

**LABORATOIRE DE TECHNIQUES BIOCHIMIQUES
BICH 4993**

MANUEL DE LABORATOIRE

Didier GAUTHIER
Département de chimie et biochimie
Université de Moncton

JUIN 2009

TABLE DES MATIERES

Introduction.....	1
Séance d'introduction aux manipulations	2
1 Isolement de la concanavaline	7
1.1 Préparation de l'extrait brut.....	7
1.2 Précipitation différentielle.....	8
1.3 Dialyse.....	9
1.3.1 Mise en place	10
1.3.2 Récupération du rétentat	10
1.4 Purification par chromatographie d'affinité.....	11
1.4.1 Montage de la colonne.....	11
1.4.2 Chromatographie	13
1.5 Lyophilisation.....	15
1.6 Récupération et conservation de la con A.....	16
1.7 Dosage biologique de la con A	17
2 Électrophorèse en gel discontinu de polyacrylamide–SDS	20
2.1 Montage des plaques	20
2.2 Gel de séparation.....	22
2.2.1 Préparation de la solution	22
2.2.2 Coulage du gel de séparation.....	22
2.3 Gel de tassement.....	23
2.3.1 Préparation de la solution	23
2.3.2 Coulage du gel de tassement.....	24
2.4 Échantillons et étalons.....	24
2.4.1 Préparation des échantillons et étalons.....	25
2.4.2 Dépôt des échantillons et étalons.....	25
2.5 Migration électrophorétique et récupération du gel	25
2.6 Coloration au bleu de Coomassie	27
2.7 Photographie.....	28
2.8 Séchage.....	28
2.8.1 Préparation du gel.....	28
2.8.2 Récupération du gel séché	29
3 Buvardage et immunodétection.....	31
3.1 Préparation de la matrice de nitrocellulose et du gel d'acrylamide	31
3.2 Electroélution dans un dispositif semi-sec.	32
3.3 Coloration des protéines totales	33
3.4 Immunoabsorptions primaire et secondaire	34

3.5 Détection enzymatique.....	35
3.6 Photographie.....	36
4 Autoradiographie.....	37
4.1 Exposition du gel.....	37
4.2 Développement du film.....	38
5 Dosage par immunoadsorption couplée (ELISA).....	39
5.1 Préparation des échantillons et des étalons	39
5.2 Adsorption de l'antigène	40
5.3 Immunoadsorption et dosage	40
6 Microdosage des protéines	43

INTRODUCTION

Ce cours comporte quatre objectifs généraux: 1) l'acquisition des méthodes de base de travail en laboratoire (préparation et emploi d'un diagramme, tenue d'un cahier, sécurité au labo...); 2) la familiarisation avec diverses techniques couramment utilisées en biochimie (centrifugation, électrophorèse, etc); 3) la compréhension théorique des principes de fonctionnement de ces techniques; et, 4) l'acquisition de la capacité d'en interpréter les résultats.

Les deux premiers objectifs seront atteints par les séances de travail en laboratoire en tant que telles. L'évaluation de leur réussite sera faite par des évaluations directes (évaluations directe du cahier, des diagrammes, des manipulations). Les deux derniers objectifs devront être atteints par le travail d'étude personnel. L'évaluation de leur réussite sera faite par deux examens et des questions intégrées dans le texte.

Ce laboratoire est constitué d'une suite d'expériences dont la plupart s'enchaînent l'une à l'autre comme un mini-projet de recherche: l'isolement d'une protéine, la concanavoline A, et son analyse par diverses techniques. Ces techniques sont très courantes, quoique à des échelles différentes, dans les laboratoires de biochimie, que ce soit un laboratoire clinique, industriel ou de recherche. De plus, certaines techniques utilisées ici avec anticorps, peuvent servir dans d'autres contextes. Par exemple, la détection d'ADN ("Southern") ou d'ARN ("northern") se fait selon une technique semblable à celle utilisée pour les protéines ("western") sauf que l'agent de détection n'est pas un anticorps mais une séquence d'acide nucléique. L'autoradiographie (ou la fluorographie) peut aussi être utilisée dans beaucoup de situations différentes ou sous forme de détection de chémiluminescence.

Les informations sur l'évaluation du cours, les exigences et les critères d'évaluation des diagrammes, des cahiers de laboratoire et de l'évaluation de la performance ainsi que l'horaire et les manipulations à faire durant chaque séance sont décrites dans les pages Web des professeurs donnant le cours. Il est impératif que ces pages soient consultées de façon très régulière afin d'être sûr d'avoir l'information finale sur les manipulations ou d'éventuelles instructions spéciales.

J'aimerais profiter de l'occasion pour remercier M. Alan Fraser, maintenant professeur à la retraite, qui a eu l'idée de baser l'essentiel de ce cours sur un projet de purification d'une protéine. C'est également lui qui a adapté le protocole de purification de la concanavoline A à un format se prêtant aux séances d'un cours de travaux pratiques en biochimie (section 1).

Séance d'introduction aux manipulations

Dans cette séance, on procédera à une démonstration et à des pratiques de la manipulation de certains instruments localisés au A214 (ou A226). Ces instruments seront utilisés tout au long de ce laboratoire ainsi que de BICH4882, l'hiver prochain. Il est donc essentiel que vous appreniez dès maintenant à les maîtriser.

BALANCES SEMI-ANALYTIQUES

Dans ce laboratoire, vous aurez à peser des produits pour faire des solutions. A cette fin vous aurez accès à des balances semi-analytiques, toutes sont de marque « Denver Instrument TR-203 » (A214) ou Denver APX-203 (A-226). Elles affichent jusqu'au mg, avec une capacité maximale de 210 g (incluant le poids soustrait lors du tarage). Certaines sont munies d'une cage de protection contre les courants d'air, d'autres non.

De nos jours, les balances possèdent un affichage numérique et leur capacité leur permet de mesurer différentes masses (g, mg, onces, carats, etc.). On peut même s'en servir pour compter des objets (si on connaît leur poids moyen), peser des animaux dont les mouvements pourraient perturber la prise de poids, etc. Bien sûr il existe des balances avec divers niveaux de précision (1 g, 0.1 g, 1 mg, 1 µg). Les plus précises sont munies de cages de protection destinées à bloquer les courants d'air, qui perturbent la pesée, et à protéger l'instrument contre la poussière. Les balances « analytiques » de grande précision doivent être installées sur des tables munies de systèmes anti-vibrations.

L'installation ou la réinstallation, des balances après un changement de localisation requiert qu'elles soient calibrées ou recalibrées. On fait cela avec des poids étalons selon les recommandations du manufacturier. Lors de la mise en place, il faut mettre la balance à un endroit le plus protégé possible des vibrations de la table de travail et des courants d'air. Les balances analytiques de précision requièrent des installations beaucoup plus exigeantes que les autres (salle spécialisée, table avec système d'amortissement, etc.). Pour celles que vous utiliserez dans ce laboratoire, une paillasse de laboratoire régulière et la disposition loin des portes et des courants d'air sont généralement des mesures suffisantes. La balance doit être mise au niveau avec les pieds de mise à niveau et la bulle de niveau. Il existe des poids étalonnés qui permettent de faire la calibration qui doit être vérifiée de temps en temps. De plus il est facile de tarer le contenant, c'est-à-dire de mettre la lecture du poids du contenant à zéro, ce qui permet de lire directement la masse du produit.

Il est sûr qu'il est virtuellement impossible d'atteindre le poids voulu au mg près. Normalement on se donne un objectif (par exemple à 0.1% près ou au 0.1 mg près) qui dépend de la précision requise par le travail, de notre habileté, etc.

Normalement on pèse dans un contenant destiné à cette fin, normalement une navette (« bateau ») en plastique inerte, quelques fois avec une coupelle d'aluminium ou un simple carré de papier ciré. Evidemment, il faut utiliser un matériel qui ne réagira pas avec le produit pesé ou sur lequel ce dernier ne collera pas. Il existe différentes tailles de

navettes. Le contenant doit être le plus léger possible compte tenu du poids désiré. Cela permet d'obtenir le plus de précision possible, car l'erreur de lecture est proportionnelle au poids total pesé, incluant celle du contenant même si celui est taré. Ainsi, il est très peu avantageux de peser 1 g dans un bécher de verre de 200 g.

Mode d'emploi : obtention d'un poids donné d'un produit sec

La balance doit avoir été branchée depuis au moins 60 min et mise au niveau à l'aide de l'indicateur (« bulle de niveau ») intégré. Elle doit avoir été calibrée récemment. Entre les pesées, l'affichage devrait être éteint avec le bouton de contrôle latéral. Pour les plus petits poids (> 5 g), il faut employer des balances avec une cage de protection.

Activer l'affichage avec le bouton de contrôle.

Déposer une navette au centre du plateau de pesée ; choisir la navette la plus petite possible, donc la plus légère, par rapport au volume désiré du produit ; si la balance est munie d'une cage, refermer les portes coulissantes

Tarer la navette avec le bouton « zero », l'affichage devrait indiquer « 0.000 » et l'indicateur de stabilité demeurer illuminé quelques secondes pour s'assurer qu'il n'y a pas de dérive de la lecture.

Déposer le produit à peser petit à petit le plus précisément possible. On devrait viser une précision de 0.2% du poids voulu ou 10 mg.

Enregistrer le poids quand l'indicateur de stabilité demeure illuminé. Si vous utilisez une balance munie d'une cage de protection, refermer les portes coulissantes, vérifier si le poids tombe dans les limites désirées, sinon rajouter ou enlever du produit jusqu'à l'obtention de la masse voulue (plus ou moins la précision désirée). Quand on a obtenu le poids désiré, on prend en note ce dernier dans le cahier de laboratoire et on procède à la suite des manipulations.

Nettoyer le plateau si du produit est tombé dessus en se servant du pinceau.

Désactiver l'illumination de l'affichage.

Exercice (par chaque étudiante ou étudiant): Peser 125 g, 21.5 g, 1.25 g et 251 mg de NaCl selon les indications précédentes. Chaque étudiant doit faire ces exercices et devrait être en mesure par la suite de se servir de cette balance dans les cours BICH 4993 – Techniques biochimiques et BICH 4882 – Laboratoire avancé de biochimie. Faites vérifier par la démonstratrice ou le démonstrateur.

MICROPIPETTES

Les pipettes mécaniques (généralement appelées micropipettes) sont employées pour mesurer facilement des petits volumes (1000 μ L ou moins). Il existe aussi des modèles de pipettes mécaniques de 1 à 10 mL souvent employées pour des pipetages répétitifs de plus gros volumes. Dans la plupart des cas, on peut ajuster le volume pipeté à l'intérieur de certaines limites. Par exemple, certains modèles de pipettes de 1000 μ L peuvent être ajustés entre 200 et 1000 μ L ; celles de 200, entre 20 et 200, celles de 20 entre 2 et 20 ;

celles de 1 mL, entre 0.1 et 1 ; etc. Chaque modèle requiert un embout spécifique, facilement identifiable par sa couleur. On doit cependant remarquer qu'un embout de pipette d'un fournisseur ne fait pas nécessairement sur des modèles d'autres compagnies.

Emploi

Régler le volume au niveau requis.

Mettre le type d'embout requis, l'ajuster solidement, normalement les embouts sont rangés verticalement sur des supports et on a qu'à enfoncer la micropipette dans l'embout.

Vider l'air de la micropipette en pesant sur piston (première résistance).

Plonger l'embout dans le liquide à pipeter, suffisamment profondément pour que l'embout soit encore dans la solution après que le liquide aura été aspiré, mais pas pour que la jonction entre l'embout et le baril de la micropipette soit en contact avec le liquide, en général 5-10 mm est acceptable. Enfoncer trop profondément l'embout risque de contaminer le baril de la micropipette en plus de créer une pression hydrostatique qui refoule le liquide dans l'embout.

Aspirer le liquide en relâchant lentement le piston tout en gardant la pipette verticale. Encore ici, il s'agit de protéger la pipette en évitant de produire, si on aspire trop vite, un jet qui entrerait dans le baril et causerait de la contamination. Une aspiration trop rapide provoquerait aussi une imprécision dans le pipetage.

Déposer l'embout sur la paroi du récipient tenu à un angle de 15-30° dans lequel vous devez déposer la solution.

Vider la pipette en pesant sur le piston, mais pas trop rapidement, pour éviter que du liquide reste sur la paroi de l'embout. Déposer le liquide sur la paroi du contenant en gardant la pipette verticale et en inclinant légèrement le contenant. Un liquide très visqueux (par exemple : glycérol, saccharose (« sucrose ») ou urée concentrée) doit être vidangé plus lentement qu'une solution aqueuse ordinaire. Mais dans de tel cas d'autres types de micropipettes sont souvent plus appropriés (micropipette à déplacement direct). Laisser quelques secondes (2-3) le liquide résiduel retomber au bout de l'embout et l'évacuer en pesant sur le bouton jusqu'à la seconde résistance, encore ici pour s'assurer que l'embout est vide.

Ejecter l'embout si vous n'avez pas à pipeter un autre volume de cette solution. Pour ce faire, selon les modèles, soit on emploie le bouton d'éjection, soit on pousse le bouton de pipetage jusqu'au fond à une troisième résistance. Normalement on change d'embout pour chaque solution pour éviter la contamination croisée (« carry over »). La seule exception possible (mais pas obligatoire) est lorsqu'on pipette des volumes de dilutions de plus en plus concentrées (mais pas l'inverse) du même produit.

=> Pourquoi peut-on pipeter des volumes de dilutions de plus en plus concentrées mais pas l'inverse ?

Remarque : pour s'assurer qu'un petit volume se mélange au reste de la solution, on agite cette dernière, ou s'il s'agit de très petits volumes dans un microtube, on centrifuge ce dernier quelques secondes

Exercice :

Pipeter (avec la bonne pipette) à 5 ou 6 reprise des volumes différents d'eau de chacune des micropipettes qui vous sont fournies : 9.58 mL, 985 μ L, 589 μ L, 85.9 μ L et 9.85 μ L. Chaque étudiant doit faire cet exercice et devrait être en mesure par la suite de se servir de ces micropipettes dans les cours BICH 4993 – Techniques biochimiques et BICH 4882 – Laboratoire avancé de biochimie.

Précautions

Ne jamais pipeter de solvants volatiles avec une micropipette. Les vapeurs détruiront les joints d'étanchéité.

Ne jamais essayer d'ajuster à des volumes supérieurs ou inférieurs à la capacité de la pipette.

Ne pas forcer le système d'ajustement.

Ranger la pipette sur son support.

Ne pas tenir la pipette horizontalement ou la tête en bas, particulièrement si elle contient du liquide

Ne jamais démonter une pipette si on ne sait pas comment faire ou comment la remonter (le livre d'instruction est essentiel).

Si la pipette semble mal fonctionner :

- vérifier si elle ne coule pas
 - o si oui, assurez vous que vous employez le bon embout
 - o si non il existe une fuite dans le mécanisme interne
- vérifier calibration : fiabilité (fidélité, « repeatability ») ; ressemblances des valeurs de lecture
- si possible la précision vérifier la fiabilité

Vérification rapide de la calibration (fiabilité, fidélité)

Il existe des façons rigoureuses de vérifier la calibration d'une micropipette, sa précision, sa fidélité («reproductibilité»), etc., où il faut tenir compte de la température, de la pression atmosphérique et du taux d'humidité. Il ne s'agit pas de cela ici. Ces méthodes sont décrites dans les manuels d'instruction des micropipettes et ont probablement été vues et appliquées dans d'autres cours de chimie. La méthode donnée ici sert plutôt à une vérification rapide d'une micropipette qu'on suspecte de mal fonctionner. Elle peut se faire rapidement et facilement dans le laboratoire sans interrompre trop le déroulement des manipulations en cours. Elle s'emploie plus facilement sur les pipettes de 10 μ L et plus, mais les plus petites peuvent également être vérifiées de cette façon.

Ajuster la pipette à un volume intermédiaire (ou au volume qui ne semble pas fonctionner). Par exemple à 500 μL pour une pipette de 1000 μL .
Pipeter 5 ou 10 fois ce volume d'eau dans un petit bateau pré-taré.
Peser ce bateau, le poids enregistré devrait être l'équivalent du poids d'eau pipeté $\pm 2\%$.
Rappel 1 μL d'eau = 1 μg (à 4°C, 1 atm.).

