

Techniques d'Analyse Moléculaire

Dr AMIROUCHE A.
Licence Biochimie (2020/2021)



Extraction des Protéines

I- A Extraction avec le tampon d'extraction NaKP

Cette extraction est utilisée pour effectuer des analyses enzymatiques

Tampon d'extraction :

Na_2HPO_4 75 mM

5.32 g de Na_2HPO_4 (PM=141,96 g/mol)

KH_2PO_4 25 mM

1.70 g de KH_2PO_4 (PM=136,09 g/mol)

EDTA 2mM

292.2 mg d'EDTA (PM=292.2 g/mol)

pH=7.2.

Le protocole consiste en 2 extractions successives :

La 1^{ère} extraction est réalisée à partir d'un morceau d'un tissu congelé pesant en moyenne 25 mg sur lequel il était ajouté 500 μ l de tampon d'extraction dans un tube eppendorf pour avoir une dilution finale de 1/20 (poids / volume).

Un broyage des tissus à l'aide de l'ultrathurrax (13500 rpn) était réalisé avant une agitation régulière pendant 5 minutes à 4°C.

L'homogénat était soumis à des ultrasons 4 x 10 sec, suivi d'une centrifugation 15 000g x 10 minutes à 4°C. Le surnageant était récupéré dans un tube eppendorf refroidi à 4°C.

La 2^{ème} extraction était réalisée à partir du culot de centrifugation, avec le même volume de tampon d'extraction permettant d'avoir une dilution finale 1/40.

Le 2^{ème} surnageant était alors associé au surnageant de la première extraction.

Les extraits ensuite étaient conservés à - 80°C jusqu'à utilisation.

-B Extraction avec le tampon Urée

Cette extraction est utilisée pour effectuer des analyses de niveau en protéines.

Tris HCl 125 mM	1.97 g (PM=157.6 g/mol)
Glycérol 10%	20 ml de glycérol 50%
SDS 4%	4 g
Urée 4 M	24.02 g (PM = 60.06 g/mol)
β-MeOH 10%	10 ml
Bleu de Bromophénol 0.001%	1 mg
pH = 6.8	

Ajuster le pH à 6.8.

Peser 20 à 30 mg tissus.

Ajuster la dilution poids/volume au 1/20 (soit 800 μ l d'extrait pour 20 mg de muscle).

Homogénéiser 2 x 15 sec dans la glace avec un ultrathurax.
Faire bouillir les échantillons pendant 3 min.

Centrifuger à 9500 g x 3 min.

Aliquoter les extraits protéiques sous fraction de 50 μ l.

C- Extraction avec le tampon d'extraction Ripa

Tampon d'extraction :

25 mM de Tris-HCl (pH 7.6),

150 mM de NaCl,

1 % de NP-40,

1 % de désoxycholate de sodium,

0.1 % de SDS

Peser 20 à 30 mg tissus.

Ajuster la dilution poids/volume au 1/20 (soit 800 μ l d'extrait pour 20 mg de tissus).

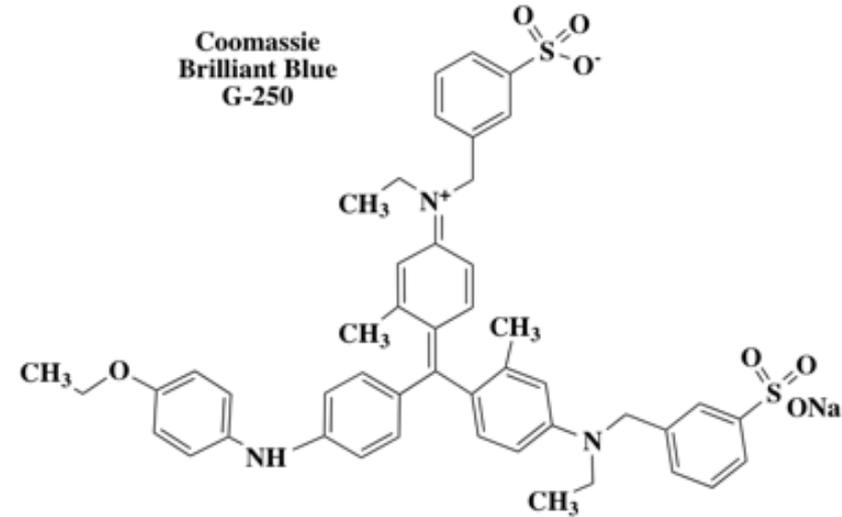
Homogénéiser 3 x 15 sec dans la glace avec un ultrathurax.

Centrifuger à 10 000 g x 3 min.

