

PC_02- NORMALIZACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE STAIN FREE Y TÉCNICA MULTIPLEX EN WESTERN BLOTTING

Plataformas Científico-Tecnológicas: Laboratorios de Investigación

Plataforma de Proteómica

Técnico de área: Sonia Morales Santana

www.ibsgranada.es



ibs.GRANADA
INSTITUTO DE
INVESTIGACIÓN
BIOSANITARIA

PC_02- Normalización de proteínas mediante stain free y técnica multiplex en western blotting

1. Fundamentos del método y ventajas.

El western multiplex basado en fluorescencia es adecuado para la detección y cuantificación de proteínas específicas de forma simultánea en una misma muestra biológica, obteniendo la mayor información posible en un experimento.

Usando una combinación de hasta tres anticuerpos producidos en diferentes especies, la detección fluorescente permite el análisis cuantitativo simultáneo de múltiples proteínas dentro de la misma muestra en la misma transferencia.

El método de western blot usando anticuerpos secundarios fluorescentes ofrece una gran variedad de beneficios sobre los métodos tradicionales de detección colorimétricos y quimioluminiscentes.

- **Ventajas del western blot multiplex fluorescente:**
 - a) Se analizan múltiples proteínas bajo las mismas condiciones experimentales de forma simultánea.
 - b) Rango dinámico: Se amplía en 10 veces la linealidad de la detección respecto a la quimioluminiscencia.
 - c) Cuantificación: La detección fluorescente es más cuantificable respecto a métodos enzimáticos.
 - d) Mayor fiabilidad y durabilidad de la lectura utilizando marcadores fluorescentes, en lugar de la variabilidad de una reacción enzimática.

- e) Se maximiza la cantidad de información recopilada, utilizando la menor cantidad posible de muestras de difícil obtención.
- f) Ahorro de costos y tiempo.



Starbright™				
DyLight 488	DyLight 550	DyLight 650	DyLight 680	DyLight 800
Alexa Fluor 488	Alexa Fluor 546	Alexa Fluor 647	Alexa-a Fluor 680	Alexa Fluor 790
Cy2	Cy3	Cy5	Cy5.5	Cy7
	Rhodamine	SYPRO Ruby	IRDye 680	IRDye 800

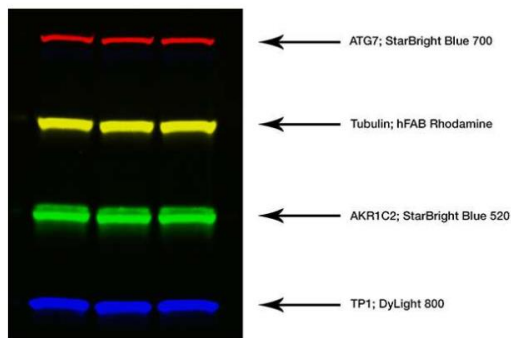
Figura. 1: Fluoróforos compatibles (referencia: Bio-Rad)

Fluorophore Selection			
Recommended Fluorophores*	Red	Green	Blue
Number of Targets	Fluor A	Fluor B	Fluor C
1	Qdot 705 or DyLight 650	—	—
2	Qdot 705 or DyLight 650	Qdot 605 or DyLight 549	—
3**	Qdot 705 or DyLight 650	Qdot 605 or DyLight 549	Qdot 525 or DyLight 488
1+stain-free	DyLight 650	—	—
2+stain-free	DyLight 650	DyLight 550	—

* These fluorophores have been validated for use with Bio-Rad's ChemiDoc MP system; other fluorophores with similar excitation and emission spectra may also be used.

** Note: Qdot secondary antibodies may not be available for all three of your host species. In this case, DyLight 650 can be replaced with Qdot 705.

Figura 2. Ejemplo de fluoróforos utilizados para western blot simple, multiplex y con normalización "Stain Free". (Referencia: Bio-Rad)



Color	Target Protein	Primary Antibody	Secondary Antibody
Red	ATG7	Rabbit Anti-Human ATG7	Goat Anti-Rabbit IgG StarBright Blue 700
Yellow	Tubulin	Anti-Tubulin hFAB-Rhodamine	Not required
Green	AKR1C2	Mouse Anti-Human AKR1C2	Goat Anti-Mouse IgG StarBright Blue 520
Blue	TP1	Goat Anti-Human TP1 (biotinylated)	DyLight 800 Streptavidin

Figura 3: Imagen para *western blotting* de 4 proteínas detectadas simultáneamente. Imagen de transferencia compuesta con cuatro proteínas distintas visualizadas utilizando los anticuerpos secundarios StarBright Blue 520 y StarBright Blue 700, en combinación con DyLight 800 y un anticuerpo primario recombinante hFAB humano marcado directamente con rodamina, para la detección de proteínas “house keeping”. La lectura fue realizada en el sistema de imágenes ChemiDoc MP. (referencia: Bio-Rad)

2. Servicio ofertado.

- a) Realización de *western blot* fluorescente multiplex
- b) Normalización mediante proteínas *housekeeping*
- c) Normalización de proteínas totales mediante *Stain Free*.
- d) Análisis de resultados.

3. Equipos de análisis, software y muestras a analizar.

- **Equipos y software**

- -Equipos de electroforesis 1D: Miniprotean (Bio-Rad)
- -Equipos de transferencia: Trans blot turbo (Bio-Rad)
- -Sistema de imágenes ChemiDoc MP (Bio-Rad):
- -Software Image Lab 4.0

- **Tipo de Muestras**

Extractos proteicos de diversa procedencia.

Las muestras deben estar cuantificadas de forma precisa y contener un mínimo de 100 ug a una concentración mínima de 6ug/ul. También deben entregarse libres de partículas en suspensión, para lo que se recomienda centrifugar 5 minutos a 15000 rpm y recuperar el sobrenadante. Si requiere duplicados o triplicados, hay que entregar la muestra correspondiente.

- **Fungible y material**

Geles, reactivos, membranas y anticuerpos seleccionados de forma personalizada para los analitos de interés.

4. Determinación del coste de realización.

Precios a convenir según materiales y anticuerpos seleccionados.

5. Contacto:

- **Técnico Especialista Responsable Plataforma de Proteómica**
Dra. Sonia Morales Santana
Mail: smorales@ibsgranada.es / sonia.morales@juntadeandalucia.es
Teléfono: 958023655
- **Coordinadora Laboratorios de Investigación**
Dra. Paloma Muñoz de Rueda
Mail: palomalancha@ibsgranada.es
Teléfono: 958023980
- **Web:** <https://www.ibsgranada.es/plataformas/plataforma-de-genomica-y-proteomica/>
- **Solicitud de recurso:** <https://www.ibsgranada.es/solicitud-de-recursos-de-la-unidad-cientifico-tecnica-de-laboratorios-de-investigacion/>
- **Tarifas:** <https://www.ibsgranada.es/wp-content/uploads/2020/11/Lista-de-Tarifas-UCT-Lab-Investigacion-2022-v02.pdf>