Il va s'en dire qu'une pipette qui ne passe pas ce test devrait être mise de côté pour être vérifiée plus rigoureusement et recalibrée et réparée si nécessaire.

Exercice :

Vérifier la calibration de chacune de vos micropipettes. Chaque étudiant doit faire cet exercice et devrait être en mesure par la suite de vérifier la calibration de ces micropipettes dans les cours BICH 4993 – Techniques biochimiques et BICH 4882 – Laboratoire avancé de biochimie.

Concanavaleine A

- ⇒ Dans quelle classe de protéines la con A se situe-t-elle ?
- ⇒> Quelle est sa structure quaternaire
- ⇒> **Q 0.1** Quelle est le poids moléculaire et celui de ses sous-unités ?
- ⇒> A quels sucres peut-elle se lier ?

1 - ISOLEMENT DE LA CONCAVALINE A

Le but de cette série de manipulations, se déroulant sur quatre semaines) est de purifier la concanavaline A (con A) en fractionnant les protéines de fèves de haricot-sabre (*Canavalia ensiformis*, « Jack beans »). Dans toutes ces manipulations, il faudra conserver sur glace ou à 4°C, sauf lorsque c'est spécifiquement mentionné, les fractions susceptibles de contenir la con A.

1.1 - PREPARATION DE L'EXTRAIT BRUT

Cette première étape a pour but de mettre la con A en solution et de se débarrasser par centrifugation du matériel inerte qui n'a pas été solubilisé.

Peser environ 50 g de fèves de haricot-sabre (« jack beans »), prendre en note le poids effectivement prélevé. Mettre ces fèves dans le mortier d'un broyeur "Waring Blender™" pré-refroidi et réduire en poudre fine à vitesse maximale en pesant sur le couvercle pour le tenir bien en place. Réduire complètement en poudre fine les fèves avant d'ajouter le liquide. Ajouter 80 mL de salin (NaCl 0.15 mol/L ou 0.85%) et resuspendre la poudre avec une tige de verre (non pas avec le broyeur). Transférer la suspension résultante dans un bécher de 400 mL. Rincer deux autres fois le mortier du broyeur avec 60 mL de salin pour transférer complètement tout le matériel dans le bécher. Le récipient du "Waring Blender" devra être lavé et séché après usage. Par mesure de précautions, il faudra travailler sous la hotte et porter un masque tant que la poudre de fève n'a pas été humectée, donc rendue non volatile.

Agiter lentement la resuspension pendant au moins une heure sur un agitateur mécanique. Pour garder le mélange froid, déposer un cristallisateur ou un grand bol de plastique plein de glace sur l'agitateur contenant le bécher de sorte qu'il soit complètement entouré de glace. Bien compacter la glace autour du bécher pour l'empêcher de bouger quand l'aimant tournera.

Plier un morceau d'étamine (« coton-fromage ») afin d'obtenir un carré d'environ 25-30 cm de quatre épaisseurs et placer sur l'ouverture d'un autre bécher de 400 mL en la stabilisant avec un élastique, de façon à laisser une dépression assez prononcée au centre. Transférer l'homogénat et laisser filtrer le mélange. Récupérer l'homogénat encore contenu dans les fèves en égouttant le matériel retenu par l'étamine en tordant et en pressant assez fort pour extraire le maximum de liquide. Durant ce processus, le bécher dans lequel on récupère l'extrait devra être gardé sur glace. Jeter l'étamine avec les résidus des fèves dans un récipient mis sous la hotte à cette fin.

Centrifuger le filtrat dans une bouteille à centrifuger de 250 mL à 14 600 x g durant 30 min dans un rotor refroidi à 4°C. (La vitesse de rotation du rotor devra avoir été déterminée d'avance connaissant les paramètres de la centrifugation du rotor)

- Au A-214, employez la centrifugeuse Sorvall RC-5B Plus (Rotor SLA1500, diamètre de rotation 20.5 cm) à 4°C. .
- Au A-226 avec la Beckman J2-M, localisée au A-107, (Rotor JA-14, diamètre de rotation 27.4 cm) à

4°C.

Ne pas mettre plus de 225 mL de liquide par bouteille. Si nécessaire, vous devrez équilibrer la bouteille et le couvercle contre celle d'une autre équipe en utilisant du salin. Le sédiment est empaqueté plus ou moins solidement dans le fond et sur les parois de la bouteille, manipuler donc cette dernière délicatement. Pour éviter que le sédiment ne se resuspende lors du transfert, tourner la bouteille de telle façon qu'il soit vers le haut de la bouteille et décanter doucement (voir figure 1.2.1). Filtrer le surnageant à travers de l'étamine, sans presser cependant, pour éliminer les particules de sédiment qui auraient pu se resuspendre malgré tout. Jeter le sédiment de même que l'étamine dans le bocal sous la hotte. Recueillir le surnageant dans un bécher de 400 mL sur glace.

⇒ **Q 1.1** : D'après vous, que contiendrait, en général, le surnageant et le sédiment de cette centrifugation ? dans quelle fraction se trouvera la con A et justifier?

Mesurer le volume avec un cylindre gradué de 250 mL, prendre en note ce volume et transférer le surnageant dans un bécher de 250 mL. Prélever quatre aliquotes de 500 µL dans des microtubes identifiés (fraction SB - pour surnageant brut) et ranger au congélateur dans un support à microtubes convenablement identifié. Ces aliquotes seront analysées plus tard dans d'autres techniques de ce cours (électrophorèse, immunodétection...). Garder le reste du surnageant au réfrigérateur après avoir scellé au "Parafilm"[®] et identifié le bécher. Cette préparation sera utilisée pour la précipitation différentielle à la prochaine séance de laboratoire.

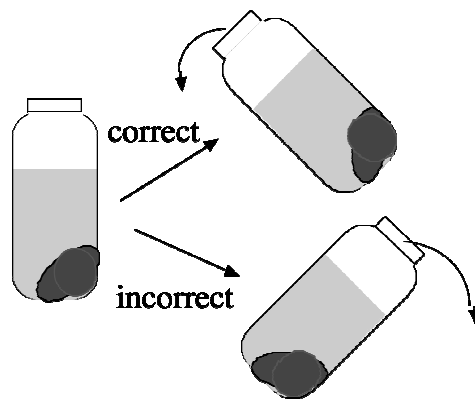


Figure 1.1.1 : Décantation d'une bouteille ou d'un tube à centrifuger

1.2 PRECIPITATION DIFFERENTIELLE

Cette manipulation a pour but de se débarrasser d'un grand nombre de protéines, celles qui sont solubles dans le sulfate d'ammonium 30% et insolubles à 80%. La con A, soluble entre 30 et 80% de saturation, sera récupérée. Vous devrez consulter le tableau de saturation (un de ces tableaux est donné dans le site web du cours en version pdf) pour trouver la quantité de sulfate d'ammonium pour amener sa

concentration de à 30% de saturation. Puis de 30 à 80%.

Agiter l'extrait brut quelques minutes à température de la pièce. Ajouter du sulfate d'ammonium, préalablement broyé très finement au mortier, pour amener solution à 30% de saturation. Cette addition devra se faire petit à petit pour en permettre une solubilisation graduelle et complète. Lorsque le $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ est totalement dissout, ajuster le pH à 7.0 (± 0.05) avec une base (NH_4OH) ou un acide concentré (H_2SO_4). Laisser agiter au moins une heure à la température de la pièce. Ces opérations se font à température de la pièce.

=> **Q1.2** En principe, devriez vous utiliser un acide ou une base pour ramener le pH à 7 dans une solution concentrée de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$? De plus, pourquoi l'acide proposé est-il du H_2SO_4 et la pas du HCl et la base du NH_4OH et non du NaOH ?

Centrifuger à 14 600 x g durant 30 min à 4°C.

- A-214 : centrifugeuse Sorvall RC5B et rotor SLA1500, diamètre de rotation 20.5 cm ;
- A-226 : Beckman J2-MC au A-107 (Rotor JA-14, diamètre de rotation 27.4 cm) ;
- Si nécessaire centrifuger une bouteille d'une équipe contre celle d'une autre équipe ; équilibrer en ajoutant dans la bouteille la plus légère du sulfate d'ammonium 30% (pH 7.0) que vous aurez préparé **d'avance** séparément dans du salin, une vingtaine de mL devrait être amplement suffisant.

Le sédiment résultant contiendra les protéines insolubles à 30% de saturation de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. La con A est toujours dans le surnageant puisqu'elle est soluble dans ces conditions.

Le sédiment obtenu étant plus ou moins compact dans le fond de la bouteille, il faudra manipuler les bouteilles très délicatement, en particulier durant le transport de la centrifugeuse à votre place de travail. Récupérer le surnageant par décantation. Si malgré tout des particules de sédiment sont tombées dans le surnageant lors de la récupération, filtrer les avec une couche simple d'étamine. Mesurer le volume.

Ajouter ensuite du $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ finement broyé pour en amener la concentration à 80% de saturation (calculé à l'aide du tableau de saturation). Si le pH n'est pas à 7.0 (± 0.05), rajuster et laisser agiter durant au moins une heure. Ces opérations se font à température de la pièce.

Ensuite, refroidir sur glace la préparation. Centrifuger comme précédemment (si nécessaire, équilibrer cette fois une deuxième bouteille contenant aussi l'extrait contenant le du sulfate d'ammonium 80% de saturation). Le sédiment résultant contiendra les protéines insolubles à 80% de saturation de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, incluant la con A. Décanter et éliminer le surnageant (contenant les protéines solubles à 80% de saturation). Recueillir le sédiment en le resuspendant avec une tige de verre dans 80 mL de PBS. Noter le volume de cette resuspension.

1.3 DIALYSE

Une dialyse servira maintenant à éliminer le sulfate d'ammonium et les autres sels éventuellement présents

dans la resuspension.

1.3.1 Mise en place

Préparer la membrane à dialyse Spectra/Por 4 (limite d'exclusion : 12-14 000 Da) qui aura été préalablement laissée tremper dans une solution destinée à enlever les contaminants reliés à sa fabrication et à son entreposage. Rincer à l'eau distillée l'intérieur et l'extérieur de la membrane. Nouer de façon étanche à une extrémité: tout d'abord avec une ficelle, puis en nouant le sac sur lui-même par dessus la ficelle. Vérifier l'étanchéité en mettant de l'eau distillée dans le sac. Vider le sac.

Transférer la resuspension dans le sac à dialyse. Nouer l'autre extrémité du tube en laissant un vide d'environ 20% du volume.

=> Pourquoi laisser ce vide?

Stabiliser le boudin de dialyse en mettant un poids à l'extrémité inférieure. Pour le transporter à la chambre froide, transférer le sac dans un bécher de 1 L contenant environ 800 mL de PBS froid. Dans la chambre froide, placer le boudin dans un bécher de 4 L contenant 3.5 L de PBS en l'attachant sur une tige de verre placée sur le bécher. Vous aurez préparé par ce PBS tel que décrit au paragraphe suivant.

Du PBS 10X (10 fois plus concentré que le PBS) est disponible au laboratoire. Vous devez faire vous-même votre solution de PBS à partir du 10X. Mesurer ce qu'il vous faut pour faire 3.5 litres de PBS 1X et apporter avec vous à la chambre froide, là où se trouve l'eau distillée froide. Amener aussi le bécher de 4 L, avec un aimant pour l'agitation ainsi que ce qu'il vous faut pour identifier votre bécher, à la chambre froide (C-021). Préparer le PBS 1X et remplir le bécher de 4 L. Laisser agiter durant une semaine. Le PBS du bécher devra être remplacé deux fois par 3 L de PBS durant les sept jours que durera la dialyse.

Il est de la responsabilité de chaque groupe de demander au technicien [par courriel : rene.marquette@umoncton.ca] de changer deux fois le PBS durant cette période.

⇒ A la fin de cette dialyse, où sera la con A (toujours dans le sac ?, à l'extérieur ?) ? Dans quel solvant sera-t-elle ? Justifier brièvement.

1.3.2 Récupération du rétentat

Récupérer le contenu (y compris le précipité blanc) du sac à dialyse en le coupant et en recueillant le liquide dans un bécher. En mesurer le volume et prélever quatre aliquotes de 500 µL dans des microtubes qui seront conservés avec les autres échantillons prélevés précédemment et identifiés adéquatement (fraction DL - pour dialyse). Ces aliquotes seront analysées lors d'autres techniques de ce cours (électrophorèse, immuno-détection...). Le reste servira à la chromatographie.

1.4 PURIFICATION PAR CHROMATOGRAPHIE D’AFFINITE

Cette étape a pour but de compléter la purification de la con A. A cette fin on expose le mélange de protéines à un gel ayant une affinité pour la con A mais pas pour les autres protéines. Il faudra, dans un premier temps, monter la colonne d’affinité, constituée ici de “Sephadex G-75[®]” (1.4.1). Ensuite, on récupérera le mélange dialysé qu’on chromatographiera (1.4.2) sur cette colonne. Remarquez que le Sephadex[™] est normalement utilisé pour la filtration sur gel. Cependant on l’emploie ici à cause de son affinité pour les lectines liant le glucose, Ce phénomène accidentel, non prévu dans la mise au point du Sephadex[®], en fait cependant un outil très utile pour purifier la concanavaline A et d’autres lectines. La résine Sephadex[®] sert donc ici pour une chromatographie d’affinité et non un tamisage moléculaire (filtration sur gel) comme dans 90-95% des cas. Normalement ce genre de manipulations se fait à 4°C dans une chambre froide, un réfrigérateur à chromatographie ou avec une colonne munie d’un système de refroidissement. Cependant nous n’avons pas la possibilité d’utiliser ces approches dans le cadre de ce cours. Comme la con A est relativement stable à température de la pièce, c’est dans ces conditions que vous travaillerez.

1.4.1 Montage de la colonne

Dans cette section, vous pourrez préparer tout le PBS dont vous avez besoin à partir d’une solution 10X qui vous sera fournie.

Pour monter la colonne, on se servira d’un tube de verre de 4.5 x 30 cm attaché par deux pinces à un statif (“support universel”). Poser un boyau de caoutchouc à la sortie de ce tube et installer une pince à vis qui servira de robinet (ouverture ou fermeture du débit). Faire couler un peu de PBS dans la colonne puis fermer le robinet de façon à ce qu’il en reste un peu dans le tube de verre (environ le cinquième de sa hauteur). Insérer un morceau d’ouate au-dessus de l’étranglement du tube et le stabiliser en poussant à l’aide d’une longue tige de verre (avec bouts rodés pour éviter de se blesser). Afin d’assurer un débit régulier et rapide il faut aussi qu’il ne se soit pas fixé de bulles d’air dans l’ouate ou dans le tube et que l’ouate n’ait pas été trop compactée. S’assurer que le débit est bon en faisant percoler du PBS en ouvrant le robinet. Arrêter l’écoulement en laissant une hauteur d’environ 10 cm de PBS dans le tube. S’assurer que la colonne est parfaitement verticale et stable. S’assurer aussi d’avoir un béccher pour collecter les déchets à la sortie de la colonne.

Ajouter la résine Sephadex G-75[®] préalablement équilibrée dans du PBS. La resuspendre délicatement (pour ne pas introduire de bulles d’air) mais suffisamment pour que le mélange ait une consistance homogène assez épaisse mais liquide. Verser la résine en la faisant couler le long d’une tige de verre afin de faire ce transfert proprement sans perdre de résine. Remplir le tube aux trois quarts du mélange et ouvrir le robinet. En même temps que le liquide sort du tube, on remarque que la résine s’entasse au fur et à mesure et se compacte dans le bas de la colonne. Rajouter progressivement d’autre Sephadex[®] jusqu’à ce qu’il y ait un total d’environ 12 cm de gel entassé dans la colonne. L’addition de résine supplémentaire doit se faire avant que celle déjà en place n’ait eu le temps de se déposer totalement. Il faut se rappeler que durant cette étape et toutes les suivantes, la

surface du gel ne doit jamais être exposée à l'air et toujours recouverte de liquide.

