

Techniques d'Analyse Moléculaire

Dr AMIROUCHE A.
Licence Biochimie (2019/2020)



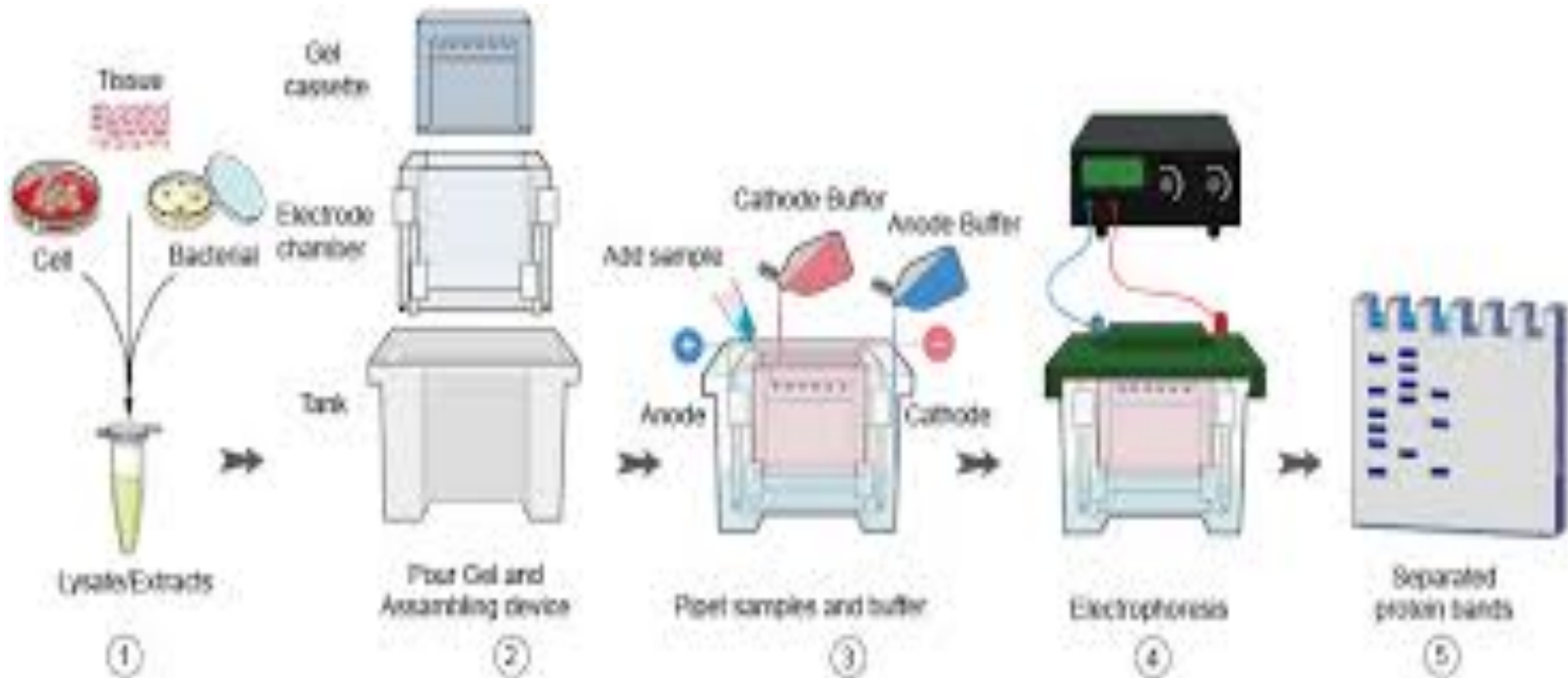
Chapitre II

A- Immunobloting (Western blotting)

- - dans un premier temps à séparer les protéines grâce à **une électrophorèse**.
- - Ces protéines ainsi séparées sont dans un deuxième temps **transférées** sur une membrane de nitrocellulose.
- - Dans un troisième temps, les protéines d'intérêts sont reconnues grâce à un marquage avec un anticorps primaire (reconnaissant la protéine d'intérêt).

ELECTROPHORESE SDS PAGE

Évaluer le niveau d'expression : analyse sur gel SDS-PAGE et par Western Blot.