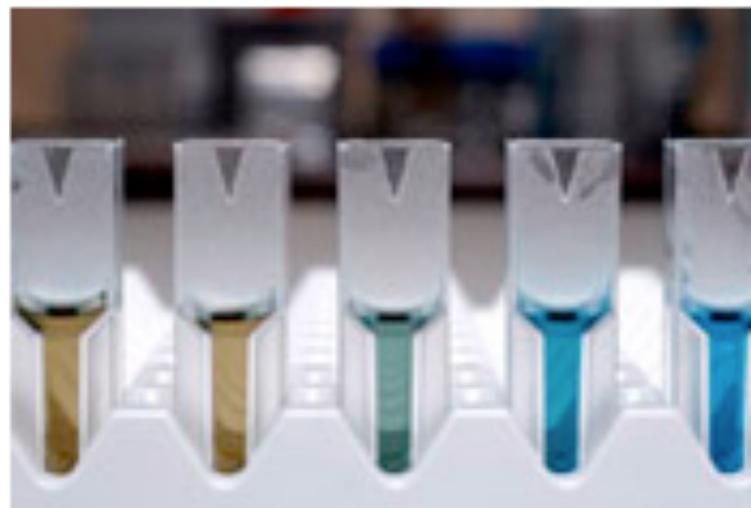
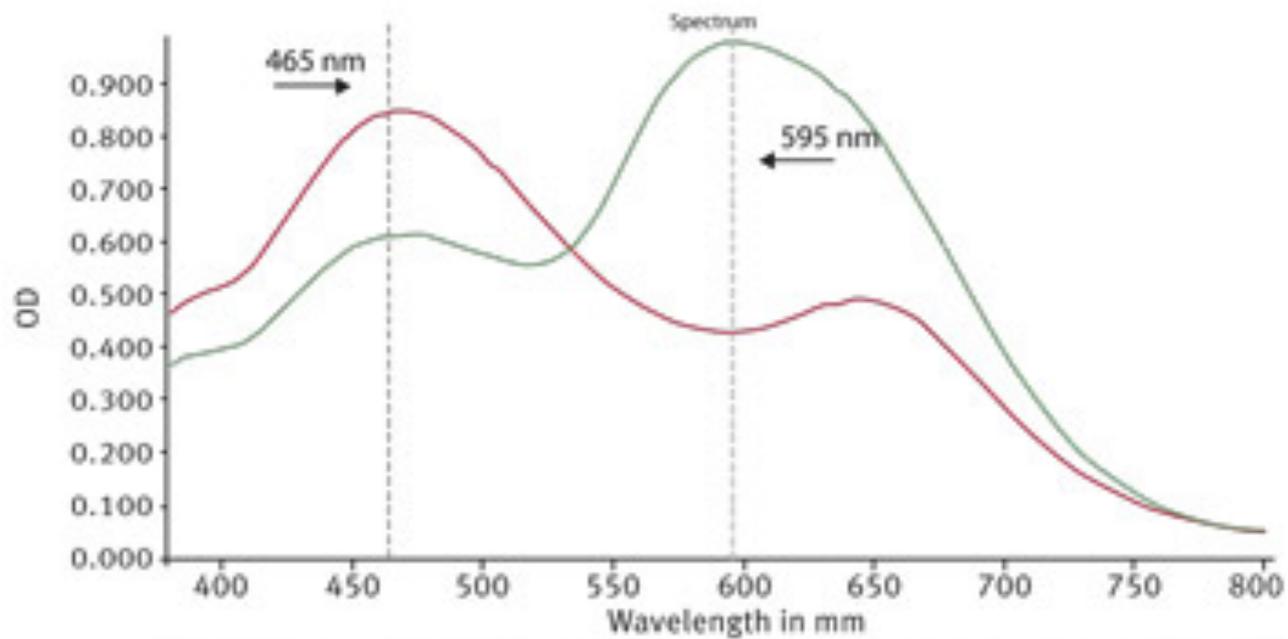
Aliquoter les extraits protéiques sous fraction de 50 μ l.

D- Détermination de la concentration de protéines par dosages colorimétriques

1- Méthode BRADFORD



Sa longueur d'onde d'[absorbance maximale est 465 nm.](#)
Le pigment forme un complexe avec les protéines : sa structure est modifiée par cette interaction et sa longueur d'onde d'absorbance maximale est déplacée de 465 à 595



L'interaction pigment - protéine s'effectue essentiellement avec :

En milieu acide, la forme anionique du bleu de Coomassie G250 interagit (par des liaisons non covalente = adsorption) **avec les radicaux aromatiques des acides aminés constitutifs des protéines**. Sa longueur d'onde maximale d'absorption augmente alors de 465 nm (rouge) à 595 nm (bleu).

Inconvénients

- 1- Méthode linéaire sur un intervalle étroit ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ à $120 \mu\text{g.mL}^{-1}$) ce qui rend nécessaire des dilutions préliminaires de l'échantillon tissulaire avant analyse.
- 2- Les acides aminés, les peptides et les protéines de bas poids moléculaire ($< 3\ 000 \text{ Da}$; 1 dalton Da correspond à la masse molaire d'un atome d'hydrogène soit 1 g.mol^{-1}) ne sont pas détectés par cette méthode.
- 3- Dosage influencé par les bases fortes, les détergents, les lipides et les acides nucléiques.

Dosage de la concentration en protéines totales

kit Bio-Rad. Ce dernier permet la mesure de la concentration en protéine par colorimétrie en combinant deux réactions :

- 1) Une réaction entre le(s) peptide(s) et l'ion cuivre (Cu^{2+}) sous conditions alcalines, et
- 2) Une oxydation des résidus tyrosines et tryptophanes constitutifs des protéines

Le kit est compatible avec SDS (10 %), NP-40 (2 %), EDTA (0.025 M), digitonin (0.3%), Tween-20 (1%), DTT (1 mM), Triton X-100 (1%).

Par contre, il est incompatible avec les tampons d'extraction contenant du **β -mercaptoéthanol**.

