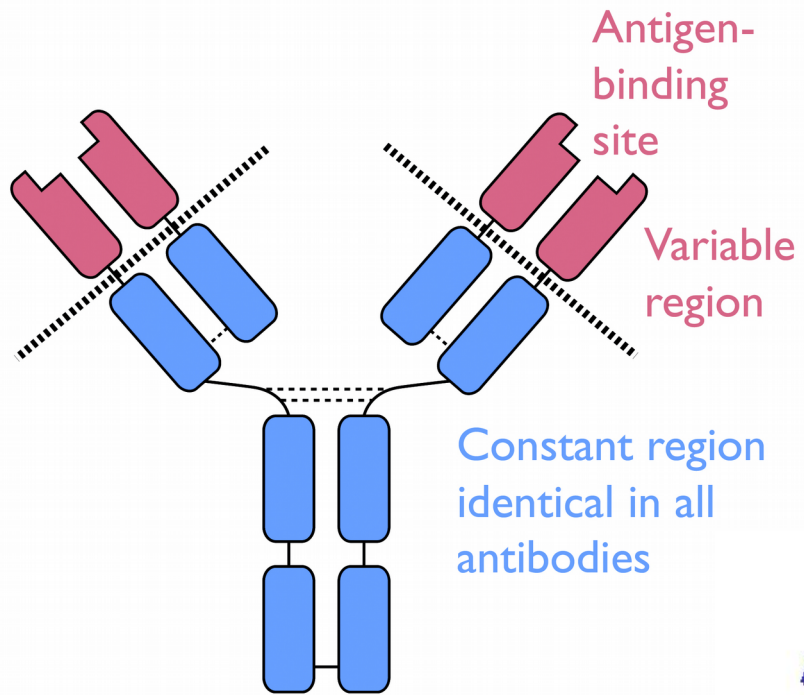


Le proteine, cariche negativamente per la presenza dell' SDS, migrano dal gel verso la membrana.



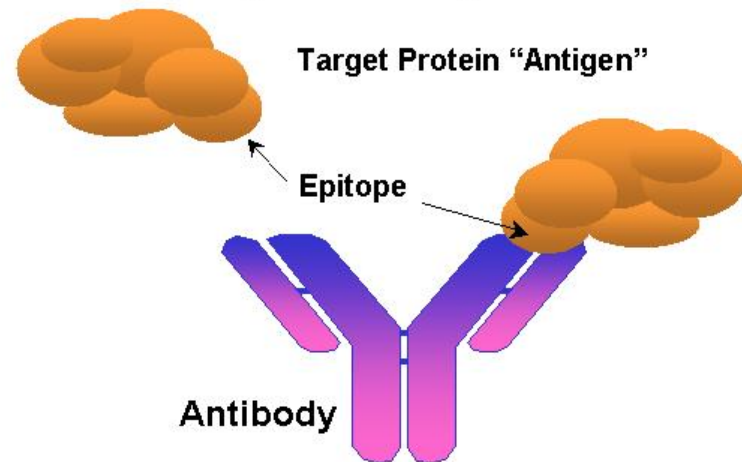
La proteina di interesse viene rivelata sulla membrana mediante l'utilizzo di un **anticorpo specifico e di un sistema di rivelazione**.

I sistemi più comuni utilizzano un anticorpo primario ed uno secondario (che a sua volta riconosce il primario), quest'ultimo coniugato ad un enzima (**perossidasi o fosfatasi alcalina**) che, in presenza di un opportuno substrato, dà origine ad un prodotto colorato e quindi visibile oppure ad una reazione che emette chemioluminescenza rilevabile per mezzo di una lastra fotografica.