II-A-1 Electrophorèses SDS page (Sodium dodécyl sulfate)

L'électrophorèse a pour but de séparer des molécules chargées au travers d'un gel sous l'effet d'un champ.

Cette électrophorèse est réalisée en conditions dénaturantes, c'est-à-dire en présence de SDS, de β -mercaptoéthanol pendant ébullition des extraits.

Le SDS a la particularité de conférer aux protéines une charge globale négative permettant ainsi de les séparer selon leur poids moléculaire.

1^{ère} étape : Dénaturation des protéines

Dans un tube eppendorf 0.5 ml, combiner 3 volumes d'échantillon protéique à un volume de tampon d'échantillon 4 X contenant du β -mercaptoéthanol 10% (v/v).

- Chauffer à 100°C pendant 3 minutes.

Tampon d'échantillon 4 X

Tris 250 mM	1.51 g Tris (PM=121.1)
Glycérol 20%	20 ml glycérol 50%
SDS 4%	20 ml SDS 10%

Ajuster le pH à 6.8

Attention : certains anticorps primaires ne requièrent pas de β -mercaptoéthanol.

Solutions de travail

- Solution du gel de séparation

Le pourcentage en acrylamide du gel de séparation est déterminé en fonction de la taille des protéines d'intérêt.

% en acrylamide	Résolution
15%	15 à 45 kDa
12,5%	15 à 60 kDa
10%	18 à 75 kDa
7%	30 à 120 kDa
gradient progressif	60 à 212 kDa

	<i>Gel 4%</i>	<i>Gel 7%</i>	<i>Gel 8%</i>	<i>Gel 10%</i>	<i>Gel 12,5%</i>	<i>Gel 15%</i>	<i>Gel 16%</i>
Acrylamide Solution A.	5 ml	8,75 ml	10 ml	12,5 ml	15,63 ml	18,75 ml	20 ml
Tris 0,375 M	2,27 g Tris (PM = 121,1)						
SDS 0,2%	1 ml SDS 10 %						
Glycérol 10%	10 ml glycérol 50%						

Procédure préparation gel séparation

- Couler le gel de séparation entre les plaques jusqu'à 1,5 cm du haut de la plaque (soit environ 8 ml).
- Insérer immédiatement les peignes en vérifiant qu'aucune bulle d'air ne soit emprisonnée sous les peignes
- Laisser polymériser pendant 45 min à température ambiante avant de retirer délicatement les peignes.

- Mettre en place les plaques dans la cuve d'électrophorèse. Remplir délicatement la cuve avec le tampon d'électrophorèse.
- Déposer les extraits protéiques et fixer les électrodes. Faire migrer 15 min à 50 V puis augmenter la tension à 90 V et laisser plusieurs heures (adapter en fonction du poids de la molécule d'intérêt).
- Couper l'alimentation et retirer les plaques.