Dosage de la concentration en protéines totales

Protocole

- *courbe étalon*

<i>μg protéines</i>	0	10	20	30	40	50
<i>$\Delta \text{H}_2\text{O}, \mu\text{L}$</i>	195	190	185	180	175	170
<i>Tampon extraction, μL</i>	5					
<i>BSA 2 mg/mL, μL</i>	0	5	10	15	20	25
<i>Solution A, μL</i>	100					
<i>Solution B, μL</i>	800					

Purification des Protéines

Obtenir en quantité suffisante une protéine « pure » tout en préservant ses propriétés physiologiques (structure et activité).

Source  Extraction  Purification

- Dosage de la quantité produite
- Contrôle de la pureté
- Contrôle de l'activité
- Stockage

Origine de l'enzyme

animale

végétale

microbienne

broyage

intracellulaire

extracellulaire

broyage cellulaire

centrifugation / filtration

mécanique

non mécanique

cellules

surageant

élimination des acides nucléiques

UF / diafiltration

Purification des protéines

1. Méthodes d'extraction

L'objectif: libérer les protéines des cellules ou des structures subcellulaires au sein desquelles ils se trouvent.

il est donc nécessaire de détruire selon le cas : la paroi, la membrane cellulaire et les structure subcellulaire par des propriétés physiques et chimiques efficaces.

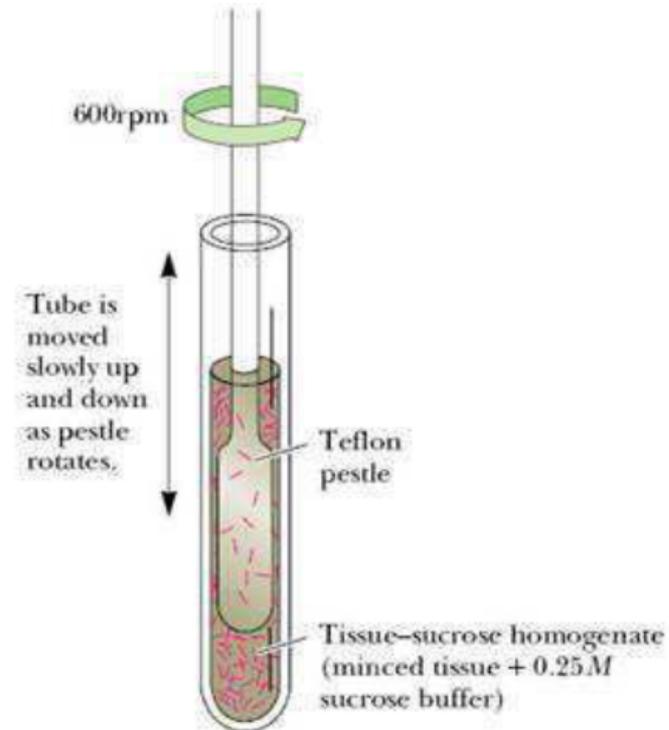
Les tissus peuvent être utilisés en biochimie sous forme de fragment organes, des coupe fines ou de broyat (obtenus après passage dans un broyeur type mixeur ménager).

- Utilisation d'abrasifs :

L'agitation violente en présence de microbilles de verre désintègre les micro-organismes par rupture de la paroi et libération des constituants cytoplasmique.

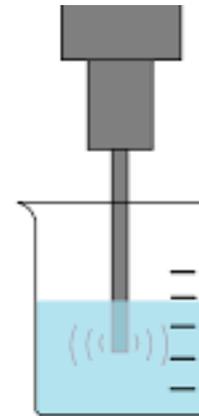
- Extraction par homogénéisation a haute pression :

L'homogénat est obtenu après passage dans un appareil de Potter-Elvehjem



- **Sonication :**

C'est un appareil qui propage des ondes a travers une sonde entrainant ainsi des vibrations.



Choc osmotique :

La dispersion d'une suspension dense de cellules réalisée dans un milieu hypertonique (saccharose 20%) dans l'eau à 4 °C provoque la libération des constituants cellulaires, cette technique est très douce et ne dénature pas les protéines.

Traitement alcalin :

Hydrolyse de la membrane cellulaire à un pH entre 11,5 et 12,5. Cette technique est simple. Applicable si l'enzyme est stable a pH alcalin.

