

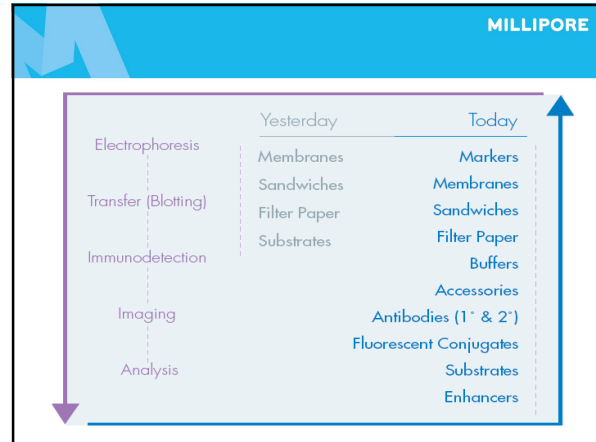
M MILLIPORE

La ciencia del Western Blot

Estrategias para mejorar los WB's

D. en C. Samuel García Nieto
Asesor Life Sciences, Millipore

ADVANCING LIFE SCIENCE TOGETHER™
Research. Development. Production.



Antecedentes MILLIPORE

- ❖ Western Blot (WB) es un pilar de la investigación de proteínas y es ampliamente usado para detectar y cuantificar proteínas en mezclas complejas.
- ❖ WB y la detección es un proceso con múltiples pasos.
- ❖ La optimización de las concentraciones de reactivos, de los materiales y de la técnica es la clave para un WB exitoso.

Requisitos para un WB exitoso MILLIPORE

- ❖ **PROTEÍNA** blanco y la selección de **ANTICUERPO**
- ❖ La proteína debe **ELUIR** del gel durante la transferencia
- ❖ La proteína debe **ADSORBERSE** a la membrana durante la transferencia.
- ❖ La proteína debe ser **RETENIDA** por el blot durante el procesamiento post-transferencia.
- ❖ La proteína unida debe estar **DISPONIBLE** para que el **ANTICUERPO** detecte a la proteína blanco.

Problemas que pueden encontrar: MILLIPORE

1. Pobre transferencia
2. Pérdida de proteínas pequeñas
3. Visualización de proteínas antes de inmunodetección
4. Baja especificidad con fondo alto
5. Alto fondo en general
6. Control de la especificidad del anticuerpo
7. Dificultades al re-analizar
8. Artefactos en el blot
9. Alto fondo de autofluorescencia

Western Blot MILLIPORE

Gel Electrophoresis ⇒ **WESTERN BLOTTING** ⇒ **DETECTION**

Separates a complex mixture of proteins into individual components. Transfers separated proteins to a microporous membrane, e.g., PVDF. Identifies presence or absence of specific proteins

- Sample prep chemicals
- Electrophoresis hardware
- Pre-cast gels
- Protein loading buffers
- Running buffers
- Gel stains
- Protein standards

- Blotting (tank or semi-dry) hardware
- Transfer buffers
- NC or PVDF membranes
- Blotting paper
- Membrane sandwiches
- Blot stains

- Blocking reagents
- Wash buffers
- Primary antibody
- Secondary antibody
- Detection reagents
 - Chromogenic
 - Chemiluminescent
 - Fluorescent
- X-ray film/processing equipment
- Imaging Equipment

Preparar muestras MILLIPORE

Sample Prep → Gel Electro-phoresis → Membrane Transfer → Blocking → Antibody Addition → Detection

❖ Preparación

- Medio de cultivo
- Lisado celular
- Homogenizados de tejido
- Lisar células para liberar la proteína

Cell Lysate or Protein Mixture

Sample in Solution

Electroforesis & Transferencia MILLIPORE

Sample Prep → Gel Electro-phoresis → Membrane Transfer → Blocking → Antibody Addition → Detection

❖ Separar proteínas por electroforesis en gel

- 1-D
- 2-D

Cell Lysate or Protein mixture

Electrophoresis

SDS-Polyacrylamide Gel

Electroforesis & Transferencia MILLIPORE

Sample Prep → Gel Electrophoresis → Membrane Transfer → Blocking → Antibody Addition → Detection

- ❖ Transferir proteínas hacia una membrana
 - Tanque húmedo
 - Semi-seco

The diagram shows two systems for protein transfer. The **Wet Tank System** consists of a gel, a membrane, and a nitrocellulose membrane, with a buffer reservoir. The **Semi-Dry Tank System** consists of a gel, a membrane, and a nitrocellulose membrane, with a buffer reservoir and a support layer.