Compléter ensuite le montage en connectant un système d'alimentation de solvant (voir figure suivante). Ce système d'alimentation sera constitué d'un bouchon traversé d'un tube de verre relié à un autre tube de verre par un boyau de caoutchouc. Le réservoir de solvant sera simplement un bécher de 1 L posé à une hauteur suffisante pour assurer un débit satisfaisant. Ce système constitue en fait un siphon simple qui aspire du liquide du bécher dans la colonne à mesure qu'il s'en écoule à la sortie de celle-ci. Laisser percoler un peu de PBS à partir de ce système (en ouvrant le robinet) pour que le tout se stabilise. Fixer la hauteur du boyau de sortie à la position où il sera lors de la chromatographie. Régler ensuite le débit de la percolation à environ $8.5 (\pm 1)$ mL/min en faisant varier la hauteur du réservoir (la pince ouverte au maximum).

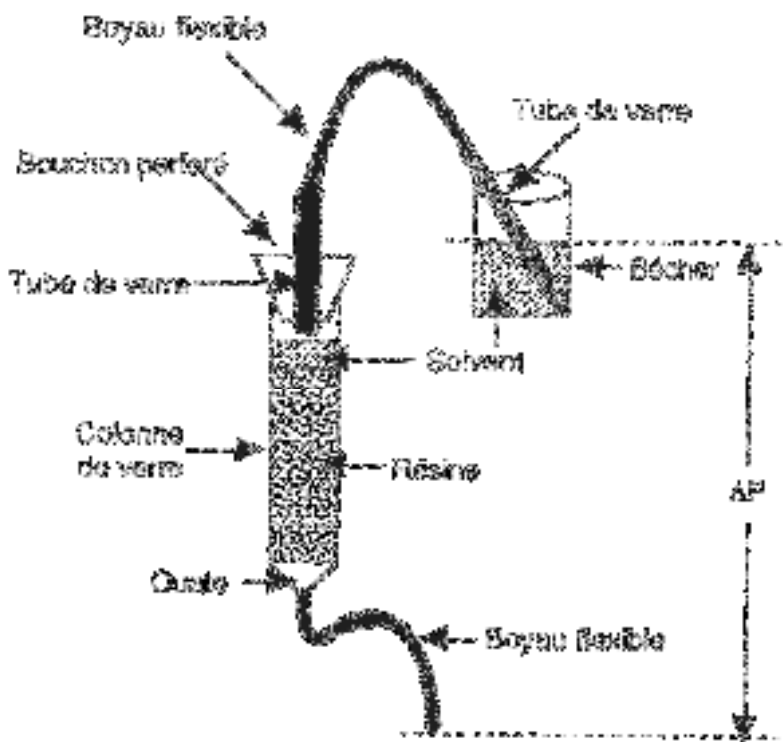


Figure 1.4.1: COLONNE D’AFFINITÉ MONTÉE AVEC SON SYSTÈME D’ALIMENTATION

Remarquez que dans ce type de montage ouvert, le débit est proportionnel à la pression hydrostatique (pression de travail, ΔP) qui est la différence de hauteur entre la sortie de la colonne et le niveau d'eau dans le réservoir. Le débit variera donc légèrement au fur et à mesure que le solvant s'écoulera. Cette instabilité n'est toutefois pas trop gênante dans une chromatographie préparative. Il ne faut pas essayer de contrôler le débit en serrant ou desserrant la pince, c'est le ΔP qu'il faut utiliser en modifiant la hauteur du bout du boyau de sortie ou la position du réservoir de solvant. La pince ne devrait servir qu'à démarrer ou arrêter la circulation de solvant.

Prendre en note la hauteur de la sortie du boyau inférieur et celle du niveau de liquide dans le bécher supérieur suffisant pour assurer le débit de 8.5 ± 1 ml/min.

Si la colonne de Sephadex™ n'est pas utilisée sur le champ pour la chromatographie, il faudra l'équilibrer avec une solution d'un agent préservatif antibactérien (Micr-o-protect™ ou autre) déjà préparée dans du PBS. Pour remplacer le PBS dans le réservoir avec la solution antibactérienne, en faire percoler un volume équivalent à au moins une fois le lit de la colonne avec cette solution.

Le lit d'une colonne à chromatographie est le volume total occupé par le gel ou la matrice elle-même plus le volume occupé par l'eau entre les particules constituant la matrice. Simplement on le calcule comme si c'était ce volume était un cylindre de diamètre égal à celui de la colonne et de hauteur égale à celle du gel (non pas de la colonne de verre en tant que telle) ; généralement on néglige le bout rétréci d'une colonne qui n'est pas complètement cylindrique et on le considère de forme cylindrique.

Comme les agents antibactériens sont destinés à empêcher la croissance de micro-organismes contaminants dans le gel, on doit les considérer comme toxiques et doivent être manipulés avec les précautions d'usage. Il faut aussi identifier adéquatement les récipients (béchers, colonne de gel, etc) susceptible de contenir ce produit et stocker les déchets dans un contenant réservé à cet effet.

Avant de partir, s'assurer que la colonne est à l'abri du soleil direct et qu'elle ne coule pas. Prendre aussi en note la position de la sortie du boyau inférieur et celle du niveau de liquide dans le bécher supérieur suffisant pour assurer le débit de 8.5 ± 1 ml/min.

1.4.2 Adsorption et élution de la colonne de chromatographie d'affinité

Si vous n'avez pas fait la partie 1.3.2, récupérer le contenu (y compris le précipité blanc) du sac à dialyse en le coupant et en recueillant le liquide dans un bécher et garder au frigo. En mesurer le volume et prélever quatre aliquotes de 500 µL dans des microtubes qui seront conservés avec les autres échantillons prélevés précédemment et identifiés adéquatement (fraction DL - pour dialyse). Ces aliquotes seront analysées lors d'autres techniques de ce cours. Le reste servira à la chromatographie.

Cette dernière se fait à température de la pièce à cause des installations dont nous disposons, idéalement elle devrait être faite à 4°.

Si la colonne a été laissée fermée plus de quelques heures et contient un agent préservatif (Micr-O-Protect™ ou autre) faire circuler du PBS (au moins une fois le volume du lit de la colonne – calculer ce volume) pour l'éliminer et re-stabiliser le débit entre 7.5 et 9.5 mL/min.

À chaque changement de solution en circulation dans la colonne (Micr-o-protect™ à PBS, PBS à solution de protéines, solution de protéines à PBS, PBS à PBS-G) il faudra

procéder de la façon suivante: laisser le niveau de la solution précédente redescendre à environ 5 mm de la surface du gel, ajouter ensuite environ 5 mL de la nouvelle solution avec une pipette Pasteur. Laisser écouler jusqu'à environ 5 mm de la surface du gel. Redéposer délicatement environ 10 mL de nouvelle solution. Laisser écouler jusqu'à environ 10 mm de la surface du gel. Remplir ensuite délicatement la colonne (jusqu'à environ 10 cm au-dessus du gel) de nouvelle solution et relier au réservoir d'alimentation contenant la nouvelle solution. Cette procédure a pour but de minimiser le mélange et l'étalement des solvants, ce qui diminuerait la résolution. Ici encore, il ne faut pas que la surface du gel entre en contact avec l'air. Comme le solvant continue de sortir vite de la colonne, 5 mL en sortent en environ 45 sec. de la colonne, il faudra procéder de façon très rapide et tout avoir à portée de la main : pipette Pasteur, de solution de rechange, etc.

Après que la colonne sera stabilisée, tel que décrit précédemment, appliquer l'échantillon puis poursuivre en faisant circuler du PBS. Environ 90 min après que ce PBS aura été mis à percoler, recueillir à toutes les 5-10 minutes des échantillons de 2-3 mL d'éluat et en lire l'absorbance à 280 nm (blanc: PBS) et l'enregistrer dans votre cahier.

⇒ Q 1.3 Expliquer la raison pour le choix de 280 nm pour prendre la mesure de l'absorbance.

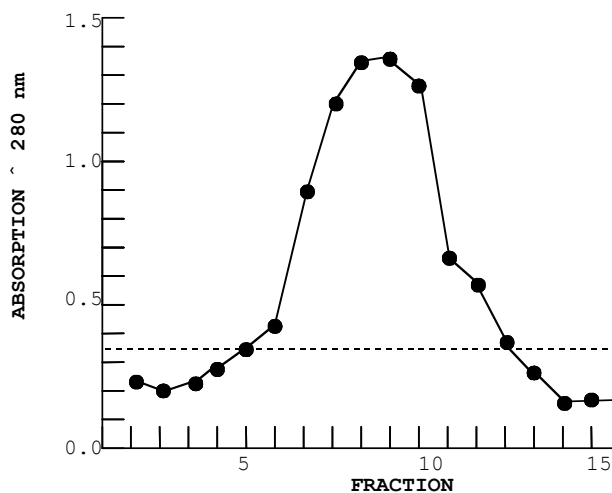


Figure 1.4..2: PROFIL D'ÉLUTION TYPIQUE D'UN CHROMATOGRAMME.

Dans cet exemple, on recueillera et combinera toutes les fractions ayant une absorption supérieure à 25% de 1.35 (maximum du pic d'élution) soit les fractions 6 à 14.

Quand l' A_{280} sera inférieure à 0.075, arrêter la circulation de PBS et remplacer par du PBS-glucose 0.2 mol/L (PBS-G). Recueillir l'éluat en fractions de 25 mL dans des éprouvettes préalablement grossièrement calibrées par une ligne que vous aurez tracé à environ 25 mL. Lire l' A_{280} d'échantillons d'environ 2 mL de chacune des fractions ainsi recueillies (blanc: PBS-G).

Après la lecture recombinaison ces échantillons avec le reste de la fraction d'où ils proviennent. Il faudra sans doute diluer certains échantillons avec du PBS-G puisque la mesure de l'absorbance avec le spectrophotomètre n'est valable que jusqu'à 1.0 unité d'absorbance. Aussitôt qu'une fraction a été recueillie et son absorption mesurée, il faudrait la mettre sur glace.

=> Quel serait le meilleur diluant pour ces échantillons trop concentrés et pourquoi ?/9+ Si vous n'avez à votre disposition que de l'eau pour diluer les échantillons trop concentrés, quel serait le blanc ?

N'oublier pas, par la suite, de corriger les mesures par le facteur de dilution. Arrêter la chromatographie quand l' A_{280} sera redescendue au-dessous de 0.1. Combiner le contenu des éprouvettes dont l' A_{280} est supérieure à 25% de l' A_{280} maximale (voir figure 1.4.2), environ 4-5 tubes. Il s'agit de la préparation de con A purifiée.

Dialyser cette préparation contre de l'eau dans la chambre froide tel que décrit en 1.3. Ne pas oublier de demander l'aide du technicien quant aux changements de tampon. Récupérer le "Sephadex" dans un contenant sous la hotte.

=> A la fin du processus de dialyse, quelle devrait être la concentration de chaque sel ou produit à l'intérieur du sac à dialyse (phosphate, glucose, con A, etc.) (supposez un volume de rétentat de 100 mL et trois dialyses contre 3.5 L de dialysat).

1.5 LYOPHILISATION

Il faut maintenant concentrer la con A purifiée. Pour cela, la solution diluée résultant de la dialyse sera lyophilisée et ensuite redissoute dans un volume beaucoup plus petit. Puisqu'une des étapes de cette opération consiste en l'exposition de la solution à de l'azote liquide, il est nécessaire de porter des gants isolants et un écran protecteur à cause des projections possibles.

Mettre le lyophilisateur (Virtis, Freezemobile) en marche. S'assurer que toutes les valves sont fermées, que le couvercle est bien installé et que le condensateur a été vidé récemment, ensuite démarrer la réfrigération. Lorsque la température est inférieure à -40°C , démarrer la pompe à vide. Laisser la pression interne atteindre 100 Torr (100 μm de mercure) ou moins.

Le lyophilisateur aura déjà été mis en marche pour vous. Quand vous arriverez au laboratoire la pression et la température devraient avoir atteint leurs niveaux de fonctionnement. Cependant vous devez connaître la séquence des étapes de la mise en marche.

Transférer alors la solution de con A dans un ballon à lyophilisation et garder au réfrigérateur jusqu'à la congélation dans l'azote liquide. Le ballon ne doit pas être rempli à plus du tiers de sa capacité. Fermer hermétiquement avec le bouchon (comprenant l'adaptateur) dont le papier filtre est solidement en place. Toujours en se protégeant les mains avec des gants isolants, plonger le ballon dans de l'azote liquide en le tenant à un angle de $45-60^{\circ}$ tout en lui donnant un mouvement de rotation, pour que la solution

s'étale le plus possible sur la surface interne. Ne plus laisser dégeler la solution.

=> Pourquoi faut-il étaler la solution le plus possible sur la surface du ballon ?

Installer le ballon en insérant l'adaptateur du bouchon dans une valve de connexion du lyophilisateur. Le renflement sur le tube de connexion devrait être bien ajusté dans le sillon à l'intérieur de la valve, ce tube devrait être en ligne droite par rapport à la sortie de la valve. Lorsque que le montage est bien stable (à ce moment, la pression du lyophilisateur devrait être inférieure à 100 Torr), ouvrir la valve. Un bruit caractéristique devrait se faire entendre (le vide se faisant dans le ballon) durant quelques secondes puis revenir à la normale. Le ballon suivant ne devrait être raccordé au lyophilisateur que lorsque la pression est redescendue sous les 100 Torr.

Comme cela peut prendre un certain temps pour que la pression redevienne suffisamment basse, les équipes devront attendre un certain temps, 5-20 min selon le nombre de ballons en place, pour installer le suivant. Il faudra alors que les équipes s'entendent pour passer à tour de rôle. La lyophilisation prendra probablement un peu plus de 24 heures. Il faudra revenir le lendemain après-midi pour récupérer le ballon. Assurez-vous de la présence du professeur ou du démonstrateur à ce moment.

Lorsque toute l'eau est sublimée, le matériel non volatile prendra l'apparence d'une poudre floconneuse très légère. Ce point est facile à déceler car la température de la surface externe du ballon sera revenue à celle de la pièce. Fermer alors lentement la valve de connexion et retirer délicatement le ballon, qui contient alors con A purifiée sous forme de poudre. Ranger le ballon adéquatement identifié au congélateur.

=> **Q1.4** Pourquoi ce changement de température du ballon lorsqu'il ne reste plus d'eau à sublimer (un « vieux » principe de chimie-physique)?

Quand tous les ballons ont été enlevés, arrêter le lyophilisateur. Pour cela, ouvrir tout d'abord doucement une valve, pour rétablir la pression atmosphérique dans le système, et seulement ensuite arrêter la pompe et la réfrigération. Il ne faut JAMAIS qu'une pompe à vide soit arrêtée sous faible pression pour éviter le reflux d'eau dans l'huile de la pompe.

1.6 RECUPERATION ET CONSERVATION DE LA CON A

Peser à la balance semi-analytique, en utilisant une nacelle pré-tarée de dimension appropriée, toute la con A obtenue. Prendre en note ce poids. Porter un masque pour cette opération, la con A « solide » formant une poudre légère et floconneuse qui s'envole facilement. Calculer le rendement en connaissant le poids de con A et celui initial de fèves.

Dissoudre ensuite 100 µg de cette con A dans du PBS pour obtenir une solution de précisément 2 mg/mL. Pour cela, peser 100 µg de con A dans une nacelle, mettre environ 5 mL de PBS dans la nacelle, solubiliser le mieux possible la con A et transférer

dans une fiole jaugée de volume approprié. Rincer la nacelle avec au moins 3 fois avec du PBS. Compléter le ballon au volume. Agiter pour compléter la dissolution de la con A. On devrait obtenir une solution légèrement turbide ou opalescente (« hazy »). Aliquoter cette solution dans une dizaine de microtubes en fractions de 1.25 mL et les déposer dans un support à microtubes. Garder le reste de la poudre dans une petite bouteille. Identifier ces contenants et garder au congélateur jusqu'à usage. Lorsque vous en aurez besoin, vous n'aurez qu'à décongeler une aliquote de cette solution concentrée et, s'il y a lieu, la diluer à la concentration voulue dans le solvant requis. Garder la con A au froid autant que possible.