Antibody-antigen binding

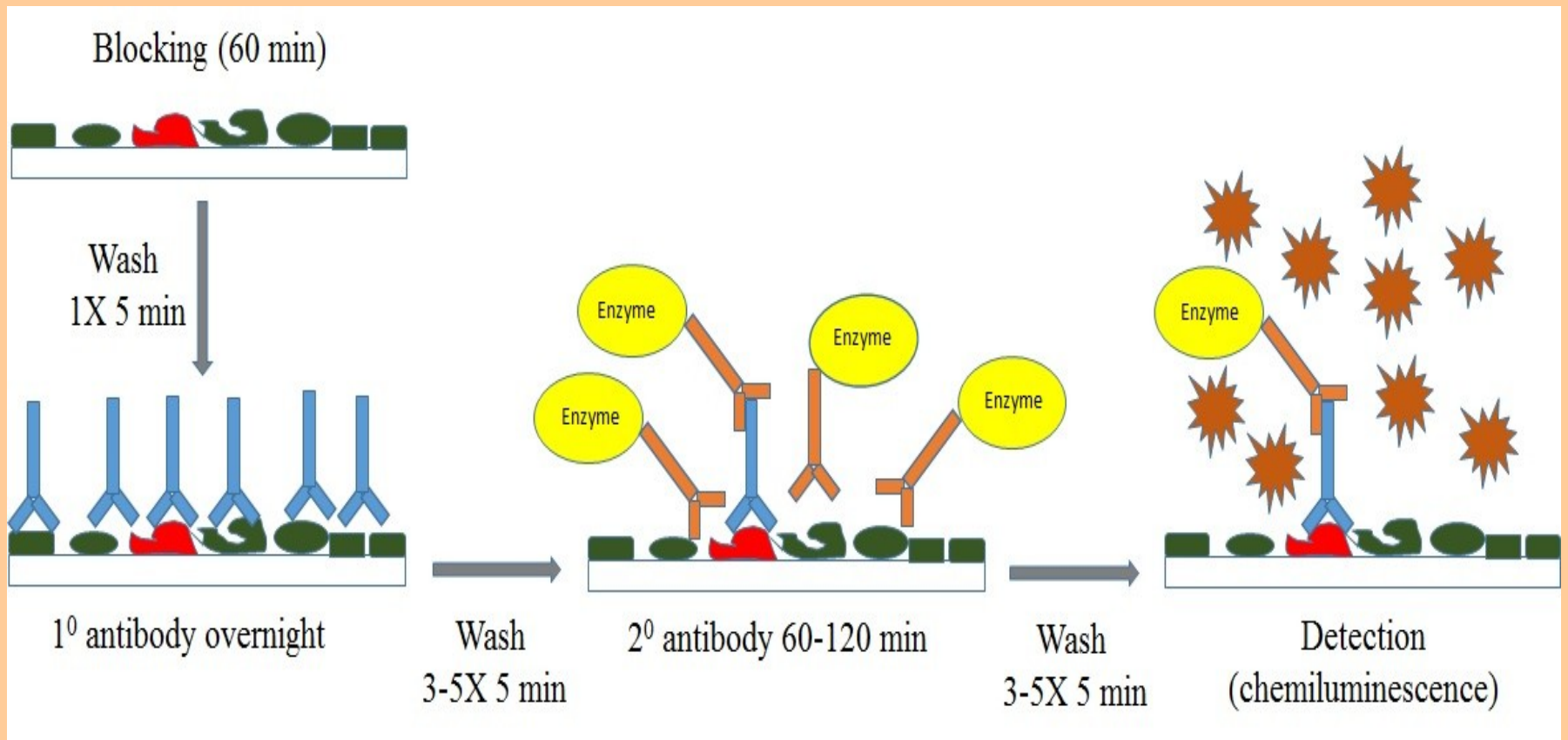
Antibody-Antigen Binding

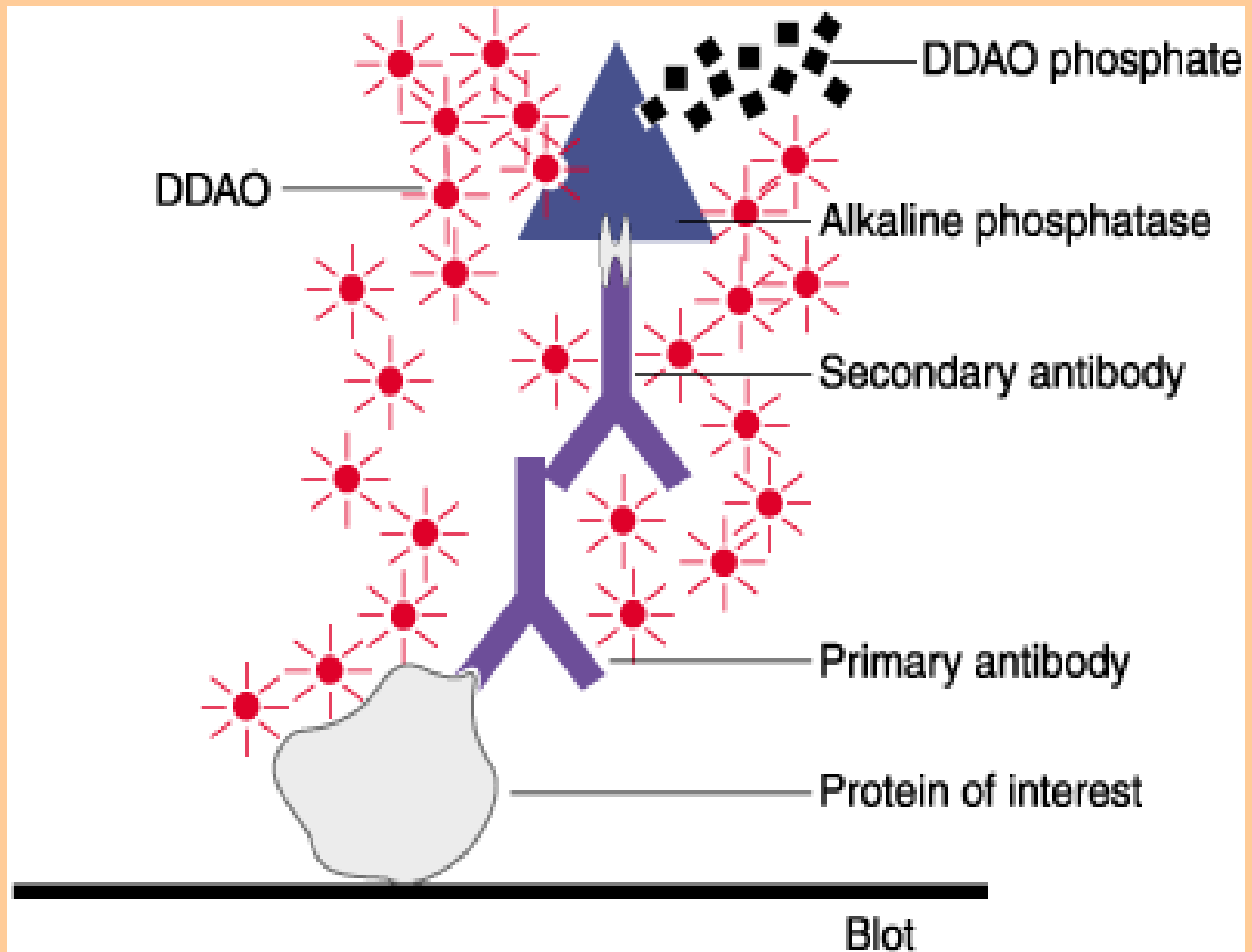