Membranas para blots MILLIPORE

- ❖ Polyvinylidene fluoride (PVDF)
 - 0.45 μm y 0.22 μm
 - Baja fluorescencia
- ❖ Nitrocelulosa
 - 0.45 μm
- ❖ Nylon (Neutral y Cargado positivamente)
 - 0.45 μm

The image shows a microscopic view of a membrane surface with a 3D protein model overlaid, illustrating the interaction between the protein and the membrane.

Factores relacionados a la proteína: MILLIPORE

- ❖ Qué propiedades de la proteína determinan si se unirá durante la transferencia?
 - Velocidad de elución desde el gel
 - Masa
 - Valores de corriente / voltaje
 - Estado químico de la molécula
 - hidrofocidad
 - Grado de glicosilación u otras modif. post-traduccionales
 - Cantidad de SDS asociado
 - pI

M MILLIPORE

Problema #1

Transferencia pobre

ADVANCING LIFE SCIENCE TOGETHER™
Research. Development. Production.

Mejorando la transferencia

MILLIPORE

Solución #1

- ❖ Ajustar condiciones de transferencia
 - Metanol
 - SDS
 - Voltaje
- ❖ Equilibrar gel y membrana en buffer de transferencia
 - Incubar por 5 - 30 mins
- ❖ Buffers:
 - Towbin buffer (Tris/glycine transfer buffer): 25 mM Tris base, 192 mM glycine, 10% (v/v) methanol, pH 8.3)
- ❖ Original Reference:

→ Towbin H, Staehelin J, Gordon J. "Electrophoretic transfer of proteins

Ajustar composición de buffer de transferencia

MILLIPORE

Solución #1

- ❖ Metanol estabiliza el gel:
 - Previene que el gel se "hinche" manteniendo una buena resolución de bandas durante la transferencia
 - Disminuye la posibilidad de que las proteínas salgan del gel, las detiene e incrementa su exposición a la membrana
 - Incrementa la capacidad proteica de "pegarse" a la membrana al quitar el SDS
 - Benéfico para proteínas pequeñas

Ajustar el buffer de transferencia

MILLIPORE

Solución #1

- ❖ SDS cubre a la proteína y le da una alta carga negativa:
 - La proteína se mueve rápidamente por la membrana
 - Limita la oportunidad de las proteínas de interactuar con la membrana y unirse
 - Agente solubilizante excelente por lo que es benéfico para proteínas grandes o de membrana
- ❖ Se debe ajustar la concentración de SDS y metanol de acuerdo a la meta del experimento.

Importancia de equilibrar el gel

MILLIPORE

Solución #1

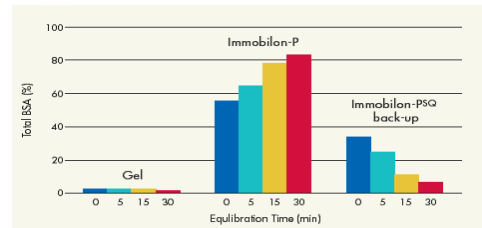


Figure 9. Effect of equilibration time on electrotransfer of BSA to Immobilon-P transfer membrane. ¹²⁵I-labeled BSA was resolved by SDS-PAGE on a 10 – 20% gradient gel. After equilibration for the times noted, the BSA was transferred to Immobilon-P transfer membrane, backed up with Immobilon-PSQ transfer membrane, in a tank transfer system using 25 mM Tris, 192 mM glycine, and 10% methanol, as the transfer buffer. The system was run at 8 V/cm interelectrode distance. At the end of the 2-hour transfer period, the gel and membranes were stained. The BSA bands were excised and counted.

M MILLIPORE

Problema #2

Pérdida de proteínas pequeñas

ADVANCING LIFE SCIENCE TOGETHER™
Research. Development. Production.