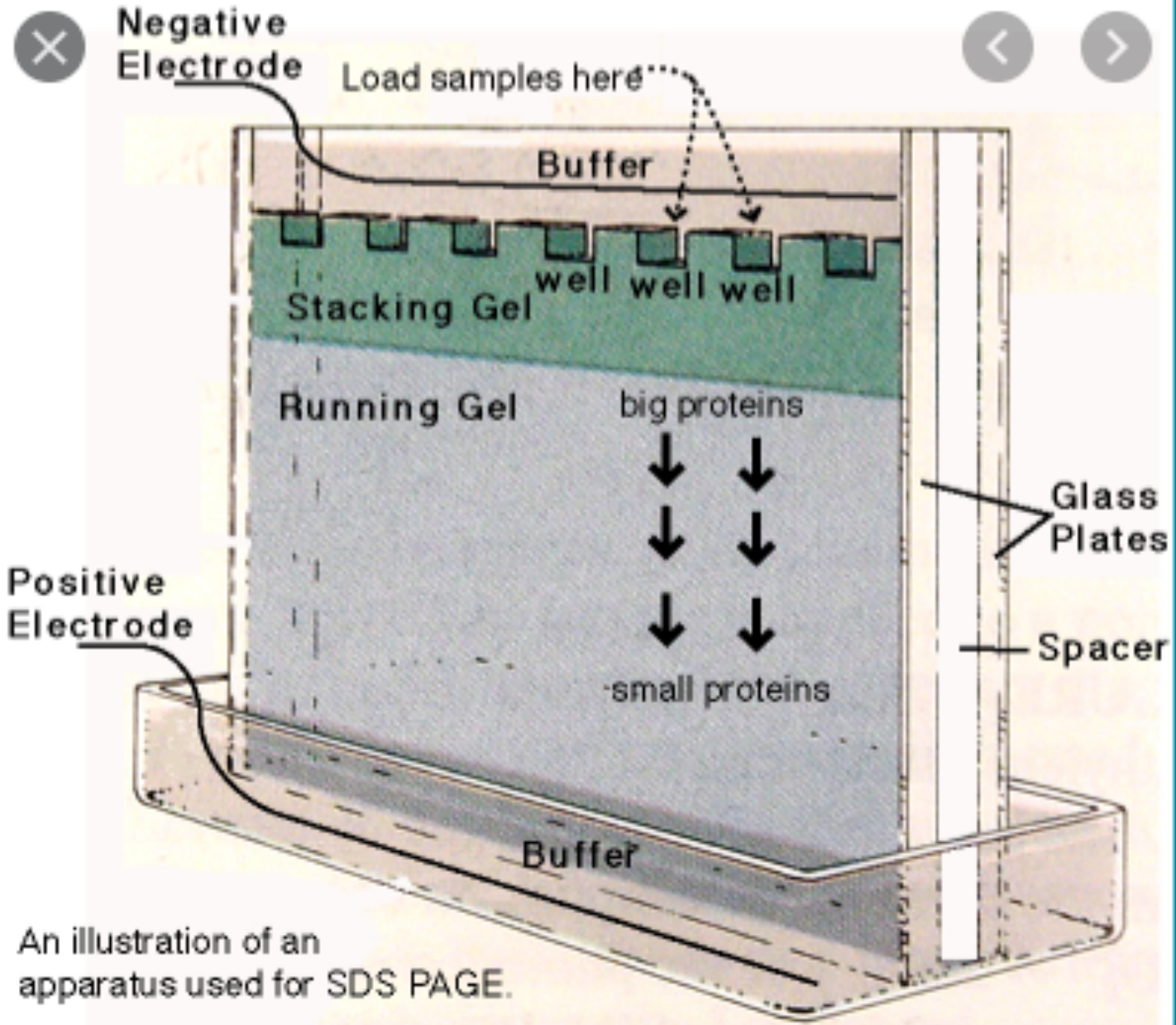
2ème étape : le Chargement et électrophorèse

- 1- Charger délicatement l'échantillon dans le puits en utilisant les cônes prévus à cet effet.
- 2- Prévoir la première ou la dernière ligne pour le marqueur de poids moléculaires (5 μ l).
- 3- Faire migrer à 80 volts pendant 15 minutes, puis à 95 volts. Le temps de migration dépend des poids moléculaires des protéines à séparer.

Tampon électrophorèse

Tris 25 mM	3 g Tris (PM=121.1)
Glycine 192 mM	14.41 g glycine (PM=75.07)
SDS 0.2 %	20 ml SDS 10%