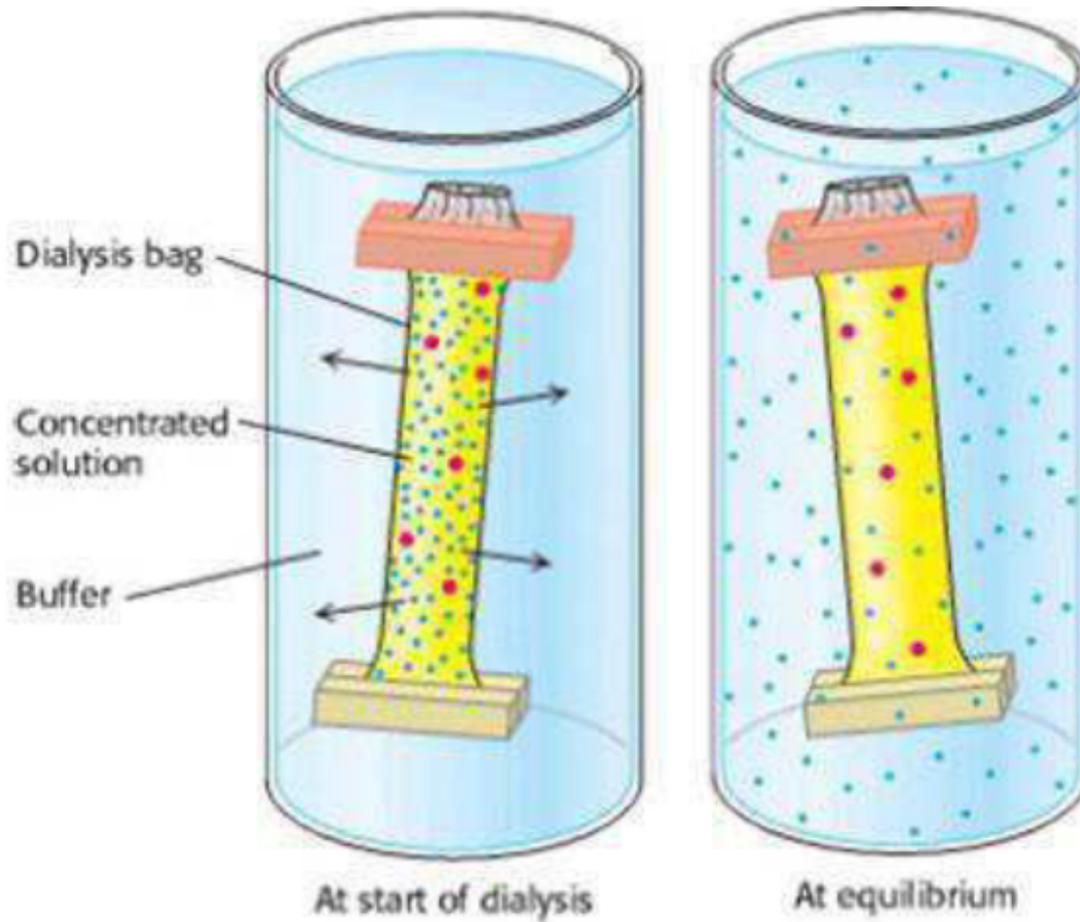
Emplois de détergents :

Dans certain condition de pH et de force ionique les détergents (ionique ou non) se combinent aux lipoprotéines ainsi des micelles rendant la membrane perméable.

L'inconvénient de cette méthode est la possibilité de dénaturation des enzymes sous l'effet des détergents.

Procédées de séparation basée sur la taille moléculaire :

1- Dialyse



PRINCIPES DE BASE

La dialyse est basée sur les principes régissant la diffusion à travers une membrane perméable ou semi-perméable. Deux mécanismes entrent en jeu dans ce processus. Tout d'abord, les molécules diffusibles vont traverser la membrane selon le gradient de concentration. Il y aura donc un déplacement net des molécules du côté le plus concentré vers le côté le moins concentré. Chaque espèce chimique en solution subit individuellement ce processus. On peut amplifier cette élimination des molécules diffusibles en répétant ce processus.

Procédées de séparation basée sur la taille moléculaire :

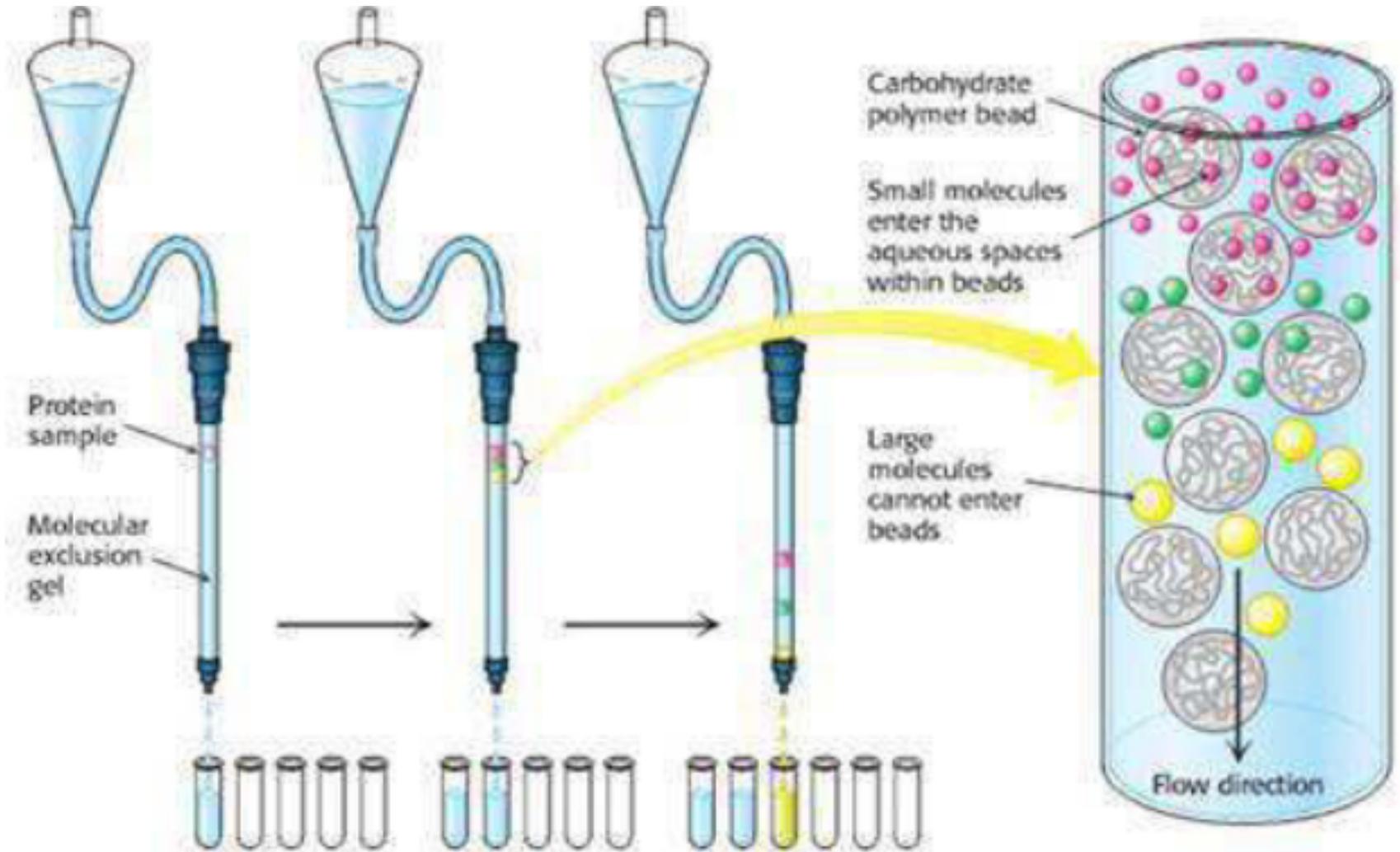
Filtration et ultrafiltration :