MILLIPORE Solución #2

Transfiriendo proteínas pequeñas

- ❖ Usar membranas de 0.2um para proteínas <20 kDa
- ❖ Limitar equilibrar el gel por solo 10 min para evitar que las proteínas pequeñas se salgan
- ❖ Usar metanol en el buffer de transferencia
- ❖ Eliminar SDS de buffer de transferencia
- ❖ Disminuir tiempo de transferencia

MILLIPORE

0.2um PVDF retiene más que 0.45um

Prolonged electrotransfer of proteins using Immobilon-P and Immobilon-P92 transfer membranes. Molecular weight standards [lanes 1,3,5,7] and calf liver lysate [lanes 2,4,6,8] were transferred to Immobilon-P or Immobilon-P92 membranes by the tank transfer method and stained with Coomassie Blue. A sheet of Immobilon-P92 transfer membrane was placed behind the primary membranes to capture proteins that passed through them. [Lanes 5 and 6 behind Immobilon-P; lanes 7 and 8 behind Immobilon-P92.]

MILLIPORE

Visualización – Tinción de proteínas

Sample Prep → Gel Electro-phoresis → Membrane Transfer → Blocking → Antibody Addition → Detection

Transfer Verification

A. Ponceau-S red B. CPTS C. Coomassie- Brilliant Blue

M MILLIPORE

Problema #3

Selección de anticuerpos

ADVANCING LIFE SCIENCE TOGETHER™
Research. Development. Production.

MILLIPORE

Western Blotting Workflow

Sample Prep → Gel Electro-phoresis → Membrane Transfer → Blocking → Antibody Addition → Detection

The diagram illustrates the Western Blotting Workflow. It starts with a gel containing protein bands. The process involves:

- Sample Prep**: Preparing the protein samples.
- Gel Electro-phoresis**: Running the gel to separate proteins by size.
- Membrane Transfer**: Transferring the protein bands from the gel to a membrane.
- Blocking**: Treating the membrane to prevent non-specific binding.
- Antibody Addition**: Adding a primary antibody (Add 1° Ab) that binds to the target protein, followed by a secondary antibody (Add 2° Ab) that binds to the primary antibody.
- Detection**: Visualizing the bound antibodies, often using a substrate that produces a color change or light signal.

MILLIPORE

Diferentes clases de Ab's

♦ Tipos de anticuerpos:
 → IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM

→ IgG es el anticuerpo más usado en experimentos con anticuerpos

The diagram shows the structure of an IgM antibody. It is a pentamer, consisting of five Y-shaped units. Each unit has two heavy chains (labeled 'heavy chain') and two light chains (labeled 'light chain'). The variable regions are labeled as 'VH domain' and 'VL domain'. The constant region is labeled as 'C1'.

MILLIPORE

Formatos de anticuerpos

- ❖ **Policlonales**
 - Derivados de distintas células B
 - Reconocen múltiples epítopos
 - Elegidos para detectar proteínas desnaturalizadas (WB)
- ❖ **Monoclonales**
 - Derivados de una clona celular
 - Reconocen un solo epítipo
 - Excelentes como Ab primario en ELISA

The diagram compares the structures of polyclonal and monoclonal antibodies. Polyclonal antibodies are represented by a mixture of different Y-shaped molecules, each recognizing a different epitope. Monoclonal antibodies are represented by a single, uniform Y-shaped molecule, recognizing only one specific epitope.

Reactividad cruzada MILLIPORE

- ❖ Se refiere a un Ab uniéndose a epítopos de otras proteínas:
 - Puede ser causado por baja avidéz o especificidad del Ab o por múltiples antígenos diferentes que tienen epítopos idénticos o muy similares
 - Es deseable cuando:
 - Reconocimiento general de un grupo relacionado de antígenos
 - Se intenta marcar entre especies cuando la secuencia del epítipo en el antígeno no está altamente conservada en la evolución

De genoma a proteoma MILLIPORE

Complejidad de las diferentes modificaciones post-traduccionales en proteínas

M MILLIPORE

Problema #4

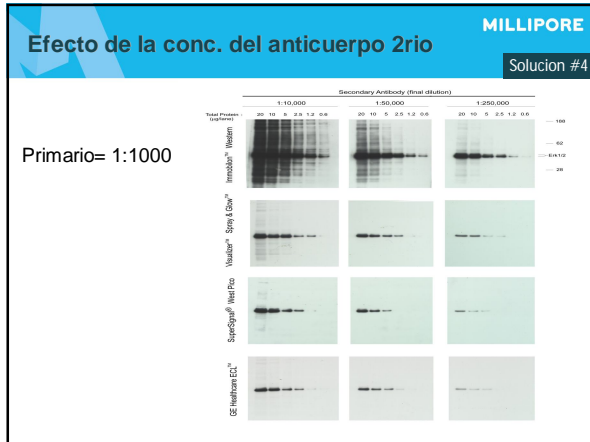
Baja especificidad con fondo alto

Research. Development. Production.