Normalmente si usano due anticorpi:

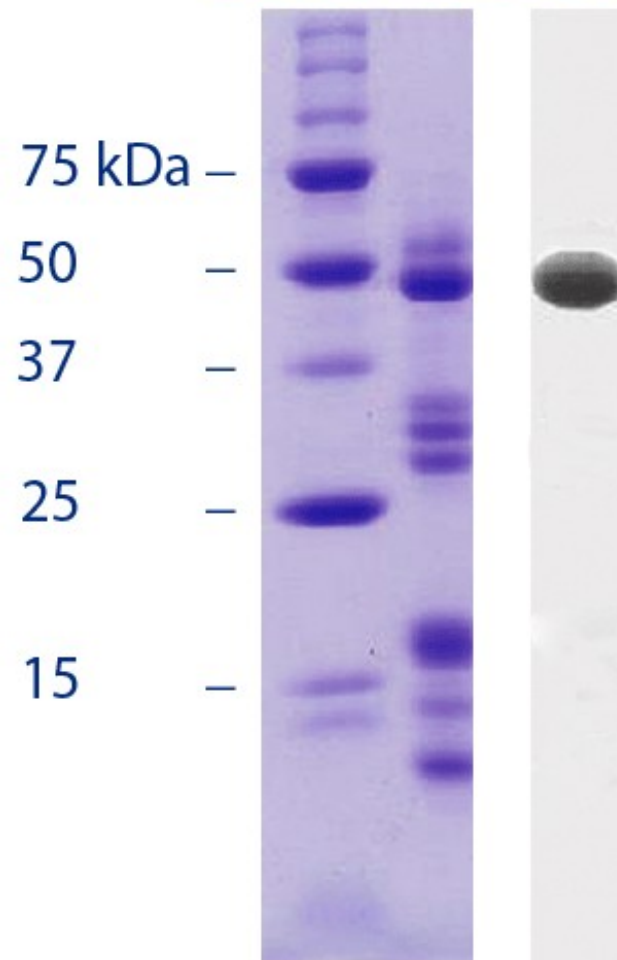
Anticorpo primario: riconosce la proteina di interesse