A la fin, n'oubliez pas de laver le ballon à lyophiliser, bien épousseter l'intérieur de la balance et, si de la con A est tombé sur le comptoir, laver avec de l'eau (et non pas simplement épousseter)

1.7 DOSAGE BIOLOGIQUE DE LA CON A (TEST D'AGGLUTINATION)

Il existe plusieurs façons de mesurer la quantité de protéines dans une solution, la plus facile étant évidemment la mesure de l'activité enzymatique. Cependant des techniques spécifiques ont dû être développées pour quantifier des protéines n'ayant pas d'activité enzymatique particulière comme la con A. Une de ces approches est de mesurer une propriété biologique de la protéine en question, un biodosage ("bioassay"). Dans le cas de la con A, on se sert de sa propriété de lier des molécules de glucose ou de mannose (mais non pas certains autres comme le galactose, fructose, ribose...). Comme ces deux sucres sont présents dans les glycoprotéines ou les glycolipides à la surface des globules rouges, la con A, ayant quatre sites de fixation, peut agglutiner ces cellules. Ce phénomène est la formation de larges complexes de globules rouges unis entre eux par des « ponts » de con A, ces agglomérats vont sédimenter de façon typique. Dans le test que vous allez faire, il s'agira donc de mettre des globules rouges en présence de con A et de divers sucres, pour prouver que l'agglutination observée est bien due à la con A et non à une autre lectine ayant d'autres propriétés agglutinantes. Le site du SITUUB sur la concanavaleine A donne des exemples de l'allure de cette agglutination qu'il ne faut pas confondre en une simple sédimentation des cellules.

Ici vous testerez des dilutions doublantes de mannose et de glucose dans un volume de 50 µL.

Préparer, à partir de la solution concentrée de con A 2 mg/mL (1.6), une quantité suffisante de con A 100 µg/mL de PBS (con A100 µg/mL). Faire 20 mL d'une solution mannose 20 mg/mL avec du mannose solide et du PBS comme solvant, ce sera la solution concentrée de mannose. Faire de même avec du galactose solide pour obtenir une solution concentrée de galactose. Préparer ensuite une quantité suffisante d'une solution contenant du mannose 1 mg/mL et de la con A 100 µg/mL (con A/man/PBS) dans le PBS à partir de la solution concentrée de mannose, de con A concentrée et de PBS (con A/man/PBS). De la même façon, préparer une solution contenant du galactose 1 mg/mL et de la con A 100 µg/mL à partir des solutions requises (con A/gal/PBS). Vous aurez également à votre disposition une solution de con A 100 µg/mL de PBS obtenue commercialement (con A commerciale/PBS) qui permettra de comparer avec celle que vous aurez préparée.

Ne pas confondre les solutions concentrées de mannose ou de galactose, que vous venez de préparer et qui serviront dans la deuxième étape du biodosage, avec les solutions diluées déjà préparées de mannose 1 mg/mL et de galactose 1 mg/mL, qui serviront de diluant dans la première étape du biodosage.

Dans le biodosage, vous aurez quatre rangées : une première de con A 100 µg/mL que vous avez préparée (« votre » con A), une deuxième de con A commerciale 100 µg/mL qui vous aura été fournie, une troisième de votre con A en présence de mannose, et, enfin, une quatrième de votre con A en présence de galactose.

Les microplaquettes que vous emploierez ont 96 puits : 8 rangées par 12 colonnes. Chaque rangée est identifiée sur la plaquette même par des lettres (A à H) et chaque colonne par des nombres (1 à 12), donnant un puits A1,.... D5,.....H12. Cela facilite la prise en note et l'identification du contenu de chaque puits. Vous puisque vous n'avez besoin que de quatre rangées, vous n'avez pas nécessairement à utiliser celles qui sont côte à côte.

Déposer une microplaquette (plaque à titration) à fond rond sur une feuille de papier blanc pour faciliter l'observation. La première étape consistera à mettre le diluant adéquat, soit du PBS, soit du mannose 1 mg/mL (mannose dilué), soit du galactose 1 mg/mL (galactose dilué), dans les rangées appropriées de la microplaquette. Pour cela, déposer 25 µL de PBS dans les onze derniers puits (sur douze) de deux rangées de la microplaquette. Déposer aussi 25 µL de mannose 1 mg/mL (dans du PBS) dans les onze derniers puits d'une troisième rangée. Déposer ensuite 25 µL de galactose 1 mg/mL (dans du PBS) dans les onze derniers puits d'une quatrième.

La deuxième étape consistera à faire onze dilutions doublantes de chacune des solutions de con A (solubilisée dans le solvant adéquat) dans les rangées appropriées. Tout d'abord, placer 2 x 25 µL de con A/PBS dans le premier puits (vide) d'une des rangées contenant du PBS. Répéter pour l'autre rangée contenant du PBS avec 2 x 25 µL de con A commerciale/PBS. Cette con A commerciale vous sera fournie sous forme de con A 100 µg/mL de PBS. Faire la même chose pour la con A/man/PBS et la con A/gal/PBS, chacune avec sa rangée correspondante.

Ensuite, prélever 25 µL du premier puits (contenant 50 µL) de con A avec ou sans le sucre approprié) et le transférer dans le puits suivant (contenant déjà 25 µL de PBS avec ou sans sucre). Bien mélanger en aspirant et refoulant lentement une ou deux fois avec la micropipette. Prélever 25 µL de ce second puits (qui contiendra à ce moment 50 µL) et le déposer dans le puits suivant. Mélanger et répéter le processus pour les autres puits de la rangée. Au douzième puits, rejeter le 25 µL au lieu de le transférer dans le puits suivant. Faire la même chose pour les autres rangées.

Dans chaque rangée vous avez donc le premier puits contenant 25 µL (deux fois 25 µL de con A 100 moins 25 µL transféré dans le puits suivant) de con A 100 µg/mL. Dans le deuxième, 25 µL de con A 50 µg/mL (25 µL de PBS plus 25 µL de con A 100 µg/mL moins le 25 µL transféré au puits suivant), dans le troisième 25 µL de con A 25 µg/mL et ainsi de suite. La différence entre chaque rangée réside dans l'absence ou la présence de

sucre (mannose ou galactose) ou le type de con A.

La troisième étape consistera à exposer des globules rouges aux diverses concentrations de con A (avec ou sans monosaccharides). A cette fin, resuspendre délicatement la solution de globules rouges en inversant doucement le contenant (normalement un vial de 25 mL). Dans chaque puits ajouter 25 μ L de resuspension de globules rouges (environ 3×10^6 cell/ml). Laisser agglutiner au moins 60-90 minutes (maximum 240 min) à température de la pièce.

- ⇒ Dans des dilutions doublantes, la concentration d'un puits est le double de la dilution précédente. Sur un modèle similaire, on peut préparer des dilutions triplantes (la concentration d'un puits est le triple de la dilution précédente), décuplantes (la concentration d'un puits est dix fois plus que celle de la dilution précédente), etc. Dans cette expérience, vous avez préparé 50 μ L de dilutions doublantes de différents sucre (si on ne compte pas les globules rouges). Comment auriez-vous préparé 100 μ L de dilutions décuplantes ?

SOLUTIONS DISPONIBLES (SOUS FORME SOLIDE OU LIQUIDE):

Fèves de haricot-sabre

salin: NaCl 0.15 mol/L (4°C)

PBS: NaCl 0.14 mol/L, KCl 2.7 mmol/L, Na₂HPO₄ 8.1 mmol/L, KH₂PO₄ 1.5 mmol/L: pH 7.2 (4°C)

PBS 10X : NaCl 0.14 mol/L, KCl 27.0 mmol/L, Na₂HPO₄ 81 mmol/L, KH₂PO₄ 15 mmol/L: pH 7.2 (4°C)

Séphadex G-75: resuspension dans PBS

Micr-o-protect TM--- ATTENTION POSSIBLEMENT TOXIQUE --- 0.1% dans PBS

PBS-glucose: glucose 0.2 mol/L dans PBS

con A étalon 100 μ g/mL dans PBS

galactose 1 mg/mL dans PBS (« galactose dilué »)

mannose 1 mg/mL dans PBS (« galactose dilué »)

resuspension de globules rouges: environ 3×10^6 globules rouges de mouton/mL de PBS

galactose (solide) et mannose (solide)

2 - ÉLECTROPHORÈSE EN GEL DISCONTINU DE POLYACRYLAMIDE-SDS

Les électrophorèses servent à séparer les protéines selon leur charge, leur masse ou leur taille. Dans celle que vous faites dans ce laboratoire, la séparation se fait uniquement sur la base de la masse. En effet, le traitement au dodécylsulfate de sodium (SDS) et au β -mercaptoéthanol (β ME) à haute température permet de détruire la conformation native des protéines et de leur donner une géométrie similaire et une charge négative proportionnelle à leur masse. Seule leur taille, donc leur masse, influera sur leur vitesse de migration et leur séparation. Cette technique est donc appropriée pour estimer le poids moléculaire apparent des protéines.

Un des problèmes rendant difficile la séparation des protéines est le volume de l'échantillon déposé sur le gel, réduisant d'autant la résolution. Pour éliminer ce problème, on procède à un entassement électrophorétique de l'échantillon précédant la séparation en tant tel, d'où la présence deux gels, un de tassement et un de séparation. Le tassement se fait grâce à un phénomène électrique résultant de la différence dans la composition ionique et du pH entre chacune des parties du système (tampon d'électrode, gel de tassement et gel de séparation). La séparation ne se fait que dans le gel de séparation qui contient une concentration suffisante d'acrylamide pour retarder de façon différentielle les protéines selon leur taille. C'est le principe de la méthode de Laemlli qui est maintenant utilisée partout pour la grande majorité des séparations électrophorétiques des protéines.

Consultez le SIITUB pour des explications complètes sur cette technique.

Dans cette expérience, vous analyserez la composition en protéines de votre préparation de con A purifiée et la comparerez à une préparation commerciale et aux fractions recueillies lors de la purification (SB et DL). Vous serez ainsi en mesure de visualiser le processus de purification que vous avez fait, de comparer votre préparation de con A à celle qui se vend dans le commerce et d'estimer la masse moléculaire de la protéine que vous avez obtenue.

Vous utiliserez le système d'électrophorèse dont le manuel d'instruction est disponible. L'acrylamide non polymérisé est un DANGEREUX NEUROTOXIQUE, il faudra donc porter des gants lorsque ce produit est manipulé. D'autre part il est très important de ne pas confondre les Tris-Cl pH 8.8 et pH 6.8 qui doivent être utilisés à des moments différents.

Un gel de 1,5 mm d'épaisseur et de 16 cm de largeur sera employé. La hauteur du gel de séparation sera de 10 cm et celle du gel de tassement de 6 cm (incluant la hauteur des puits). Il faudrait donc préparer un excès de chacun des volumes requis en 3.2.1 et 3.3.1. Ces volumes sont facilement calculables à l'avance d'après ces dimensions.

2.1 MONTAGE DES PLAQUES

Préparer d'abord le "sandwich" de plaques de verre. Pour cela, déposer une plaque de verre sur le comptoir, de façon à ce qu'elle en dépasse le bord de quelques centimètres. Mettre les écarteurs ("spacers") à l'extrémité de cette plaque puis déposer la seconde plaque sur les écarteurs pour former le "sandwich". Aligner soigneusement l'écarteur avec le rebord des plaques du côté dépassant la table. Placer le rebord du sandwich dans l'étau ("clamp") et en serrer une seule des vis. Retourner le sandwich, installer l'autre étau après avoir aligné l'espaceur et les plaques et en serrer une seule des vis. Poser le sandwich debout dans son support. Desserrer les vis et aligner soigneusement le rebord

horizontal des plaques et de l'écarteur sur la surface plane. Serrer la vis du milieu de chaque étau.

Vérifier au toucher si les rebords supérieurs des plaques sont parfaitement alignés. Si les plaques ne pas sont très bien ajustées, il y aura inévitablement une fuite lors du coulage du gel. Dans ce cas, reprendre le processus de mise en place du « sandwich ». Lorsque c'est fait, serrer toutes les vis de chaque étau. Installer le sandwich dans le support de montage sur lequel le joint d'étanchéité ("sealing gasket") en caoutchouc.

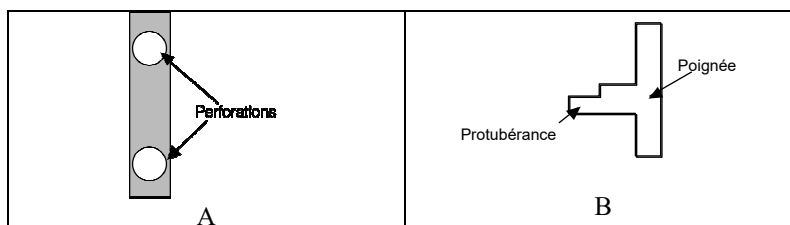


Figure 3.1.1 : A) Étau B) Came.

Les deux dessins ne sont pas à l'échelle, les étaux sont environ quatre fois plus gros que les cames

Le montage des plaques doit être inséré dans les guides latéraux du support de façon à ce que les vis des étaux soient face à vous. Les perforations de chaque côté des guides devraient aussi être vis-à-vis les perforation inférieures de chaque étau. Insérer les cames ("adjusting cams") dans les perforations de chaque côté du support, de façon que la protubérance de la came soit vers le haut.

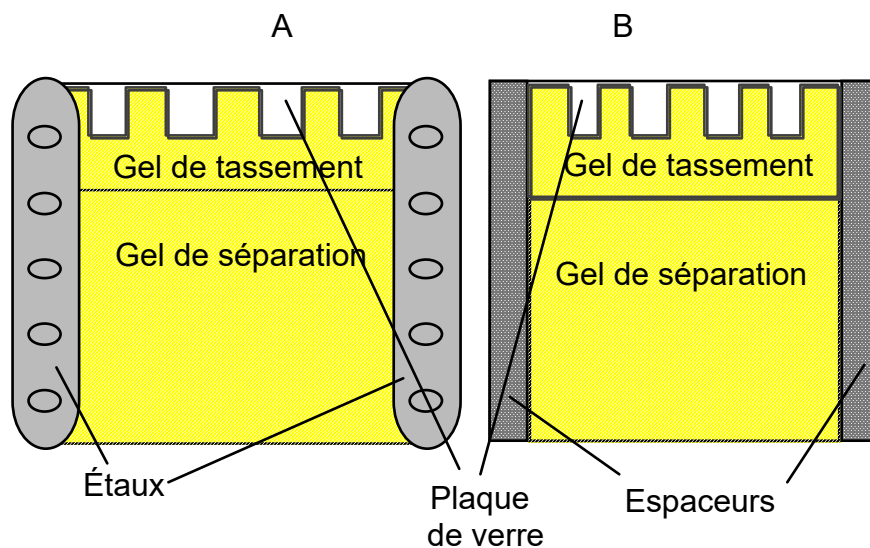


Figure 3.1.2 MONTAGE DE GEL D'ACRYLAMIDE
A) Vue de face avec étaux; B) Vue de face sans étaux

Tourner simultanément les deux cames de 180° pour comprimer la base des plaques de verres sur le joint de caoutchouc. De cette façon, la protubérance, en allant vers le bas, exercera une pression et poussera le rebord du sandwich contre le joint et assurera

l'étanchéité du montage

On peut vérifier l'étanchéité du montage en mettant de l'eau sur le bord externe des plaques. S'il en pénètre à l'intérieur, il y a un gros problème de fuite et il faut reprendre le montage. Pour plus de détails, référer au manuel d'instructions de l'appareil.

2.2 GEL DE SEPARATION

Dans cette étape, il faudra préparer et ensuite couler le gel de séparation. Ce dernier se retrouvera donc au bas du montage.

2.2.1 Préparation de la solution de gel de séparation

Préparer le mélange pour le gel de séparation en combinant les solutions-stock (acrylamide, bis, Tris pH 8.8, SDS ; voir la liste des solutions à la fin de cette section) selon les volumes requis (d'après vos calculs) pour obtenir les concentrations finales suivantes: acrylamide 12.5%, bis 1.0 mg/mL, Tris-Cl (pH 8.8) 0.375 mol/L, SDS 0.1% et compléter avec de l'eau comme diluant. Durant cette préparation, éviter de trop agiter le mélange pour en minimiser l'aération pour ne pas introduire d'oxygène, un inhibiteur de la polymérisation, dans le mélange. Pour une réaction de polymérisation plus fiable et mieux contrôlée, utiliser des solutions stocks dont la température est revenue à celle de la pièce.