Ultrafiltration sur membrane à perméabilité sélective permettre la séparation des substances selon leur tailles moléculaire, approximativement selon leur poids moléculaire.

Les petites molécules sont séparées par ultrafiltration dans laquelle une réaction ou une force centrifugeuse est utilisé pour filtré les petit molécules de soluté a travers une membrane semi-perméable qui retient les molécules protéiques.

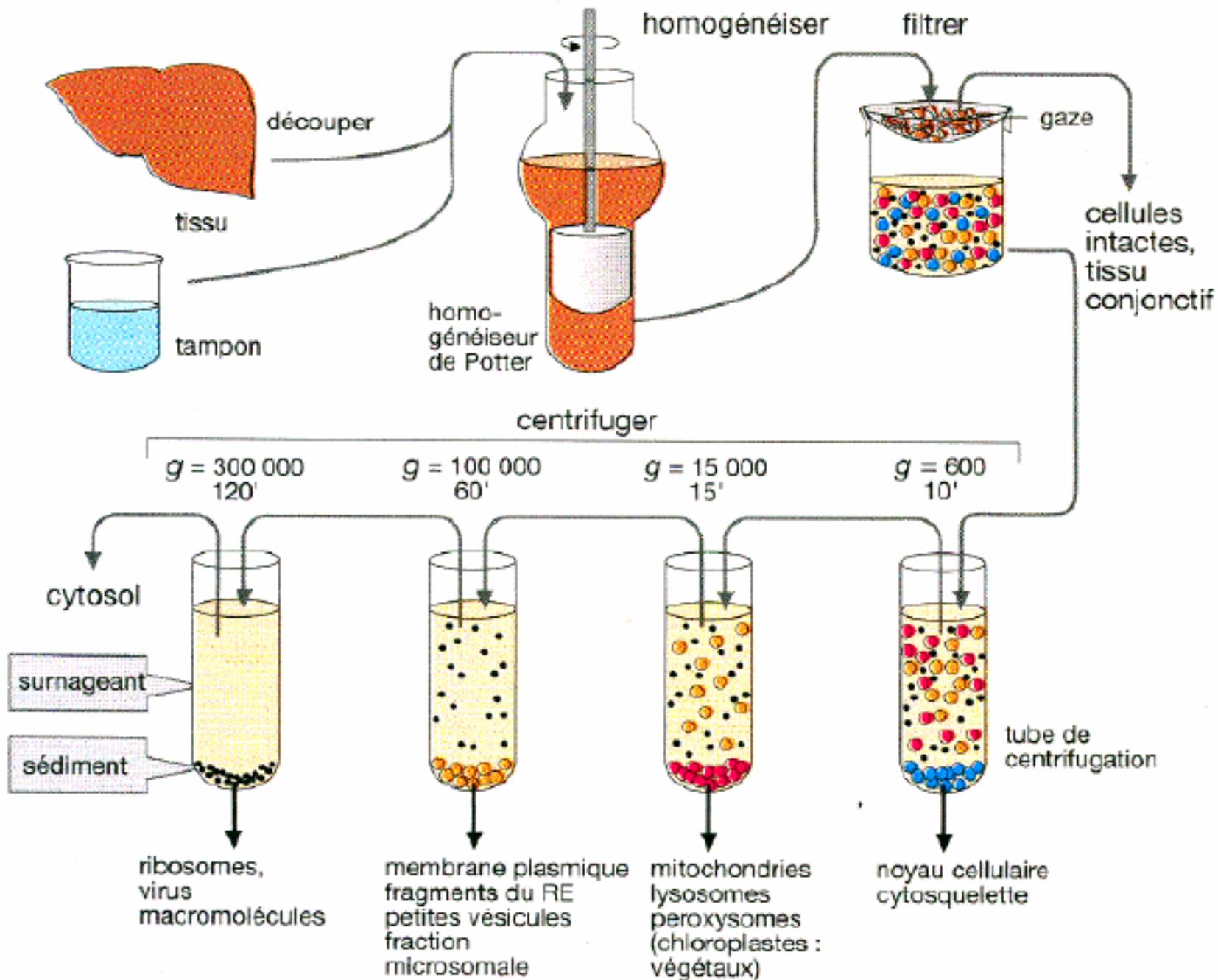
Procédées de séparation basée sur la taille moléculaire :