Anticorpo secondario: riconosce la regione costante dell'anticorpo primario. E' coniugato ad un enzima per la rivelazione





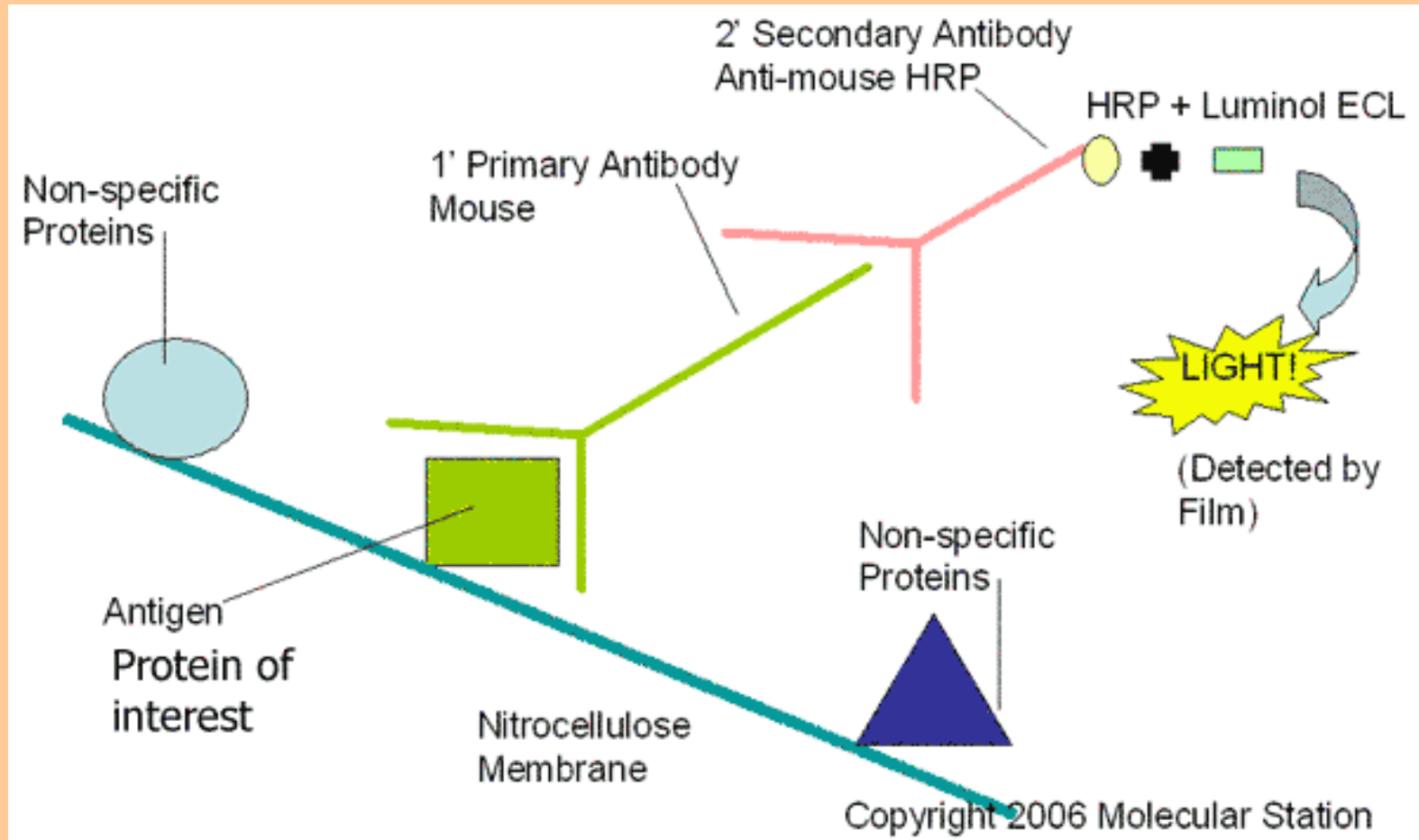
WESTERN blot



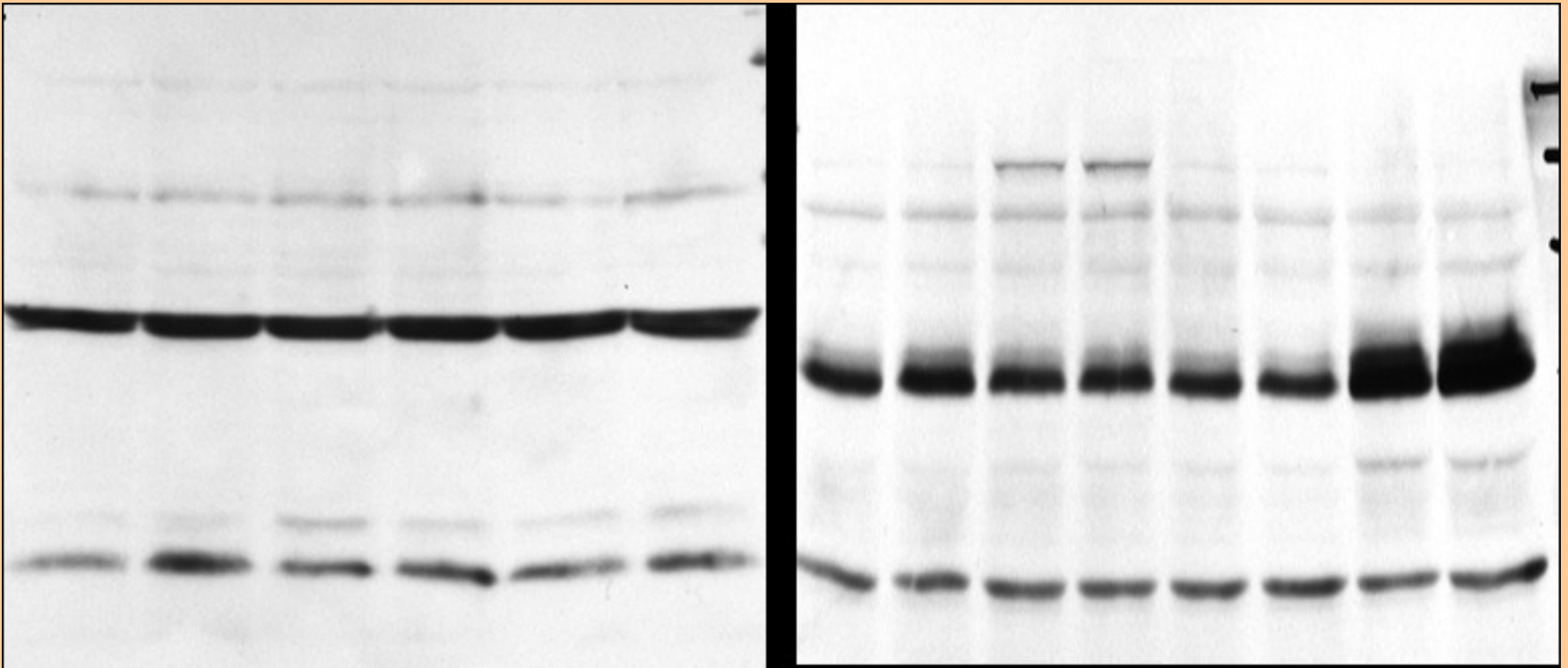
www.genosphere-biotech.com