- ⇒ **2.1 a** D'après les dimensions des plaques et les autres informations du protocole, quel est le volume de gel de séparation y aura-t-il dans le montage ?
- ⇒ **2.1.b** Quelles sont le %A, %T et %C de ce gel ?

2.2.2 Coulage et polymérisation du gel de séparation

Tracer une petite marque sur la plaque de verre indiquant le niveau de 10 cm. Juste avant le coulage du gel, ajouter 125 μ L de persulfate d'ammonium (PSA) 10% p/v fraîchement préparé, immédiatement suivi de 50 μ L de TEMED.

Assurez vous que la solution du gel est à température de la pièce. Pour éviter le gaspillage, préparer un petit volume de PSA 10% (entre 500 et 1000 μ L) en mettant une petite quantité de PSA solide (entre 50 et 100 mg) dans une petite nacelle à peser. Ajouter ensuite le volume d'eau nécessaire pour amener la concentration à 10% (ex. : 756 μ L d'eau ajoutés à 75.6 mg de PSA). Transférer alors dans un microtube que vous garder fermé jusqu'à emploi. La solution de PSA est utilisable dans les 5-10 minutes qui suivent l'addition d'eau. Ne jamais combiner ensemble le PSA et le TEMED avant de les ajouter au reste de la solution.

- => Pourquoi faut-il employer du PSA fraîchement préparé ?
- => Pourquoi ne faut-il pas pré-mélanger le PSA et le TEMED ?

Bien mélanger le PSA à la solution, puis le TEMED au reste de la solution en l'agitant quelques secondes doucement en cercle et en évitant toutefois d'introduire des bulles d'air. Immédiatement après, verser la solution du gel de séparation entre les deux plaques de verre à l'aide d'un "entonnoir" fait d'une seringue de plastique munie d'un embout pour micropipette automatique et scellé avec du Parafilm™. Laisser la seringue se vider d'elle-même jusqu'à la marque que vous avez faite préalablement sur la plaque de verre. Ne pas utiliser le piston de la seringue pour la vider, car cela introduit des bulles d'air. Recouvrir immédiatement d'isobutanol saturé (i.e la phase supérieure de la bouteille contenant le mélange isobutanol-eau) à l'aide d'une pipette Pasteur de plastique (genre compte-gouttes). Eviter les pipettes Pasteur de verre car elles risquent de casser entre les deux plaques.

On peut constater la polymérisation par la présence d'une "double" interface gel-eau-isobutanol saturé et par la gélification du restant de solution d'acrylamide qui n'a pas été coulée entre les deux plaques. Après la polymérisation, éliminer les traces d'isobutanol en rinçant 3 ou 4 fois avec quelques mL de TGS (tampon de gel de séparation: Tris 375 mmol/L pH 8.8, SDS 0.1%) que vous aurez préparé vous-même à partir des solutions-stock. Recouvrir ensuite le gel de 2-3 mL de TGS et, si le gel de tassement n'est pas coulé rapidement, le ranger au réfrigérateur dans une cuve à chromatographie hermétiquement scellée contenant 300-400 mL de TGS dans le fond.

=> D'où vient l'« eau » entre le gel et l'isobutanol ? S'agit-il d'eau pure ?

Rincer immédiatement "l'entonnoir" pour éviter que de l'acrylamide ne se solidifie et ne le rende inutilisable.

2.3 GEL DE TASSEMENT

Vous préparerez puis coulerez le gel de tassement. Il se retrouvera donc par dessus le gel de séparation et les protéines devront le traverser (et s'entasser) avant d'atteindre ce dernier.

Durant tout ce processus, il est important d'éviter le mélange des espèces ioniques de chacune des phases du montage: gel de tassement, gel de séparation et tampon d'électrode. C'est pourquoi il faut rincer adéquatement aux moments voulus. Remarquez également qu'ici c'est la solution de Tris pH 6,8 que vous devez employer ici.

2.3.1 Préparation de la solution

Pour préparer le gel de tassement, combiner les solutions-stock pour obtenir les concentrations finales suivantes: acrylamide 5%, bis 1.5 mg/mL, Tris-Cl (pH 6.8) 0.125 mol/L, SDS 0.1%. Durant cette préparation, éviter de trop agiter le mélange pour en minimiser l'aération. Ce gel ne doit être coulé que quelques minutes avant le dépôt des échantillons pour éviter le mélange des composantes chimiques des deux gels.

- ⇒ D'après les dimensions des plaques et les autres informations du protocole, quel est le volume de gel de tassement y aura-t-il dans le montage (négligez les dimensions du peigne)?
- ⇒ **Q2.2** Quelles sont le %A, %T et %C de ce gel ? Ces valeurs diffèrent-elles de celle du gel de séparation ? Si oui, pourquoi ?

2.3.2 Coulage du gel de tassement

Ces manipulations sont très semblables à celles du gel de séparation, sauf pour les solutions évidemment.

S'il y a lieu, laisser la solution de gel de tassement et le montage contenant le gel de séparation revenir à température de la pièce. Quelques secondes avant de couler le gel de tassement, éliminer les traces de TGS en rinçant le gel de séparation à quelques reprises avec du TGT (Tris-Cl (pH 6.8) 0.125 mol/L, SDS 0.1%) que vous aurez préparé vous-même à partir des solutions-stock. Encore ici, utiliser une pipette Pasteur de plastique. Juste avant de couler le gel, ajouter 50 μ L de TEMED et 100 μ L de PSA fraîchement préparé au reste de la solution ramené à température de la pièce. Verser alors la solution par-dessus le gel de séparation. Utiliser une seringue en guise d'entonnoir dans la plaque sur laquelle le peigne est déjà installé en diagonale de façon à ce que toutes les dents soient, en tout ou en partie, insérées entre les deux plaques de verre. Retirer l'entonnoir et pousser le peigne dans sa position correcte, horizontale et bien centrée sur le gel, en évitant la formation de bulles et laisser polymériser. Ne couler le mélange du gel de tassement que quelques minutes avant le dépôt des échantillons pour éviter le mélange de ses composantes ioniques avec celles du gel de séparation. Numéroté quelques puits au crayon gras, par exemple les puits impairs, directement sur la plaque de verre. Après polymérisation, enlever délicatement le peigne en tirant lentement mais de façon continue et uniforme vers le haut. Remplir les puits de TGT jusqu'au dépôt des échantillons si cela n'est pas fait dans les secondes qui suivent. A ce moment, éliminer les traces de TGT en rinçant deux fois les puits avec du tampon d'électrode (TEL) 1X (voir 3.5), puis les remplir avec ce tampon. Utiliser encore ici une pipette de plastique. Si du tampon reste pris dans les puits et ne semble pas en sortir facilement pour le rinçage, adsorbez-le avec un essuie-tout.

Les échantillons doivent être déposés dans les minutes qui suivent pour éviter la diffusion des composantes ioniques d'une phase à l'autre.

2.4 ÉCHANTILLONS ET ETALONS

A cette étape, vous allez préparer les protéines de vos différents échantillons selon leur masse moléculaire, les petites protéines migreront plus vite que les grosses. Dans le tampon contenant du SDS et du β -mercaptoéthanol et soumis à un chauffage, les protéines sont, le cas échéant, dénaturées, dissociées en leurs sous-unités polypeptidiques et ramenées à une forme plus ou moins cylindrique. Vous ferez également migrer des étalons de poids moléculaires qui vous serviront à faire une courbe d'étalonnage: log de la masse moléculaire en fonction de la distance de migration (ou R_f). Cela vous permettra d'attribuer une masse

apparente aux diverses protéines de vos échantillons.

La coloration au bleu de Coomassie que vous utiliserez plus tard permet de détecter 2-10 μg d'une protéine pure ou les 5-15 protéines majeures de 50-100 μg d'un mélange de protéines. Les dilutions que vous allez faire des différents échantillons ont pour but d'atteindre approximativement ces quantités dans le volume de 15 μL que vous déposerez dans chaque puits.

2.4.1 Préparation des échantillons et étalons

Combiner dans un microtube anti-éclaboussures: 100 μL de votre préparation purifiée de con A (préalablement ramenée à 1 mg/mL avec de l'eau) et 100 μL de TEC 2X (cette fraction sera appelée "pur"). De la même façon, combiner 100 μL de con A commerciale 1 mg/mL avec 100 μL de TEC 2X (fraction "com"). Combiner aussi 25 μL de rétentat de la première dialyse (fraction DL, recueillie en 1.3.2 de partie précédente du laboratoire) avec 175 μL de SDS 10% et 200 μL de TEC 2X. Combiner ensuite 25 μL du surnageant brut (fraction SB, recueillie en 1.1) avec 275 μL de SDS 10% et 300 μL de TEC 2X. Combiner 50 μL d'étalons de poids moléculaires (eta), 10 μL de SDS 10% et 60 μL de TEC 2X. La nature et le poids moléculaire de ces étalons sont décrits dans leur manuel d'instruction (voir site web) et dans la liste des solutions à la fin de cette section. Ces préparations peuvent alors être congelées jusqu'à leur dépôt si celui-ci n'est pas fait dans les minutes qui suivent.

2.4.2 Dépôt des échantillons et étalons

Si nécessaire, décongeler les échantillons et agiter pour les dissoudre. Avant le dépôt, durant la gélification du gel de tassement, chauffer les préparations 4 min dans de l'eau bouillante. Laisser refroidir et clarifier les échantillons en centrifugeant 3 min à vitesse maximale dans une microcentrifugeuse. Comme la solution est très foncée et que le sédiment ne se verra pas, disposer les tubes dans la centrifugeuse de façon à ce que la boucle reliant le tube au couvercle soit placée vers l'extérieur du rotor. De cette façon, vous saurez exactement où se déposera l'éventuel sédiment.

- ⇒ Pourquoi est-il préférable de chauffer les échantillons après la congélation juste avant le dépôt. Ne serait-il pas la même chose de les chauffer, de les congeler puis de les déposer immédiatement après décongélation ?

Déposer au fond des puits, à l'aide d'une microseringue, sous le TEL déjà présent, 15 μL de chacun des surnageants résultants. Prélever ces surnageants en faisant attention de ne pas toucher à l'éventuel sédiment au fond du microtube. Disposer les cinq échantillons en trois séries identiques en respectant l'ordre suivant: eta, sb, dl, pur, com. Pour faciliter les choses, il est plus facile de déposer toutes les aliquotes d'un même échantillon une après l'autre dans leurs puits respectifs puis de passer à un autre échantillon. Ne pas oublier de rincer soigneusement la microseringue avec du TEL 1X entre chaque échantillon pour

éviter toute contamination croisée. De plus, rincer à plusieurs reprises la microseringue avec de l'eau distillée avant de la ranger pour éviter que des sels résiduels sèchent et coincent le piston.

Mettre deux montages (de deux équipes) sur une même base et déposer le réservoir supérieur (muni de ses joints d'étanchéité) sur les montages pour que les perforations supérieures des étaux coïncident avec celles du réservoir. Insérer les comes, protubérance vers le bas, et comprimer les plaques contre le joint d'étanchéité du réservoir en les tournant de 180°. Recouvrir délicatement le sommet du gel, à travers la fente du joint, avec du TEL 1X. Remplir ensuite le réservoir supérieur de TEL 1X en s'assurant qu'il ne se loge pas de bulles d'air à l'entrée des puits et que le montage est étanche.

2.5 MIGRATION ELECTROPHORETIQUE ET RECUPERATION DU GEL

Vous procéderez maintenant à la séparation des protéines dans le gel. Les conditions de migration que vous emploierez ici ne sont pas optimales. Dans le cadre de ce laboratoire d'une durée limitée, elles ont pour but de permettre une migration la plus rapide possible, malheureusement aux dépens de la qualité de la séparation. Les conditions optimales sont: gel de tassement 35-40 mA/plaque de 1.5 mm. gel de séparation de 40-60 mA/plaque. Pour obtenir malgré tout une séparation acceptable, il faut limiter les risques de surchauffe du système en refroidissant les tampons et en les maintenant à basse température à l'aide du serpentin de réfrigération du système d'électrophorèse.

Préparer suffisamment d'avance (par exemple au début du laboratoire) 2.5 L de TEL 1X (tampon d'électrode: Tris 25 mmol/L, glycine 192 mmol/L et SDS 0.1% dans de l'eau) en combinant les quantités requises de TEL 10X (Tris 250 mmol/L, glycine 1.92 mol/L et, normalement, SDS 1%) et d'eau.

Certaines solutions de TEL 10X, mais pas toutes, ne contiennent pas de SDS (seulement le Tris 250 mmol/L et la glycine 1.92 mol/L), auquel cas il faudra amener la concentration de TEL 1X à 0.1% de SDS en ajoutant le volume requis de SDS 10%. Vérifier quel TEL 10X vous emploierez afin de reconstituer correctement le 1X.

Mettre au froid environ 500 mL de ce mélange et déposer le reste dans le réservoir inférieur de la cellule à électrophorèse. Si ce dernier n'est pas rempli aux trois quarts, ajouter de l'eau pour atteindre ce niveau. Déposer un aimant et raccorder le système de réfrigération à l'eau courante. Installer le montage sur un agitateur mécanique et laisser agiter. Ceci devrait être fait suffisamment longtemps d'avance pour que le tampon soit froid lorsque qu'on installera les plaques. Il est à remarquer qu'on peut diluer le tampon de l'anode (réservoir inférieur), mais jamais celui de la cathode (réservoir supérieur), sans affecter la qualité de la séparation.

Installer les plaques (toujours fixées sous le réservoir supérieur) dans le réservoir inférieur. Manipuler ce montage délicatement pour éviter tout mélange des échantillons avec le TEL. Amener le volume du TEL du réservoir inférieur au niveau de la base du réservoir.

voir supérieur. Mettre en place le couvercle de la cellule. Brancher les électrodes en respectant les polarités. Appliquer un courant de 75 mA/plaque de 1.5 mm jusqu'à ce que le traceur de migration (bleu de bromophénol contenu dans les échantillons) ait traversé le gel de tassement et atteint le gel de séparation. A ce moment, augmenter le courant à 90 mA/plaque. Notez que ces courants anormalement élevés risquent de faire surchauffer le gel et perturber la migration. Il est impératif que le refroidissement soit efficace. Vérifier en touchant le réservoir s'il reste froid. Enregistrer la tension, le courant et la distance approximative de migration à tous les changements de courant et à environ toutes les 30 minutes.

Lorsque la migration est complétée, transférer le montage (réservoir supérieur et les plaques) dans un bassin, enlever les cames et retirer les plaques du réservoir supérieur. Déposer les plaques à plat sur la table après avoir enlevé des étaux. Enlever les deux écarteurs en poussant dessus avec la partie pointue de la cale ("splitting wedge"). Détacher la plaque du dessus en glissant la cale entre les deux plaques dans l'espace laissé libre par un des écarteurs et en tournant délicatement. Enlever la plaque et couper un des coins en biseau pour être en mesure d'identifier l'ordre des puits. A l'aide d'une lame de rasoir, couper verticalement le gel en trois entre chaque série d'échantillons. Couper un des coins de chaque partie en biseau pour être en mesure d'identifier le contenu des puits. On peut alors éliminer le gel de tassement.

Un des trois morceaux de gel sera directement coloré (section suivante 2.6) tandis que les deux autres serviront à l'électrobuvarde (3), un pour la coloration des protéines totales (3.2 et un autre pour l'immunodétection de la con A (3.3).

2.6 COLORATION DES PROTEINES AU BLEU DE COOMASSIE

On révèle la présence de protéines dans le gel par coloration. Les conditions de coloration que vous emploierez ne sont pas optimales. Dans le cadre de ce laboratoire d'une durée limitée, elles ont pour but de permettre une détection la plus rapide possible, aux dépens de la qualité de la coloration. Les conditions optimales sont: 90 min/mm d'épaisseur de gel.