Le PH doit être compris entre 8.1 et 8.4

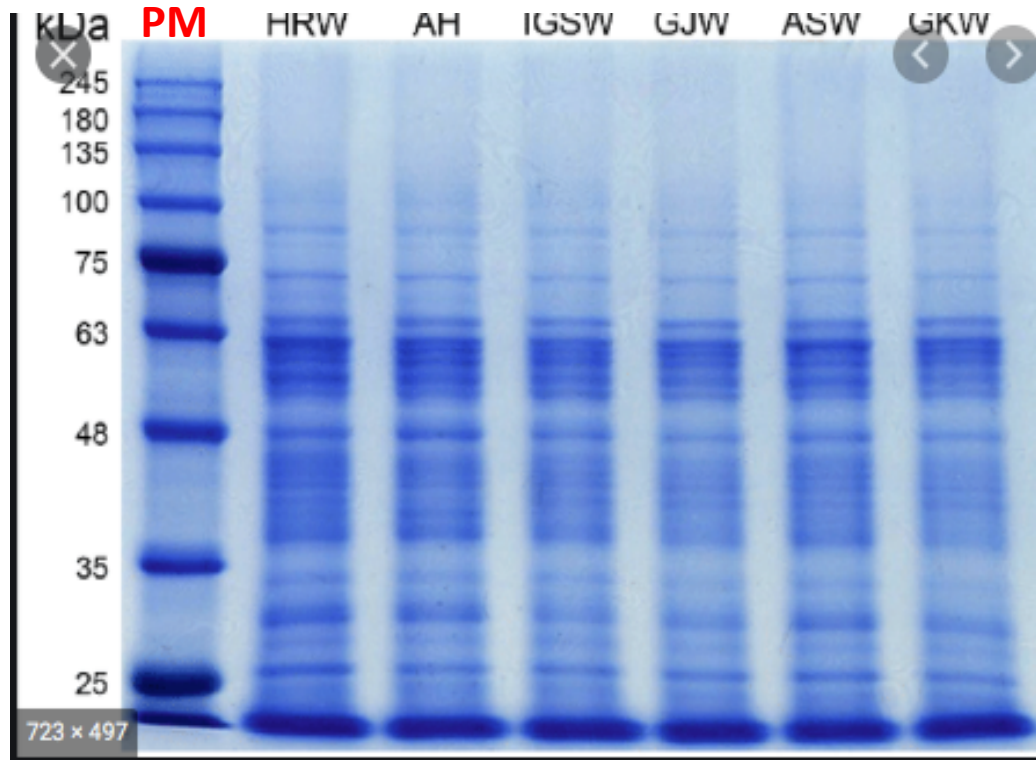


An illustration of an apparatus used for SDS PAGE.