12% SDS-PAGE
Antiserum dilution: 1:2000

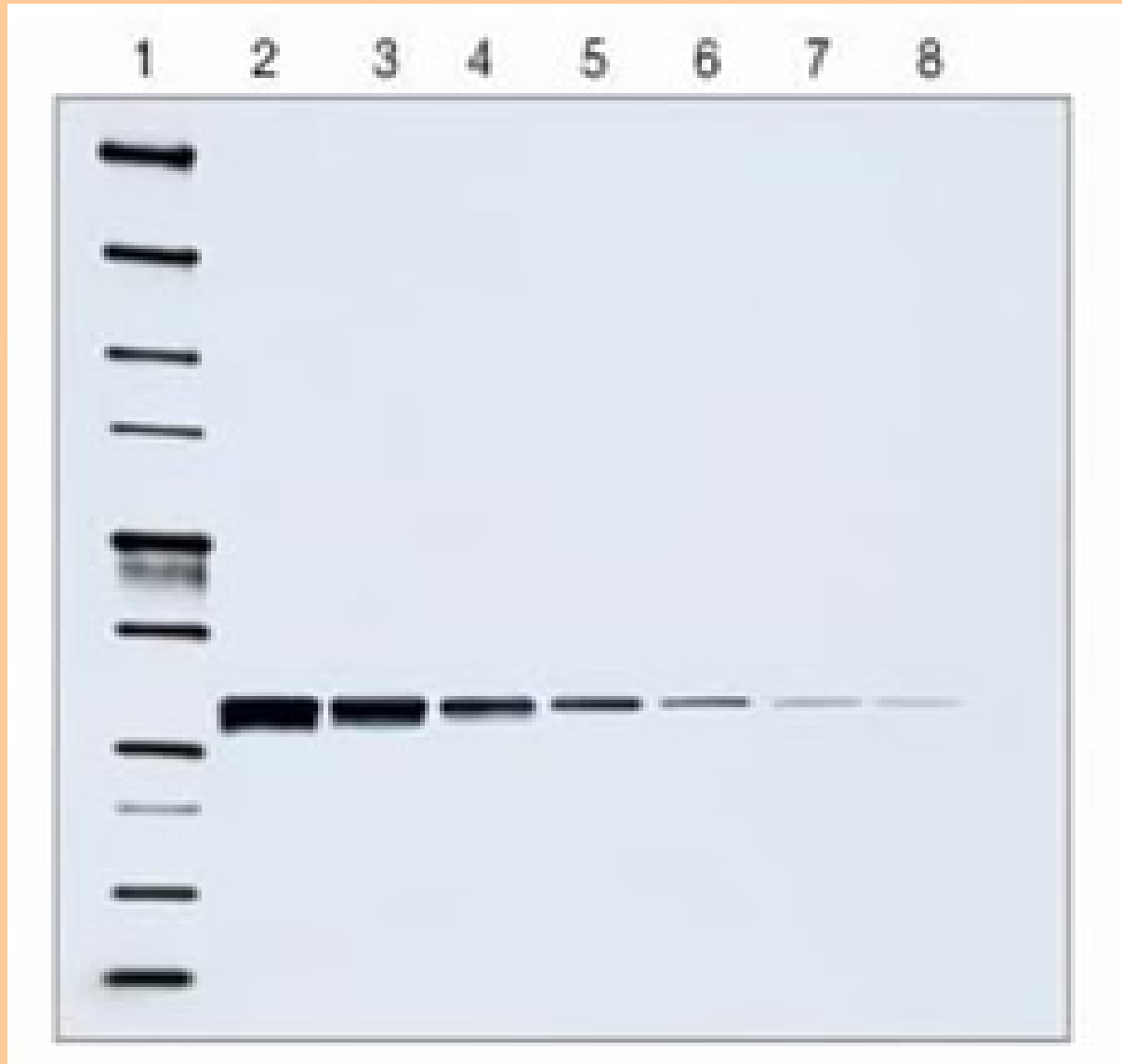
Rivelazione mediante Chemoluminescenza (ECL)