Déposer le gel (en fait un des tiers du gel initial) dans un petit bassin (préférentiellement muni d'un petit robinet latéral et d'un couvercle) contenant le colorant (au moins 20 fois le volume du gel et au moins 1.5 cm de haut) (ATTENTION TRÈS CORROSIF). Laisser colorer au moins 60 min/mm d'épaisseur du gel. Rincer ensuite très brièvement à l'eau. Préparer le décolorant en versant directement et mélangeant les composantes pures (eau, acide acétique glacial, etc.) dans un grand bassin de décoloration (préférentiellement muni d'un petit robinet latéral et d'un couvercle). Deux décolorants peuvent être utilisés: un "rapide" (acide acétique 12.5%, méthanol 40% dans de l'eau), avec surveillance constante pour éviter une surdécoloration, ou "lent" (acide acétique 12.5%, isopropanol 12.5% dans de l'eau), avec peu de surveillance. Utiliser celui qui convient le mieux à la situation (i.e. si vous avez ou non le temps ou la possibilité de suivre de près la décoloration). Laisser

décolorer en changeant de décolorant quand il est devenu un peu foncé. Quand le bruit de fond de coloration est éliminé, laisser tremper dans de l'acide acétique 10%. La décoloration est terminée lorsque les bandes de protéines apparaissent bleues sur fond incolore. Conserver au réfrigérateur le gel dans un emballage hermétique (sac de polyéthylène – type Zip-Lock™) soigneusement scellé et contenant quelques gouttes d'acide acétique 10%. Ne pas oublier d'identifier le gel avec une étiquette apposée sur le sac. En cas de décoloration excessive, on peut simplement recolorer de la même façon. Le colorant usé pourra être récupéré dans un autre contenant en le filtrant avec un papier filtre rapide de grandes dimensions. Un système de récupération sera installé sous la hotte.

2.7 PHOTOGRAPHIE

La photographie se fera avec un appareil photo numérique. Les instructions précises sur l'emploi de cet appareil vous seront données sur place. Rincer le gel avec de l'acide acétique. Déposer le gel sur une plaque de verre propre et installer sur un transilluminateur en veillant à ce que le nom de l'équipe et l'identification des puits soit visible sur la photo. Déposer une règle transparente à côté du gel de façon à pouvoir estimer la distance de migration des bandes sur la photo. Amener le gel bien identifié à l'appareil photo. Si le gel sèche un peu, les coins auront tendance à s'enrouler. L'humecter alors avec un peu d'acide acétique 10%. Après avoir fait les réglages requis (mode P, sans flash, fonction macro, JPEG haute résolution, lumière fluorescente, etc), prendre la photo.

La photo sera ensuite disponible sur la page Web du cours et vous pourrez l'imprimer. Une impression monochrome ("noir et blanc") est recommandée. Vous DEVREZ apporter cette photographie à l'examen, une question vous sera probablement posée sur vos résultats. Sur cette impression, vous pourrez noter l'identité des puits et le poids moléculaire des étalons mais aucune autre information.

2.8 SECHAGE

Vous ne sécherez que la partie du gel ayant été colorée avant le transfert. C'est la façon conventionnelle de garder les gels pour de longues périodes.

2.8.1 Séchage sur cellulose

Le séchage permet de conserver des gels dans leur état pour de longues périodes. C'est une excellente méthode de conservation. Ils peuvent être réhydratés si besoin est (pour immunodétection, photo, etc.).

Laisser le gel tremper 45 minutes dans la solution de séchage.

Rincer 3 minutes dans de l'eau.

Déposer sur cette plaque de verre un film de cellulose (d'environ 3 cm plus large et plus

longue que la plaque de verre) bien humecté avec de l'eau. Etaler la cellulose sur la plaque de verre et éliminer les bulles d'air entre la plaque et le film. Cette étape ne doit se faire que quelques minutes avant le dépôt du gel (paragraphe suivant) pour éviter que la cellulose sèche.

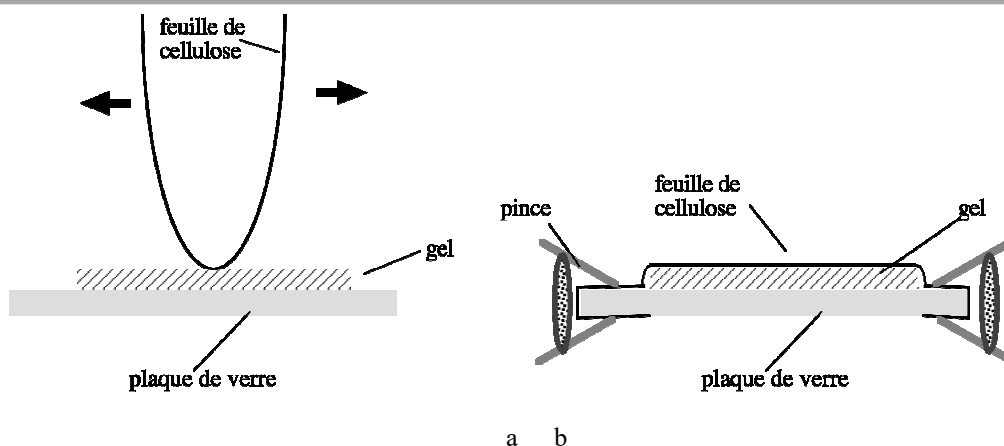


Figure 3.8.1: MONTAGE POUR LE SÉCHAGE DU GEL
a) application de la cellulose sur le gel ; b) vue en coupe du montage final.

Déposer le gel rincé à plat sur la cellulose. Éliminer les bulles d'air entre la cellulose et le gel. Humecter avec de l'eau une autre feuille de cellulose (d'environ 3 cm plus large et plus longue que la plaque de verre). Cette dernière n'aura pas été mise à tremper dans la solution de séchage. Étendre cette cellulose bien à plat sur le gel. Pour éviter la formation de bulles d'air, centrer la cellulose sur le centre du gel puis la déposer lentement vers les bords du gel (fig. 3.8.1a). Enlever les bulles d'air et déplisser la cellulose. Pour faciliter la procédure, il vous faudra probablement humecter le montage en ajoutant de l'eau entre la cellulose et le gel. Étirer le plus possible et replier les films de cellulose sous la plaque de verre et attacher en place avec des pinces métalliques, 3 ou 4 de chaque côté (fig. 3.8.1b). Les films de cellulose doivent être en contact avec toute la surface du gel et exempte de bulles d'air. Laisser sécher à température de la pièce à l'abri de la lumière directe après avoir pris soin de bien identifier le montage.

2.8.2 Récupération du gel séché

Après le séchage, récupérer le gel séché entre les deux feuilles de cellulose. Le gel séché devrait adhérer parfaitement à la cellulose. Garder sous un poids (plaque de verre ou autre) pour éviter que le gel ne s'enroule.

SOLUTIONS DISPONIBLES (DEJA PREPAREES)

acrylamide 40 g%: dans eau (4°C), laisser revenir à température de la pièce avant emploi
bis 2 g%: dans eau (4°C), laisser revenir à température de la pièce avant emploi

Tris-Cl (pH 8.8): Tris 1.5 mol/L, HCl ad pH 8.8, dans eau (4°C), laisser revenir à température de la pièce avant emploi

SDS 10%: dans eau (toujours à température de la pièce)

TEMED: N,N,N',N'-Tétraméthyléthylidiamine pur (4°C)

Tris-Cl (pH 6.8): Tris 0.5 mol/L, HCl ad pH 6.8, dans eau (4°C), laisser revenir à température de la pièce avant emploi

Isobutanol (saturé d'eau) (sous la hotte)

Concanavaline A commerciale 1 mg/mL: ds PBS (4°C)

TEC (tampon d'échantillon) 2X: glycérol 20%, SDS 4%, Tris-Cl (pH 6.8) 125 mmol/L, β -mercaptoéthanol 10%. bleu de bromophénol 0.2% (4°C)

TEL 10X (tampon d'électrode): Tris 250 mmol/L, glycine 1.92 mol/L. SDS 1% (température de la pièce ; remarque : vérifier si la préparation fournie contient bien du SDS)

colorant: bleu de Coomassie (brilliant blue R) 0.15%, acide trichloroacétique 10%, acide acétique 10%, méthanol 40% dans de l'eau. (ATTENTION CORROSIF) (sous la hotte)

étalons de poids moléculaire: mélange commercial (Pharmacia Biotech ou Amersham ou Sigma): α -lactalbumine (14.4 kDa), inhibiteur de trypsine (20.1 kDa). anhydrase carbonique (30 kDa), ovalbumine (43 kDa), albumine sérique de boeuf (67 kDa) et phosphorylase b (94 kDa) ; reconstitué selon les instruction du manufacturier (4°C)

solution de séchage : méthanol 45%, acide acétique 10%, glycérol 10% dans de l'eau.

PRODUITS DISPONIBLES (SOUS FORME SOLIDE OU LIQUIDE)

TEMED

Persulfate de sodium

3 ELECTROBUVARDAGE ET IMMUNODETECTION

Dans cette expérience, vous transférerez les protéines du gel d'acrylamide de l'expérience précédente pour confirmer de façon absolue la présence de concanavine A. Le buvardage électrophorétique (aussi appelé électrobuvardage, « transfert western ») permet de transférer les protéines de l'intérieur du gel à la surface d'une matrice solide, ici de la nitrocellulose. Les protéines peuvent être alors facilement exposées à diverses substances et entrer en contact direct avec elles. Une des technique couramment employées est l'identification et la détection immunologiques. Dans ce cas, on expose les protéines à un anticorps capable de reconnaître spécifiquement une protéine. Cet anticorps primaire, ici un anti-con A, est une IgG levé, par exemple, chez un lapin. Cet anti-con A peut être alors lui-même reconnu par un autre anticorps secondaire capable de reconnaître les IgG de lapin. Cet anticorps secondaire peut être conjugué avec un indicateur ou un traceur comme l'enzyme phosphatase alcaline. L'enzyme peut être facilement localisée en la mettant en présence d'un substrat incolore et soluble de l'enzyme qui sera transformé en un produit coloré et insoluble. Un précipité se formera où est localisée la phosphatase, c'est-à-dire où est l'anticorps secondaire, lui-même fixé sur l'anticorps primaire, donc ultimement où est l'antigène. On aura ainsi détecté et localisé la bande de concanavine A.

Consulter le SIITUB pour des explications complètes sur cette technique.

Plus précisément, vous ferez une électro-élution en vous servant des deux parties non colorées (sur les trois au total) du gel obtenu dans l'expérience précédente (2.5). Chaque partie (chacune un tiers du gel) représente des séries identiques d'échantillons. Après le transfert, une de ces parties sera colorée pour révéler les protéines totales (3.3), afin de vérifier l'efficacité du transfert, et l'autre sera immunodétectée avec de l'anti-con A (3.4 et suivantes) pour mettre en évidence la con A. Normalement les morceaux de gel ayant subi l'immunodétection sont colorés tel que décrit dans l'expérience précédente (2.6) pour vérifier s'il reste du matériel non transféré, mais vous ne procéderez pas à cette étape dans ce laboratoire. Vous utiliserez l'appareil de transfert semi-sec.

3.1 PREPARATION DE LA MEMBRANE ET DU GEL D'ACRYLAMIDE

Cette opération vise à saturer la matrice et le gel avec le tampon employé pour le transfert électrophorétique. Vous utiliserez comme matrice d'adsorption de la nitrocellulose (NC). Une autre option aurait été le difluorure de polyvinylène (PVDF). Ces deux matrices se ressemblent et se manipulent de façon assez semblable, mais il y a des différences mineures de manipulation. L'avantage du PVDF est qu'il se manipule mieux (plus résistant aux déchirures) et qu'il peut adsorber plus de protéines. Son désavantage est son hydrophobicité qui oblige à des procédures de réhydratation. Comme vous mettez des quantités relativement grandes de protéines, la nitrocellulose est amplement adéquate dans ce laboratoire-ci et vous n'avez pas besoin de la sensibilité accrue apportée par le PVDF qui peut même être nuisible dans l'immunodétection car elle oblige souvent à des manipulations très courtes et précisément chronométrées.

Préparer suffisamment d'avance 1 L de TGM (Tris 25 mmol/L, glycine 192 mmol/L, méthanol 20%) en combinant, dans l'ordre, du TG 10X, de l'eau, bien mélanger, et du méthanol. Mettre à refroidir.

⇒ Q 3.1 Quel est le rôle du méthanol dans cette procédure ?

Découper une feuille de la membrane de nitrocellulose (NC) en deux morceaux de dimensions très légèrement supérieures à chaque partie du gel à transférer (e.g. + 1 mm chaque coté) en faisant attention de ne pas y toucher avec les doigts (porter des gants et,

autant que possible, manipuler avec des pincettes).

Faire flotter la membrane à la surface d'un récipient rempli d'eau pour les humecter complètement. Lors de cette hydratation, ne jamais enfoncer volontairement la membrane dans l'eau, ce qui empêcherait l'évacuation de toutes les micropoches d'air emprisonnées dans la membrane de NC et nuirait à l'adsorption des protéines. Il est cependant probable qu'elle s'immerge complètement d'elle-même, ce qui est fréquent et normal. Lorsqu'elles sont complètement humectées, laisser tremper dans du TGM.

Équilibrer les deux parties du gel initial destinées au transfert au moins 30 min dans du TGM froid avec une légère agitation. Préparer aussi deux papiers buvard épais, de dimensions un peu supérieures à celles des morceaux de membranes (+ 1-2 mm). Les laisser tremper quelques minutes dans du TGM pour les saturer complètement.

3.2 ELECTROBUVARDAGE ELECTROPHORETIQUE DANS UN DISPOSITIF SEMI-SEC

Cette étape permet de transférer les protéines contenues à l'intérieur du gel à la surface de la membrane. Ces matériaux ont des sites ayant une affinité non spécifique pour les protéines où, sortant du gel sous l'impulsion du champ électrique, elles peuvent s'adsorber. Vous emploierez ici un système appelé « semi-sec » qui permet de minimiser les solutions requises, la surchauffe et le temps de transfert.

Ouvrir la cellule de buvardage semi-sec en dévissant le couvercle (plaque supérieure). Déposer une feuille de papier buvard épais saturé de TGM sur l'électrode (cathode) de platine-titane dans la base de la cellule. Déposer les parties du gel destinées au transfert, pré-équilibrées dans du TGM, bien à plat sur ce papier-buvard. Enlever les bulles d'air entre le gel et le filtre en roulant une tige de verre ou une pipette sur le gel, à partir du centre vers chacun des bords. Recouvrir ensuite le morceau de gel avec une feuille de la membrane imbibée de TGM tout en évitant la formation de bulles d'air entre ces deux couches. Une façon (relativement) simple de procéder est de prendre la membrane par ses deux rebords les plus étroits et de l'appliquer à partir du centre et de la déposer progressivement jusqu'aux extrémités. La membrane devra avoir été découpée pour éviter tout contact direct avec le buvard inférieur, mais que tout le gel soit couvert par cette membrane. Éliminer les bulles d'air et assurer une adhésion complète en roulant une petite pipette Pasteur sur la membrane. Déposer ensuite un autre papier buvard épais (saturés de TGM) et éliminer toute bulle. Si ces manipulations prennent trop de temps et qu'un filtre, le gel ou la membrane sèche un peu, réhumecter avec quelques gouttes de TGM. La taille des buvards doit minimiser autant que possible le contact entre eux.

=> Pourquoi faut-il éviter tout contact entre le buvard et la membrane et minimiser le contact entre les deux buvards?

Déposer le couvercle, sous lequel est fixée l'électrode de graphite, et le visser en place. Les trois écrous doivent être vissés de façon à fournir une pression identique

suffisamment forte mais sans briser les filets des vis de plastique. Raccorder les électrodes au bloc d'alimentation. Ajuster le courant à 1 mA/cm^2 de surface totale de gel. Après 60 minutes de transfert, débrancher la cellule et récupérer les morceaux de membrane.