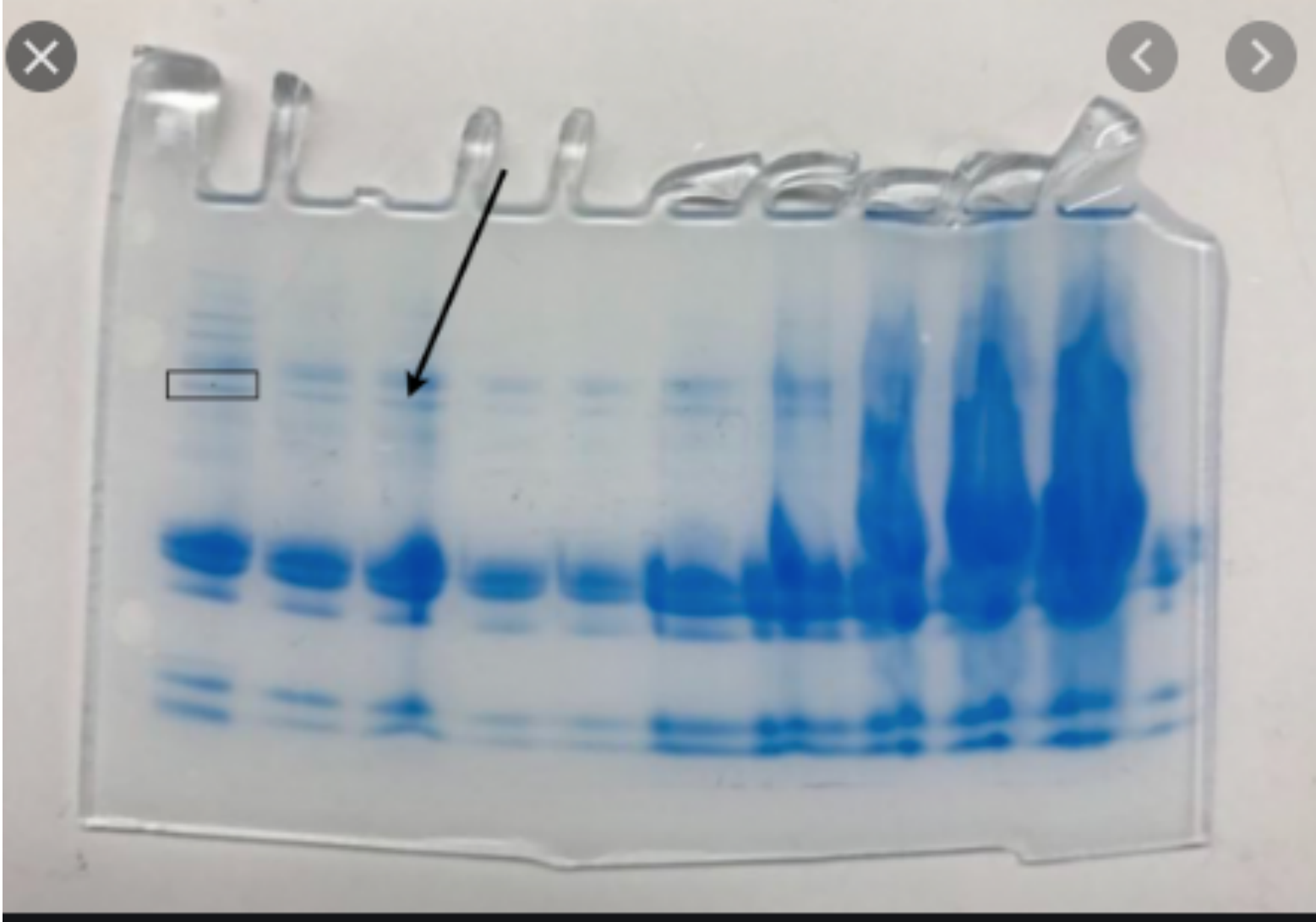
Vérification électrophorèse SDS page

Solution de coloration au bleu de Coomassie

- 10 % acide acétique
- 0,1 % Brilliant Blue G
- 45 % ΔH_2O
- 45 % méthanol



Vérification électrophorèse SDS page



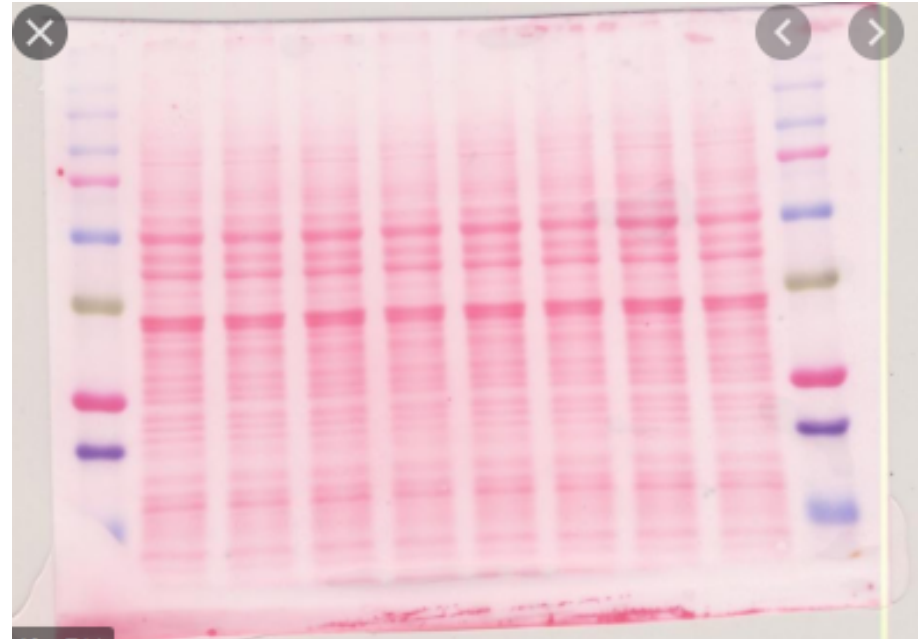
B- Transfert -Procédure

- Découper les membranes de nitrocellulose et les faire tremper 15 min dans du tampon de transfert.
- Décoller délicatement et faire tremper 15 min dans du tampon de transfert afin d'éliminer l'excès de SDS.
- Faire tremper des feuilles de blotting paper aux dimensions du gel ainsi que le pad mousse et disposer le pad mousse sur la face négative noire du sandwich.
- Prendre une feuille de blotting paper bien imprégnée de tampon et la disposer sur le pad mousse.
- Déposer ainsi successivement les 2 premières feuilles de blotting paper. Chasser les bulles d'air en roulant une pipette sur le papier.