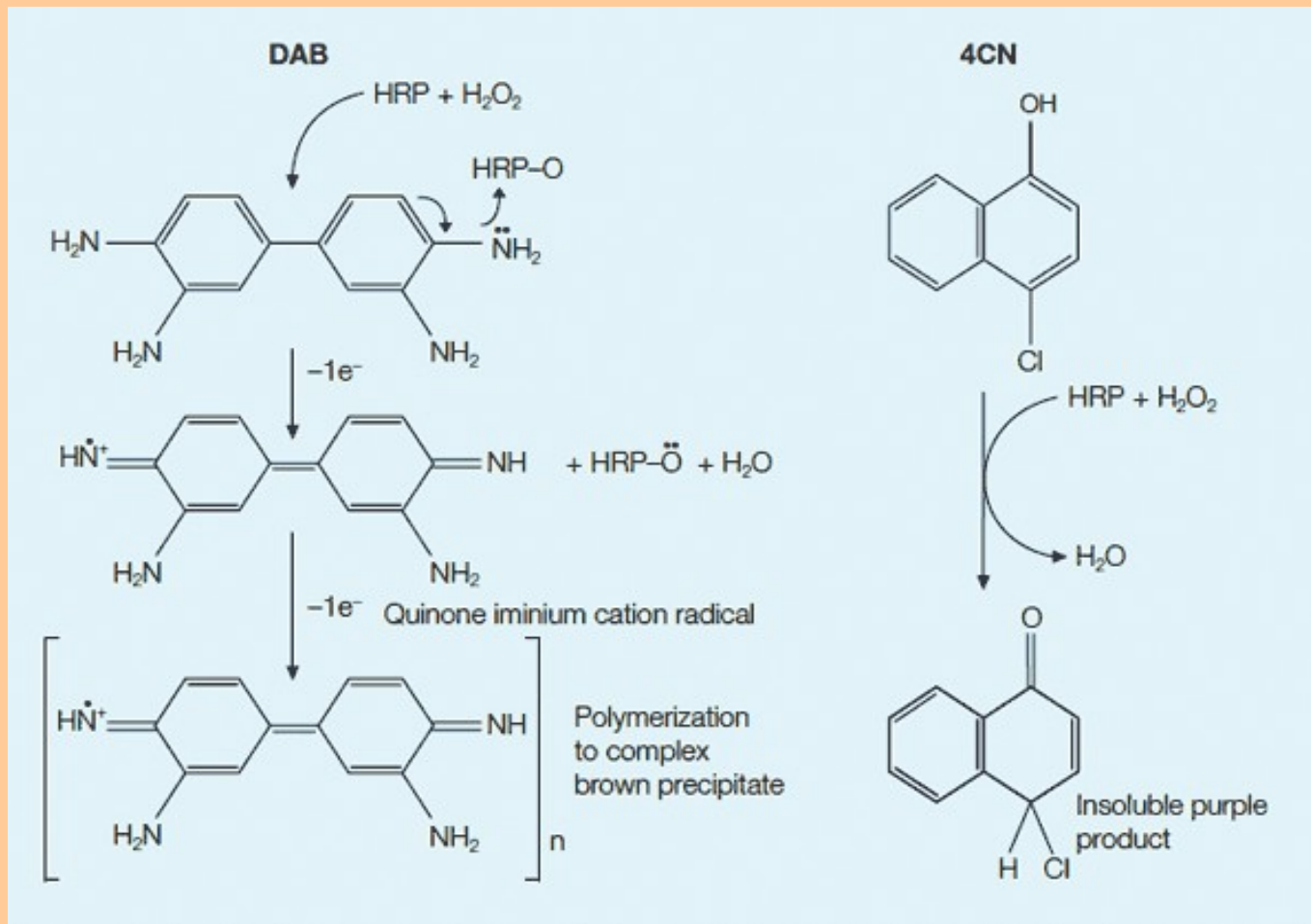
Lastra fotografica impressionata con chemioluminescenza (ECL)