MILLIPORE Solucion #4

Ajustar la concentración de Ab

- ❖ Si la concentración ya sea del 1^{er} o del 2^{er} es muy alta, la especificidad puede disminuir y el fondo aumentará
- ❖ Una mayor dilución de los anticuerpos puede resultar en mayor especificidad y menor fondo



M MILLIPORE

Problema #5

Fondo alto en general

ADVANCING LIFE SCIENCE TOGETHER™
Research. Development. Production.

Bloqueador MILLIPORE

Solucion #5

- ❖ Filtrar la solución antes de usar
- ❖ Hacer un dot-blot para optimizar reactivos antes del WB
- ❖ Determinar si tu reactivo de quimioluminiscencia (o cualquier sistema que uses) es compatible con tu agente bloqueador (leche- ab biotina)
- ❖ Compatibilidad puede ser:
 - Dependiente de producto
 - (leche descremada,
 - caseína, gelatina,
 - Tween®-20)

Reducir fondo MILLIPORE

- ❖ Si tu fondo aún esta alto después de...
 - Optimizar bloqueador
 - Optimizar conc. de Ab
 - Lavados extensos...
- ENTONCES....

Reducir fondo MILLIPORE

❖ Lavado con alta conc. de sales

- Añadir hasta 0.5M NaCl y hasta 0.2 % de SDS al PBS o TBS (buffer de lavado)
- Lavar por 30 min, una o dos veces
- Puede mejorar la sensibilidad de la detección

Immobilon-P

Immobilon-PS^Q

Std Method	Extra TBST wash	High Salt wash

MILLIPORE

Problema #6

Dificultades al re-analizar

ADVANCING LIFE SCIENCE TOGETHER™
Research. Development. Production.

Optimización MILLIPORE

- ❖ Intenta secar la membrana post-transferencia antes de bloquear
- ❖ Usa ReBlot Plus – formulado específicamente para remover anticuerpos en 10 min.
- ❖ Usa PVDF para esta aplicación dadas sus mejores propiedades para el manejo
- ❖ 2 métodos disponibles. Elige el método que te sea más conveniente dado que los resultados son similares
- ❖ → Acidico – 25mM glycine-HCl, pH 2, 1% SDS
- ❖ → Detergente – 2% SDS in Tris @ 50°C, 100 mM Mercaptoethanol

MILLIPORE

Before ReBlot™ Plus	After ReBlot™ Plus	Reprobe

Before ReBlot™ Plus: Western blot probed with rabbit antibodies to peptide from angiotensin II type 1 receptor, 20 second exposure.
After ReBlot™ Plus: Western blot stripped with ReBlot™ Plus Mild stripping solution.
Reprobe: Western blot reprobed with rabbit antibodies to peptide from glutamate receptor delta 1/2, 20 second exposure.

M **MILLIPORE**

Problema #7

Artefactos en los blots

ADVANCING LIFE SCIENCE TOGETHER™
Research. Development. Production.

M **MILLIPORE**

Maneja la membrana con cuidado

Solucion #7

- ❖ Usa guantes
- ❖ Usa pinzas con puntas suaves o planas
- ❖ Evita rayar o doblar las membranas y que no se peguen unas con otras

A B C

M **MILLIPORE**

AYUDA O DUDAS

http://www.millipore.com/immunodetection/id3/western_blotting

Western Blotting

Factors influencing immunodetection

- Buffers
- Blocking
- Antibodies
- Washing
- Double labeling
- Detector Substrates
- Reporting Immovable PVDF Transfer Membranes

Since its introduction in 1979 (Towbin et al., 1979), protein blotting has become a mainstay of research laboratories. Its technology used to identify primary or proteins in complex samples or to monitor protein expression and purification. The primary protein blotting procedure involves an SDS-PAGE or 2D-PAGE gel, which is then transferred onto a nitrocellulose membrane. This blotting method may provide valuable information about total protein expression levels and can be performed in either a single or multiple steps. For more information on protein blotting, visit www.millipore.com/immunodetection/id3/western_blotting.

Product News & Releases

New Product: Quanta Millipore antibodies and kits. They are intended for immunoblotting and protein research applications.

New Quanta™ Millipore antibodies.

M **MILLIPORE**

AYUDA O DUDAS

samuel_nieto@millipore.com

ADVANCING LIFE SCIENCE TOGETHER™
Research. Development. Production.