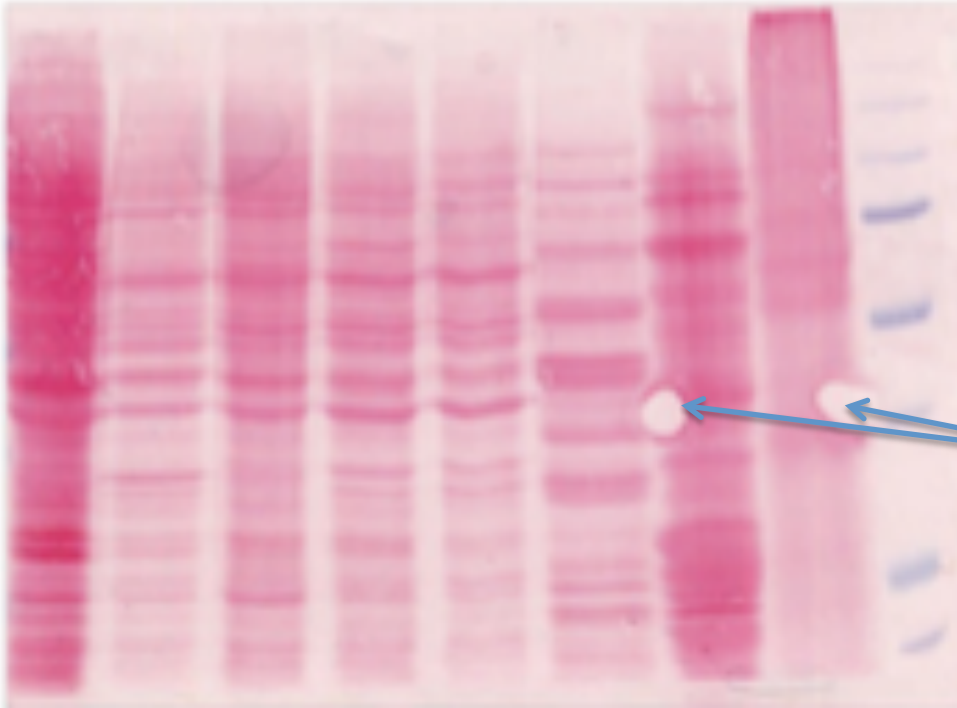
Vérification transfert Western blot

Coloration Rouge Ponceau

- Ponceau S 0,2%
- Acide trichloroacétique 3 %
- Acide sulfosalicylique 3 %



Coloration Rouge Ponceau



Bulles d'air

Blocage de la membrane

Cette étape a pour but de saturer les sites de fixation potentiels non spécifiques de la membrane. Le blocage avec du TBS 1x – 5 % Régilait permet ainsi de diminuer le bruit de fond lors de la révélation en « neutralisant » les sites non spécifiques grâce aux protéines contenues dans le lait.

Faire tremper la membrane pendant 1 h à 1 h 30 sous agitation à température ambiante dans la solution TBS 1x – 5 % Régilait.

Laver la membrane avec du TBS 1x pendant 10 min.

Anticorps primaire

Préparer l'anticorps primaire à la dilution appropriée dans une solution de TBS 1x – Tween-20 0,05 % – 5% Régilait ou 5 % BSA (compter 3 ml pour une membrane).

Déposer 2 ml de solution contenant l'anticorps sur la plaque en verre puis disposer la membrane sur la plaque, face protéique contre la plaque. Eviter la formation de bulles qui pourraient prévenir la fixation de l'anticorps. Incuber la face arrière de la membrane avec le reste de la solution (1 ml).

Laisser incuber une à deux heures à température ambiante ou toute la nuit à 4°C.

Laver ensuite la membrane 2 x 5 min avec du TBS 1x – Tween-20 0,05 % puis 10 min avec du TBS 1x.

Anticorps secondaire

- Préparer l'anticorps secondaire à la dilution appropriée dans une solution de TBS 1x – Tween-20 0,05% – 5% Régilait (compter 3 ml pour une membrane). Bien vérifier la compatibilité de l'anticorps secondaire avec le primaire.
- Déposer 1 ml de TBS 1x – Tween-20 0,05% – 5% Régilait sans anticorps sur une plaque en verre puis disposer la membrane face non protéique contre la plaque de verre.
- Déposer ensuite la solution contenant l'anticorps sur la membrane en s'assurant de bien recouvrir la totalité de la membrane. Recouvrir l'ensemble.
- Laisser incuber une heure à température ambiante.
- Laver ensuite la membrane 2 x 5 min avec du TBS 1x – Tween-20 0,05% puis 10 min avec du TBS 1x.

Tests d'expression de la protéine recombinante

Detection in Western Blots