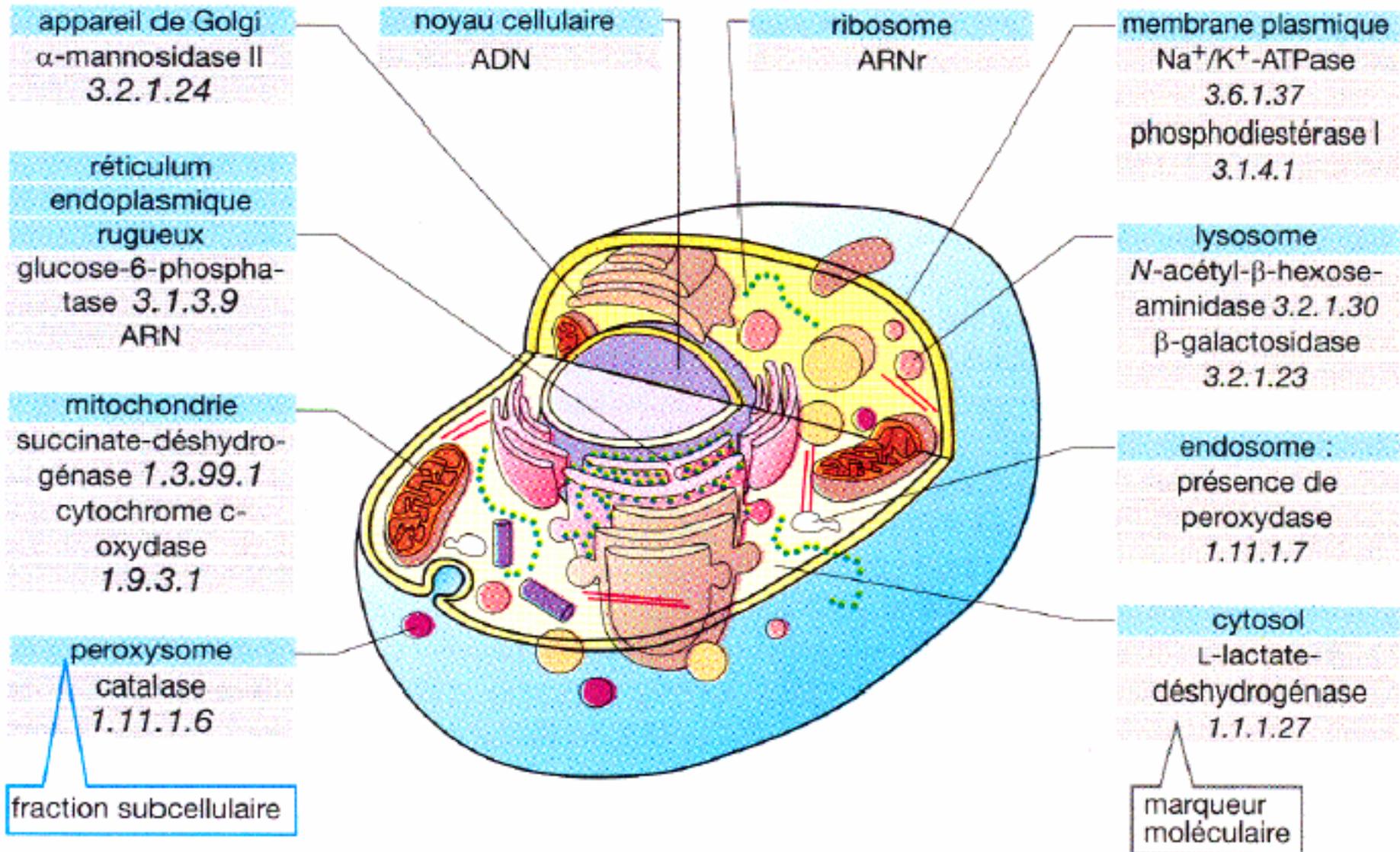
Filtration et ultrafiltration :



Centrifugation en gradient de densité

La centrifugation en gradient de densité zonal constitue un procédé de séparations utile non seulement pour les protéines mais également des macromolécules (enzymes, hormones, sous unité ribosomale) dans la plupart des technique courante un gradient de densité constitué de saccharose est d'abord préparé dans un tube est rempli de telle sorte que la densité soit la plus grande à l'extrémité de tube. Le mélange de macromolécule est déposé à la partie supérieur de gradient , la centrifugation à grande vitesse amène chaque type de macromolécule à sédimenté à sa propre vitesse déterminé essentiellement par le poids de la particule et la densité et la forme des molécules qui se traduit par des bande séparées par des zones.





Stratégie d'ensemble pour purifier une protéine d'intérêt

- les protéines sont purifiées par des méthodes de fractionnement
 - on utilise les différentes propriétés physico-chimiques de la protéine étudiée pour l'isoler progressivement des autres substances cellulaires
- les propriétés physico-chimiques exploitées dans les différentes techniques de séparation sont:
 - la solubilité
 - la charge ionique
 - la taille moléculaire
 - les propriétés d'adsorption et de liaison à d'autres molécules biologiques

Propriété physico-chimique

solubilité

charge ionique

taille moléculaire

spécificité

Techniques de séparation

- précipitation

- chromatographie par échange d'ions
- électrophorèse
- focalisation isoélectrique

- ultracentrifugation
- chromatographie par gel-filtration
- électrophorèse

- chromatographie d'affinité

Procédés basé sur les différences de solubilité

La solubilité des protéines en solution est fonction de plusieurs facteurs : pH, température, force ionique, propriété électrique du solvant ect... ces variables peuvent être utilisé pour séparé des mélange protéique.