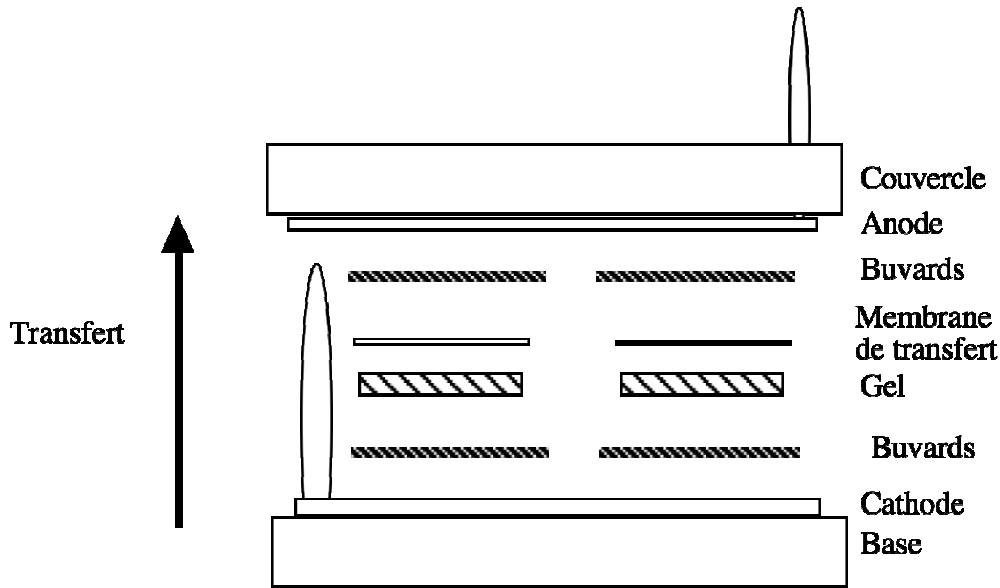


Figure 4.2 Schéma du montage d'une cellule de transfert semi-sec pour transférer deux gels

N'oubliez pas de rincer abondamment à l'eau du robinet puis à l'eau distillée la cellule à électro-élution, particulièrement les électrodes (jamais de savon, d'alcool ou d'abrasif ni de brosse métallique). Laisser sécher à l'air libre.

Après le transfert, replier aussi un coin de la membrane pour identifier le côté où sont adsorbées les protéines. Rincer à l'eau distillée la membrane destinée à la coloration des protéines totales et la mettre à sécher sur un papier-filtre (Whatman™ ou autre) 15 minutes. Ranger cette membrane au réfrigérateur après l'avoir mise en sandwich entre deux papiers-filtres secs et déposer dans sac de polyéthylène (type Zip-Lock™). Elle sera employée ensuite pour la coloration des protéines totales (section suivante, 3.3).

Rincer à l'eau la membrane destinée à l'immunodétection. La mettre tremper 5 min dans du TBS à température de la pièce. La laisser égoutter et sécher sur un papier filtre (Whatman™ ou autre) 5 à 10 min. Ranger cette membrane au réfrigérateur après l'avoir mise en sandwich entre deux papiers-filtres secs et déposée dans un sac de polyéthylène (type Zip-Lock™). Elle sera employée pour l'immunodétection (3.4 et suivantes). Bien identifier ces sections pour ne pas la confondre celles des autres équipes.

3.3 COLORATION DES PROTEINES TOTALES TRANSFEREES SUR LA MEMBRANE

Normalement, on procède immédiatement après le transfert à la coloration des protéines totales. Les contraintes de temps nous obligent toutefois à ranger les membranes pour faire cette manipulation la semaine suivante. Cette coloration permet de colorer toutes les protéines qui se sont adsorbées sur la membrane de transfert (nitrocellulose), puisque le noir amido se fixe non spécifiquement sur toutes les protéines. Cela permet de vérifier si les protéines du gel d'acrylamide se sont bel et bien adsorbées à la surface de la matrice. Cette opération doit être faite seulement sur la section de la membrane destinée à la coloration des protéines totales (3.2.2), jamais sur celle destinée à l'immunodétection. Plusieurs colorants peuvent être employés mais l'amido-black est le plus approprié ici : simple, bonne coloration, bon contraste pour la photo, pas de décoloration avec le temps...

⇒ Quels sont les avantages et inconvénients des différents types de colorant pour protéines dans un transfert western ?

Récupérer la section de membrane destinée à la coloration des protéines totales, si elle a collé aux filtres, vous n'avez qu'à la mouiller légèrement pour les détacher sans risquer de la déchirer. La rincer très brièvement à l'eau distillée. Laisser tremper durant 15 min la membrane directement dans le colorant). Enlever l'excès de colorant en rinçant avec de l'eau, puis laisser tremper dans de l'eau quelques heures jusqu'à ce que la décoloration soit complète (protéines en bleu plus ou moins foncé sur fond bleu très pâle). Remplacer l'eau quelques fois pour accélérer la décoloration. Laisser dans l'eau jusqu'à environ 10 minutes avant la photo. A ce moment, laisser sécher. Après la photo, garder la membrane entre deux papiers filtres dans un petit sac de polyéthylène (type ZipLoc™) bien identifié au réfrigérateur. Cette préparation permet de visualiser toutes les protéines transférées sur la membrane. Le colorant usé pourra être récupéré dans un autre contenant en le filtrant avec un papier filtre rapide de grandes dimensions.

3.4 IMMUNOADSORPTIONS PRIMAIRE ET SECONDAIRE

Normalement, on procède immédiatement après le transfert aux immunoadsorption. Les contraintes de temps nous obligent toutefois à ranger les membranes pour faire ces analyses la semaine suivante. Les immunoadsorption doivent être précédées par une étape blocage destinée à saturer les sites inoccupés de la membrane. En effet, puisque les anticorps, qui sont des protéines, pourraient se lier directement sur ces sites et donner une coloration en bruit de fond ou non spécifique, il convient de les bloquer avec des protéines qui ne seront pas reconnues par les anticorps employés ici (anti-con A et anti-IgG de lapin). Les protéines du lait constituent de bons agents bloquant, peu coûteux, il n'y a pas de con A, d'IgG ou de phosphatase alcaline endogènes. Ensuite vous procéderez à l'adsorption de l'anti-con A sur la con A, de l'anti-IgG de lapin sur l'anti-con A (qui a été levée chez le lapin et qui reconnaît tout IgA de lapin). La phosphatase alcaline, conjuguée à l'anti-IgG, pourra être mise en évidence en présence d'un produit soluble et incolore qui précipitera sous forme colorée lorsqu'il aura été hydrolysé par l'enzyme. Le Tween 20 à faible concentration (0.05 à 0.25%) sert à empêcher l'adsorption non spécifique des anticorps sur des protéines ou à prévenir leur attachement direct sur la membrane (bruit de fond) sans détacher les protéines déjà adsorbées.

Cette opération, et la suivante (3.5), doivent être faites seulement sur la section de membrane destinée à l'immunodétection, jamais sur celle destinée à la coloration des protéines totales. Toutes ces procédures doivent se faire dans un contenant rigoureusement propre et utilisé seulement à cette fin. Ne jamais mettre

de colorant ou de méthanol dans ce contenant

Dans toutes ces manipulations, garder vers le haut la face de la feuille de nitrocellulose sur laquelle sont adsorbées les protéines. Toujours employer un petit bassin rigoureusement propre et réservé à l'immunoabsorption. Réhydrater la membrane de NC en la laissant tremper 3 min dans 125 mL de TBS. Décarter le TBS et remplacer par environ 125 mL de TBS-TL frais et laisser baigner 45 min. Rincer brièvement avec du TBS-T. Transférer alors la membrane dans 125 mL d'anti-con A (antisérum) dilué dans du TBS-T (préalablement ramené à température de la pièce, pas trop longtemps cependant pour éviter la dénaturation de l'anticorps). Incuber 90 min avec agitation légère à température de la pièce. Veiller à ce que la membrane soit toujours recouverte de cette solution. Rincer ensuite l'excès d'anticorps primaire non fixé sur la con A en laissant tremper 3 min avec agitation occasionnelle trois fois dans environ 125 mL de TBS-T.

Incuber alors dans 125 mL d'anti-immunoglobuline de lapin conjuguée à la phosphatase alcaline ("anti-lapin") dilué dans du TBS-T (fraîchement ramené à température de la pièce) durant 60 min avec agitation légère à température de la pièce. Rincer la membrane trois fois avec environ 125 mL de TBS-T, durant 3 min avec agitation occasionnelle, pour enlever l'excès d'anticorps secondaire non fixé sur l'anticorps primaire.

⇒ Pourquoi évite-on les solutions tamponnées avec du phosphate (ex. : PBS) pour ces manipulations et les suivantes ?

3.5 DETECTION ENZYMATIQUE

Rincer en laissant tremper la membrane avec agitation légère trois fois dans 100 mL de TBS-9.6, 3-5 min chacune, pour ramener le pH à 9.6 et enlever toute trace de Tween. Préparer, à partir des solutions concentrées, quelques minutes avant usage, le tampon d'incubation pour la détection enzymatique (NBT 100 µg/mL, BCIP 50 µg/mL, MgCl₂ 4 mmol/L dans du TBS-9.60 ; mettre les composantes en commençant par le TBS-9.6 puis les autres (NBT, BCIP et Mg,) dans cet ordre Mélanger bien pour que la solution soit vraiment homogène et, si nécessaire, la ranger en évitant de trop exposer ce tampon d'incubation à la lumière. Mettre 125 mL de ce mélange sur la membrane préalablement déposée à plat dans le récipient. Incuber à température de la pièce sans agitation durant 15-45 min, jusqu'à ce que la coloration rose-violette apparaisse sur la bande présumée de con A. La coloration peut apparaître soudainement, donc surveiller particulièrement attentivement particulièrement dans les premières 5 min. Quand la bande présumée de con A est apparue, sortir la membrane du colorant et la réaction en rinçant avec de l'eau; prendre note des résultats. Cette préparation permet de localiser spécifiquement la con A sur la membrane. Laisser sécher la membrane, environ 15 minutes et la conserver pour photographie.

=> A quels signes identifieriez-vous la bande « présumée » de con A ?

3.6 PHOTOGRAPHIE

Disposer la membrane (la coloration des protéines totales et la détection de la con A) côte à côte avec des inscriptions pour identifier les puits et l'équipe. Déposer une règle à côté des membranes de façon à pouvoir estimer la distance approximative de migration des bandes. Prendre la photo avec une caméra numérique montée sur trépied. Ne pas oublier d'identifier chaque membrane, prendre en note leur disposition afin de pouvoir toujours être en mesure de savoir le contenu de chaque puits et disposer une règle pour pouvoir évaluer les distances de migration. (réglage de la caméra : mode auto, macro, sans flash, focus auto, « white balance » : fluorescent).

Photographier les deux types de colorations. Vous recevrez les photographies via la page Web du cours.

Vous DEVREZ apporter ces photographies imprimées à l'examen, une question vous sera probablement posée sur vos résultats.

SOLUTIONS DISPONIBLES

TG 10 X: Tris 250 mmol/L, glycine 1.92 mol/L

Méthanol

Colorant amido : Amido Black 0.1% , isopropanol 25%, acide acétique 10% dans eau

TBS: NaCl 150 mmol/L, Tris 20 mmol/L, HCl ad pH 7.4.

TBS-T: Tween 20 0.2% dans TBS (4°C, ramener à température de la pièce peu avant usage)

TBS-TL: lait en poudre (Carnation™ non fat dry milk) 2%, Tween 0.1% dans TBS (4°C, ramener à température de la pièce peu avant usage)

Antisérum: anti-con A dilué 1/75000 dans TBS-T (4°C, ramener à température de la pièce peu avant usage)

anti-lapin: anti-immunoglobuline de lapin conjuguée à la phosphatase alcaline (A(IgG)-PA) 1 mL dilué dans 7.5 L de TBS-T (4°C, ramener à température de la pièce peu avant usage)

TBS-9.6: NaCl 150 mmol/L, Tris 20 mmol/L, HCl ad pH 9.6.

NBT: « nitrobleu tetrazolium » 1 mg/mL dans TBS-9.6

BCIP: 5-bromo-4-chloroindoxyl phosphate (sel de Na) 5 mg/mL dans TBS-9.6

MgCl₂ 1 mol/L: dans H₂O.

4 AUTORADIOGRAPHIE

Le but de cette expérience est de vous initier aux techniques de base de l'autoradiographie. N'hésitez pas à consulter le SIITUB pour des explications complètes sur cette technique.

Il s'agira simplement de procéder avec un gel d'acrylamide dans lequel on aura fait migrer de la con A conjuguée à de l'iode-125. Ce gel aura été préparé pour vous et chaque puits (un par équipe) contiendra environ 0.5 μ Ci de concanavaline A marquée (soit 10 mL de con A 30-40 mCi/mg).

Comme vous travaillerez avec un radio-isotope, lisez très attentivement les directives sur les mesures de sécurité pour le travail avec la radioactivité et, en particulier, l'iode-125, dans le "Guide des laboratoires de biochimie". Ces mesures devront être strictement observées, y compris l'installation d'un poste de travail dans la chambre noire.

Les films que vous utiliserez (les mêmes que pour les radiographies) sont très sensibles à la lumière. Ils en sont donc protégés par plusieurs niveaux d'emballage. De plus les manipulations du film doivent se faire dans une chambre noire: lumières éteintes et porte fermée à partir du moment où on sort le film de sa boîte ou de la cassette.

4.1 EXPOSITION DU GEL

Le montage suivant est utilisé pour l'autoradiographie: une couche de pellicule de plastique ("Saran Wrap"), le gel, une autre couche de pellicule de plastique, puis le film, le tout dans une cassette métallique (figure 5.1). La disposition de la première partie de ce montage (pellicule-gel-pellicule dans la cassette) se fait dans le laboratoire même. Il faudra s'assurer qu'il y ait un contact parfait entre la surface entière du gel (à travers la pellicule de plastique) et celle du film. Il faut donc éliminer les bulles d'air entre le film et chaque couche de pellicule de plastique et les plis dans celle séparant le film et le gel. On referme ensuite la cassette et on se rend dans la chambre noire où il ne restera plus qu'à mettre le film en place. Il faudra faire très attention pour ne pas que de la radioactivité (i.e. la con A contenue dans le gel) ne contamine le feutre de la cassette.

Une fois dans la chambre noire, disposer la boîte de films près du lieu de travail, rouvrir la cassette et rajuster le montage si nécessaire. Se familiariser avec la disposition du matériel et fermer alors la lumière et s'assurer que personne n'ouvrira la porte de la chambre noire. Sortir la boîte de films de son sac puis ouvrir cette dernière. À l'intérieur de la boîte, les films sont eux-mêmes dans une enveloppe opaque. Normalement, l'ouverture de cette enveloppe est dans le fond de la boîte. Il faut donc sortir complètement l'enveloppe de la boîte pour prendre un film. Comme chaque film est probablement disposé entre deux feuilles de papier, s'assurer que c'est bien un film (et non le papier!) qu'on prend de la boîte. Refermer IMMÉDIATEMENT l'enveloppe, la remettre dans la boîte (l'ouverture de l'enveloppe vers le fond de la boîte) et remettre celle-ci dans son sac de plastique. Installer le film dans la cassette et s'assurer qu'il y ait un contact parfait entre la surface entière du gel (à travers la pellicule de plastique). Refermer et verrouiller ensuite le couvercle de la cassette. Emballer la cassette dans un sac de plastique opaque et

déposer dans un congélateur à -70°C .

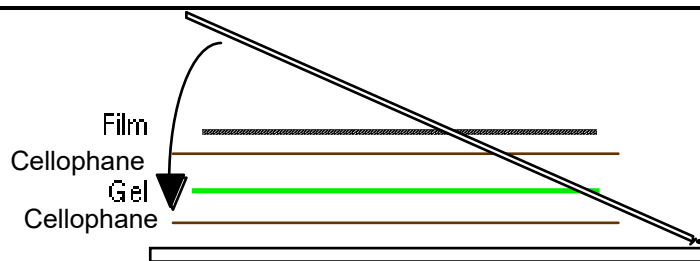


Figure 5.1.1: MONTAGE DE L'AUTORADIOGRAPHIE

4.2 DEVELOPPEMENT DU FILM

Après le temps requis, ramener le montage à la chambre noire (porter des gants pour éviter de se geler les mains!). Remplir un bain de solution de développeur froid et un autre de fixatif. En préparer également un autre pour les rinçages à l'eau courante froide. À ce moment fermer la lumière et s'assurer que personne n'ouvrira la porte de la chambre noire. Récupérer le film, refermer la cassette et baigner le film 5 min dans le développeur. Transférer dans un bain d'eau courante froide et rincer 2 min en s'assurant que le film reste dans le bain et ne soit pas touché directement par le jet d'eau. Mettre ensuite dans le bain de fixatif durant 2 min puis rincer de nouveau. On peut alors rouvrir la lumière. Ramener le matériel au laboratoire.