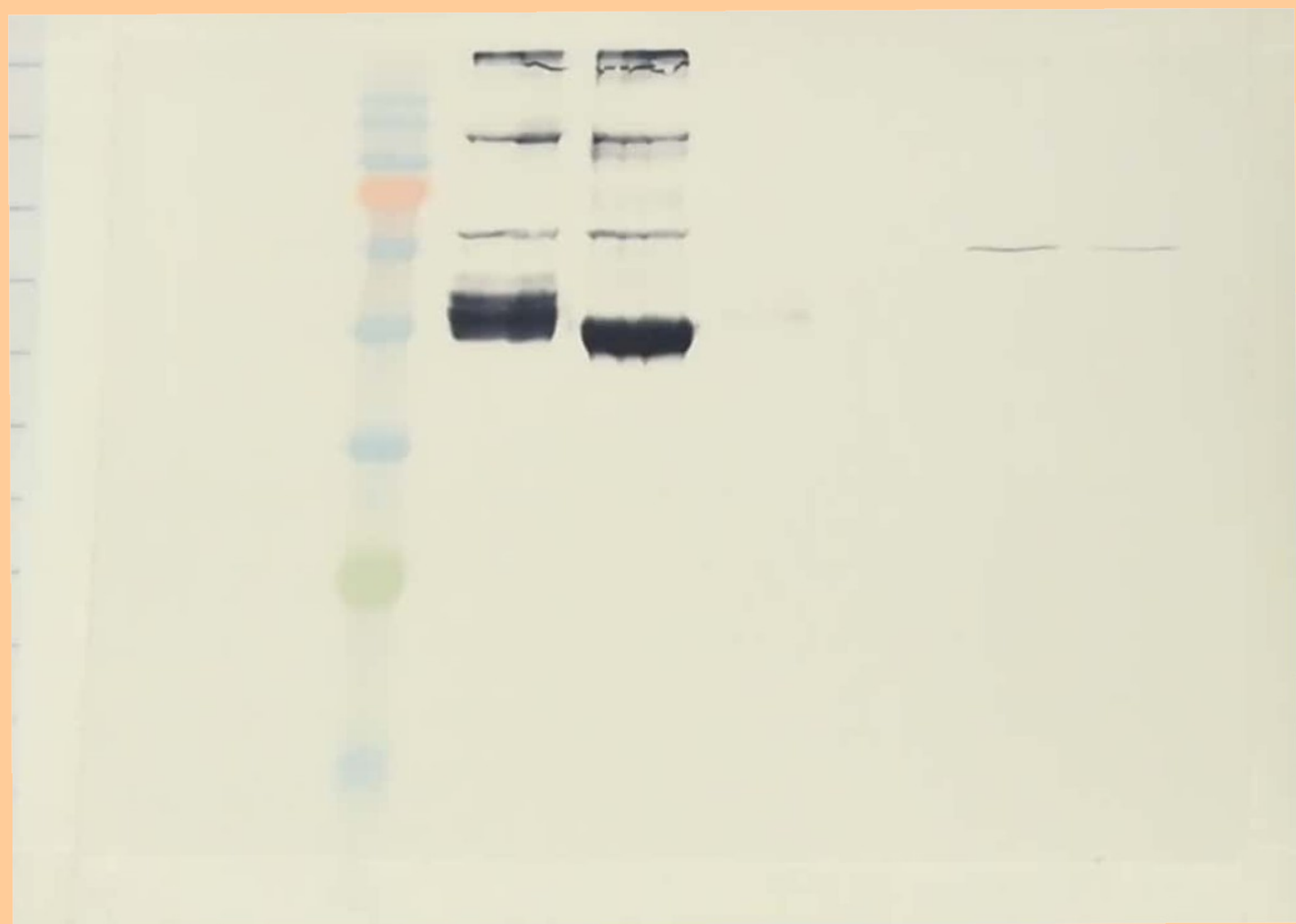


HRP-conjugated antibody



Rivelazione mediante substrato cromogeno (DAB o Cloronaftolo)





Trasformazione delle cellule di *E. coli* XL1Blue

- 1) Diluire 1:10 la miniprep del pUC18 in acqua.
- 2) Prelevare sotto cappa 100 μ L di cellule competenti e trasferirli in una eppendorf nuova.
- 3) Aggiungere 1 μ L della miniprep diluita ai 100 μ L di cellule competenti.
- 4) Agitare ed incubare in ghiaccio per 30 minuti.
- 5) Effettuare lo shock termico immergendo il tubo nel bagno termostato a 42°C per 1 minuto.
- 6) Raffreddare velocemente in ghiaccio per 5 minuti.
- 7) Aggiungere 200 μ L di LB liquido ed incubare a 37 °C per 1 ora (per esprimere la resistenza all'antibiotico).
- 8) Piastrare 150-200 μ L della sospensione delle cellule su una piastra di LB-Amp e lasciarla a 37°C overnight.