Précipitation isoélectrique (effet de pH)

Le pH modifie l'ionisation des groupe de charge

- Utilise des solutions tampon qui maintiennent le pH dans une zone "physiologique » (6.5-7.5/8.0) pour éviter d'endommager les protéines par des variations brusque de pH.

La solubilité de la β -lactoglobuline est minimale a pH de 5,2 quelque soit la concentration en NaCl

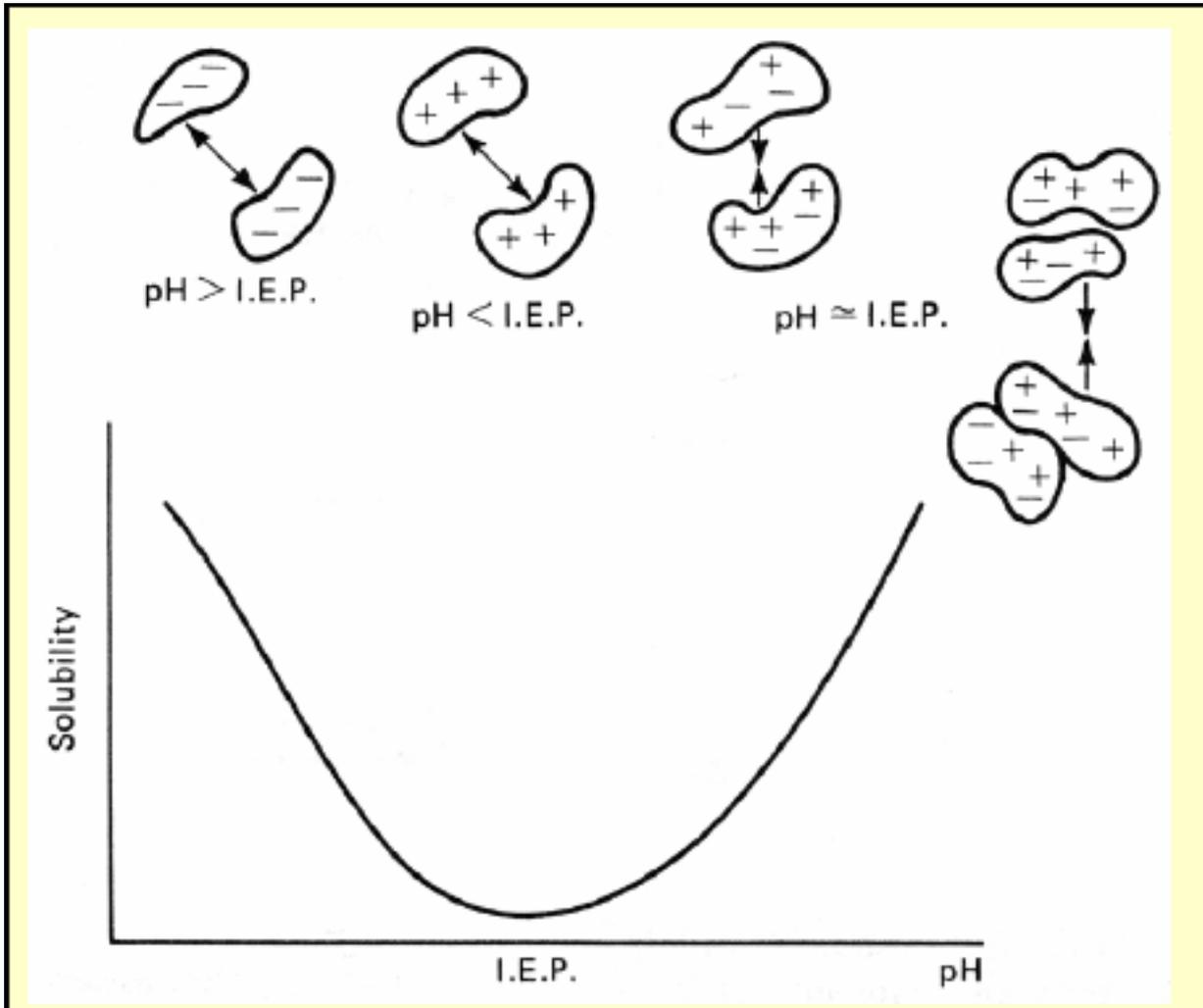


Figure 12: Solubilité d'une protéine globulaire près de son point isoélectrique (IEP)