SOLUTIONS DISPONIBLES

développeur: préparé selon les indications du fabricant (refroidir environ une heure avant usage)

fixateur: préparé selon les indications du fabricant (refroidir environ une heure avant usage)

5 DOSAGE PAR IMMUNOADSORPTION ENZYMO-COUPLÉE (ELISA)

L'elisa est une méthode immunologique de dosage quantitatif. Il existe plusieurs approches différant entre elles par l'ordre d'addition des réactifs. Ici vous utiliserez une méthode directe. Dans un premier temps, on adsorbe les protéines d'un échantillon sur les parois d'un puits d'une plaquette. Cette adsorption est due à des forces électrostatiques et hydrophobes plus ou moins bien définies entre les protéines et le plastique des puits. Différents plastiques ont des propriétés différentes d'adsorption face à une protéine donnée. Par exemple, différents types de protéines (peu ou très glycosylées, contenant tel ou tel acide aminé, etc.) ont des affinités différentes pour un type donné de plastique. Ensuite on expose ces puits à un anticorps capable de se lier spécifiquement à une des protéines adsorbées. Après avoir éliminé les anticorps primaires n'ayant pas lié l'antigène, on expose cette préparation à un anti-IgG de l'espèce animale chez laquelle on a levé l'anticorps primaire, souvent il s'agit du lapin. Cet « anti-lapin » étant conjugué à une enzyme comme la phosphatase alcaline, on peut facilement quantifier cette dernière. Cette mesure est donc proportionnelle, au bout du compte, à la quantité de l'antigène initialement présent dans l'échantillon. Pour éviter que les anticorps primaires ou secondaires ne se fixent directement sur les sites inoccupés du puits, on utilise un agent bloquant, qui empêche l'adsorption non spécifique. Le Tween-20 faiblement concentré est souvent employé à cette fin ; c'est un détergent doux capable d'empêcher l'adhésion non spécifique des anticorps sur le plastique de la plaquette sans affecter les interactions spécifiques antigène-anticorps.

Consultez le SIITUB pour des explications complètes sur cette technique.

Le but de cette expérience est de quantifier la concanavaleine A des diverses étapes (fractions SB et DL) de la purification que vous avez faite dans les premières expériences de ce projet ainsi que la con A que vous avez obtenue. Pour ceci vous ferez une courbe d'étalonnage avec de la con A étalon. Avec cette courbe vous pourrez déterminer la quantité de con A que contiennent vos "inconnus" (SB, DL, con A que vous avez obtenue). Durant toutes les étapes, vous devrez faire attention de ne pas égratigner ou salir avec les doigts la base des puits des plaquettes. En effet le faisceau lumineux du colorimètre passera à travers le fond de la plaque.

Cette année les équipes testeront diverses concentrations d'étalons:

Equipe 1 et a: 100, 50, 25, 12.5, 6.25 et 0 µg/mL incubation de 20 min
 Equipe 2 et b : 10, 5, .2.5, 1.25, 0.625, 0.313 et 0 µg/mL incubation de 30 min
 Equipe 3 et c : 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.313 et 0 µg/mL incubation de 30 min
 Equipe 4 et d: 10, 5, .2.5, 1.25, 0.625, 0.313 et 0 µg/mL incubation de 20 min
 Equipe 5 et e: 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.313 et 0 µg/mL incubation de 20 min
 Equipe 6 et f: 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.313 et 0 µg/mL incubation de 15 min

5.1 PREPARATION DES ECHANTILLONS ET DES ETALONS

Préparer dans des microtubes 700 µL des concentrations de con A étalon (commerciale) de dans du TBS par la méthode des dilutions doublantes, à les concentrations voulues pour chaque équipe. Vous aurez à votre disposition une solution concentrée de 1 mg/mL Ceci servira à faire une courbe d'étalonnage de la concanavaleine A.

Préparer également, à partir d'une aliquote obtenue dans la première partie du cours (1.6), des solutions de 2.5 et 10 µg/mL de la con A que vous avez purifiée en diluant la solution congelée (voir 1.6) dans du TBS. Enfin, faire aussi que des dilutions 1/500 et 1/2500 de chacune des deux autres fractions recueillies durant les premières expériences de ce laboratoire (SB, DL). Pour ces 6 dilutions, faites les dilutions à partir de volumes d'au

moins 25 μL pour éviter les imprécisions dues au pipetage de trop petits volumes. Préparer aussi des solutions de 100 et 50 $\mu\text{g/mL}$ d'albumine de sérum de bœuf (BSA) dans du TBS qui serviront de contrôle négatif (C-).

Ces derniers seront les six inconnus dans lesquels vous voulez déterminer la quantité réelle de con A qu'ils contiennent à partir de la courbe d'étalonnage constituée des 5 dilutions de con A commerciale. Le BSA servira de contrôle négatif, car aucun anticorps ne devrait se lier dessus.

=> A ce stage, quelles protéines sont liées directement sur les parois des puits de la plaquette ?

Prendre en note la position de chaque étalon, échantillon et contrôle. Les puits de la plaquette sont identifiables aisément par leur numérotation alphanumérique : rangées en lettres (A à H) et colonnes en chiffre (1 à 12). Chaque puits a donc une identification unique, par exemple Cx05, Fx12, etc.

Durant toutes les étapes vous devrez faire attention de ne pas égratigner ou salir avec les doigts la base des puits des plaquettes

5.2 ADSORPTION DE L'ANTIGENE

Il faut tout d'abord laisser adsorber la con A sur les parois de la plaquette. Comme l'affinité des parois des puits pour la protéine n'est pas homogène dans les plaquettes de qualité ordinaire, particulièrement dans les puits périphériques, il est préférable de distribuer au hasard les différents triplicatas et de ne pas employer les puits périphériques. Normalement cette adsorption ne dure que quelques heures; dans ce cours toutefois, la plaquette ne sera dosée que quelques semaines après le dépôt. Durant toutes ces manipulations. Il faudra tenir la plaquette par les cotés pour éviter de toucher la base des puits.

Déposer 3 aliquotes de 100 μL de chaque échantillon (inconnus, contrôles et étalons) dans trois puits d'une plaquette à fond plat de polystyrène (Costar 3369). Ne pas utiliser les puits périphériques. N'oubliez évidemment pas de noter où est localisé chacun. Juste avant de ranger la plaquette au frigo, mettre 100 μL d'eau dans les puits périphériques inutilisés pour maintenir l'humidité dans la plaquette. Sceller le couvercle avec du "Parafilm" et laisser la con A s'adsorber sur les parois du puits au moins 24 h à 4°C.

⇒ Q5.1 Pourquoi faut-il éviter de toucher ou égratigner la base des puits ?

5.3 IMMUNOADSORPTIONS ET DOSAGE

Ensuite il faut exposer les antigènes à l'anticorps primaire, ici l'anti-con A, puis à l'anticorps secondaire (anti-lapin) conjugué à une enzyme, ici la phosphatase alcaline. On peut alors mesurer l'activité de cette enzyme qui sera proportionnelle à la quantité de con A ayant adhéré aux parois du puits. Les lavages ont pour but d'éliminer les réactifs en excès qui n'ont pas interagi entre eux. On mesure l'activité de l'enzyme en mesurant la quantité de produit qu'elle forme après avoir été mise en présence d'un substrat artificiel, le *p*-nitrophénylphosphate (PNP) Le PNP, n'est pas coloré, mais devient beaucoup plus foncé (jaune avec un pic autour de 405 nm) après avoir été déphosphorylé en *p*-nitrophénol par la phosphatase, particulièrement en milieu basique où l'enzyme est inactive. Vous mettez également en place des contrôles de l'anticorps primaire (Cp) et de l'anticorps secondaire (Cs)

Durant toutes les étapes, vous aurez fait attention de ne pas égratigner ou salir avec les doigts la base des puits des plaquettes

Installer et mettre en marche la laveuse de plaquettes (base, réservoir à solvant, pompe collecteur, tubulures, etc.) et démarrer la pompe ou le système de succion. Des instructions plus précises vous seront données au laboratoire. Placer la plaquette dans la base de la laveuse. S'assurer que les boyaux du montage ont été rincés avec du TBS-T en activant le passage de ce dernier dans une plaquette inutilisée. Vider les puits en poussant les tiges du collecteur dans le fond des puits. Rincer les puits à au moins trois reprises avec du TBS-T en les remplissant (en abaissant le levier du collecteur) puis en les vidant (en poussant le collecteur dans le fond des puits après avoir relâché le levier). Remplir une autre fois les puits avec du TBS-T et laisser reposer au moins 5 minutes. Rincer les puits 3 fois avec la laveuse comme précédemment et laisser les puits vides.

Déposer dans chaque puits 100 μL d'anti-con A (antisérum) diluée dans du TBS-T avec la micropipette multicanaux (8 canaux). Comme contrôles mettre 100 μL d'anti-con A (antisérum) diluée dans du TBS-T dans trois puits n'ayant contenue que du TBS-T (contrôles de l'anticorps primaire - Cp). Laisser l'anticorps primaire s'adsorber sur la con A au moins 2 h à température de la pièce. Laver la plaquette et rincer l'excès d'anticorps primaire avec la laveuse au moins trois fois avec du TBS-T et laisser les puits vides.

Ajouter 100 μL d'anti-IgG(lapin)-phosphatase alcaline (dilué dans du TBS-T) avec la micropipette multicanaux. Comme contrôles, mettre 100 μL d'anti-IgG(lapin)-phosphatase alcaline (dilué dans du TBS-T) dans trois autres puits n'ayant contenu que de l'eau ou du TBS-T. se seront lwa contrôles de l'anticorps secondaire (Cs) Laisser l'anticorps secondaire s'adsorber sur l'anticorps primaire durant au moins 2 h à température de la pièce.

=> Que permettent de vérifier les contrôles C-, Cp et Cs?

Changer le réservoir à solvant de la laveuse pour celui qui contient du TI. S'assurer que les boyaux du montage ont été rincés avec du TI en activant le passage de ce dernier dans une plaquette inutilisée. Laver la plaquette et rincer l'excès d'anticorps secondaire avec la laveuse au moins trois fois avec du TI. Remplir une autre fois les puits avec du TI et laisser reposer au moins 5 minutes. Rincer les puits 3 fois avec la laveuse comme précédemment et laisser les puits vides.

Pour le dosage de la phosphatase alcaline adsorbée sur les puits de la plaquette, mettre dans les puits 150 μL de PNP. Incuber le temps voulu (selon les équipes) à température de la pièce. Ajouter 50 μL de NaOH 2 M, ce qui arrête la réaction enzymatique et intensifie la couleur jaune. Lire l'absorption à 405 nm avec le colorimètre à plaquettes (colorimètre adapté pour mesurer l'absorption d'un liquide contenu dans des puits de la plaquette) mis en marche depuis au moins 20 min. Ce lecteur automatisé requiert

simplement de mettre la plaquette sur le plateau (puits A1 en haut à gauche) et de mettre en marche. Ne pas oublier que le rayon lumineux passe dans le puits de bas en haut, le rayonnement partant sous le puits et le photodétecteur étant au-dessus. Les résultats s'imprimeront, chaque personne pourra garder des photocopies de cette feuille pour faire la courbe d'étalonnage et déterminer les concentrations des inconnus et vérifier l'efficacité du dosage en analysant les contrôles.

La réaction enzymatique devra durer exactement le temps voulu. Pour cela il faudra décaler le début de la réaction (i.e. addition du PNP) dans chaque puits, selon le rythme que vous estimez capable de maintenir, pour permettre le transfert dans le NaOH après précisément le temps voulu. Il faudra donc se faire un tableau-horaire pour cette partie de l'expérience en décalant le remplissage de chaque rangée selon le rythme (5 à 30 sec) que vous pourrez soutenir.

Tableau 7.1: Exemple de décalage aux 15 secondes pour une équipe devant faire une incubation de 45 minutes

puits #	début (+PP) (min:sec)	arrêt (+ NaOH) (min:sec)
Rangée A	0:00	45:00
Rangée B	0:15	45:15
Rangée C	0:30	45:30
etc		

Lire l'absorption à 405 nm avec le colorimètre à plaquette selon les instructions qui vous seront données sur place. Au moment de lire, essuyer le fond de la plaquette et déposer en place. Activer le colorimètre et récupérer la feuille de données sur l'imprimante. Transcrire ces données dans votre cahier et calculer les moyennes (avec écarts-types) de chacun des étalons et des inconnus.

SOLUTIONS DISPONIBLES

Concanavaline A (étalon) 1.0 mg/mL: dans PBS

BSA 1.0 mg/mL : dans TBS (Albumine de sérum de bœuf) *

TBS: Tris 0.24 %, HCl ad pH 7.4, NaCl 0.8 %, KCl 0.02 %

TBS-T: Tween 20 0.2% dans TBS *

TI: glycine 100 mmol/L, MgCl₂ 1 mmol/L, ZnCl₂ 1 mmol/L, pH 10.4

PNP: *p*-nitrophénylphosphate 2.5 mg/mL dans TI *

NaOH 2 M dans eau

*Anti-con A : dilution 1 dans 75000 de TBS-Tween 0.05%

Anti-lapin : dilution 1 dans 7500 de TBS-Tween 0.05% *

6 MICRODOSAGE DES PROTÉINES

Vous utiliserez ici une modification de la méthode de coloration au Bleu de Coomassie (« méthode de Bradford ») avec un réactif prémélangé fourni par un manufacturier. Tel que décrit dans le SIITUB, c'est une méthode simple, sensible et rapide qui se prête bien aux besoins de ce laboratoire. Les inconvénients et problèmes mineurs de cette méthode (interférence de certains produits, notamment les détergents, etc.) sont connus et peuvent être facilement tenus en compte ici. Encore ici vous travaillerez avec une plaquette, et il faudra veiller à ne pas égratigner ou salir la base des puits.

Ramener le réactif de dosage à température de la pièce après l'avoir agiter légèrement.

Préparer 500 μL de dilutions 50 X, 100 X et 500 X de con A commerciale 1 mg/mL et des fractions obtenues au cours de la purification (SB, DL et con A purifiée 1 mg/mL) avec du PBS.

Préparer dans des microtubes 250 μL d'étalons de γ -globuline 0, 25, 50, 75, 100, 150, 200, et 250 $\mu\text{g/mL}$ avec du PBS comme diluant et une solution stock de γ -globuline 250 $\mu\text{g/mL}$. Préparer également des dilutions 1, 10 et 50 X de chacun de vos échantillons (surnageant brut, dialyse, con A purifiée (2 mg/ml).

=> **6.1** Pourquoi utilisez-vous ici la γ -globuline comme étalon plutôt que la « traditionnelle » albumine de sérum de bœuf, employée pour la plupart des autres dosages de protéines ?

Déposer, en triplica, 25 μL chaque échantillon et étalon dans des puits d'une plaquette. Ajouter ensuite dans chaque puits 250 μL de réactif de Bradford de avec une micropipette à 8 canaux. Laisser incubé au moins 10, au plus 50. min avec agitation constante. Lire l'absorption à 595 nm avec le colorimètre à plaquettes.

Que détecte le réactif de Bradford dans les protéines ? Expliquer brièvement sa réaction lors du dosage des protéines.

Quels sont les autres méthodes de dosage des protéines communément employées. Nommez-en au moins une.

A l'aide de la courbe étalon (partie linéaire seulement), déterminer les concentrations de protéines dans chaque fraction originale (avant dilution). Pour cela identifier la zone linéaire échantillons ($R^2 > 0.995$) de la courbe d'étalonnage où devraient se retrouver les. A l'aide d'un logiciel type ExcellTM déterminer l'équation de régression linéaire de cette section. Déterminer ensuite la concentration des inconnus, n'oubliez pas de ramener la valeur avant dilution.

Comment calculeriez-vous le rendement en con A au cours des diverses étapes de votre isolement de la contenant. Quelle serait sa pureté ?

SOLUTIONS

PBS

γ -globuline 250 $\mu\text{g/mL}$ de PBS (4°C)

Réactif de dosage : réactif de Bradford reconstitué selon les directives du fabricant (Sigma, Cat B6918),
(4°C)