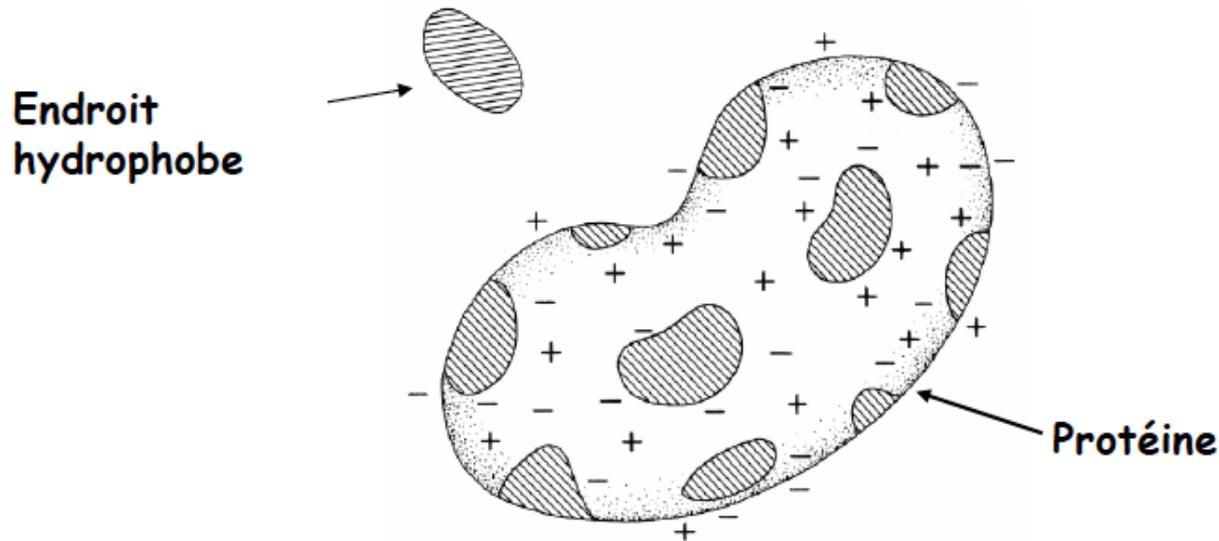
Température

- les protéines sont facilement dénaturées à hautes températures
- plusieurs protéines se dénaturent lentement lorsque conservées à 25°C
- la purification des protéines se fait normalement à des températures proches de 0-5°C
- une fois purifiées, les protéines peuvent se conserver à long terme à de températures de -20 à -80°C

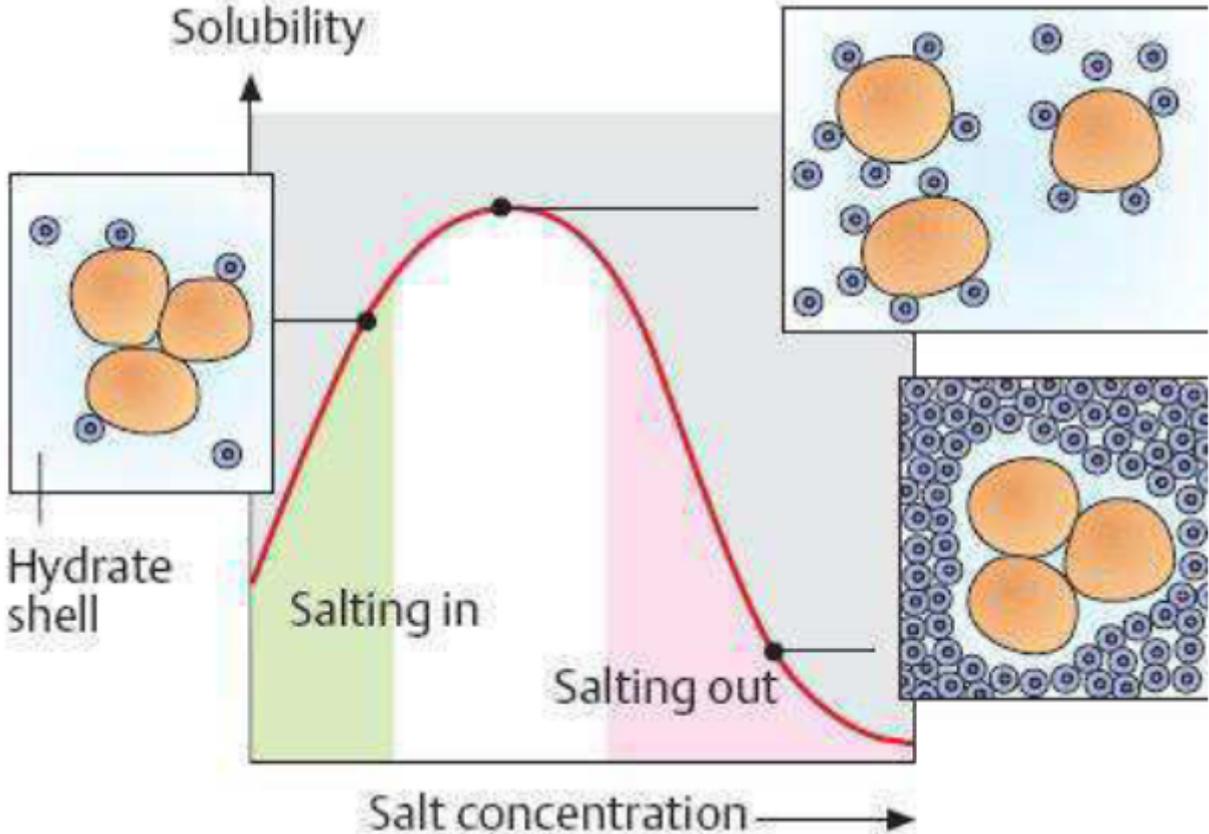
La dissolution par des sels

une approche couramment utilisée pour purifier une ou des protéines est de les précipiter (diminuer sélectivement leur solubilité dans l'eau).

- la distribution des résidus d'acides aminés de types hydrophobe à la surface des protéines est aussi importante dans la solubilité des protéines que les résidus de type polaires ou chargés

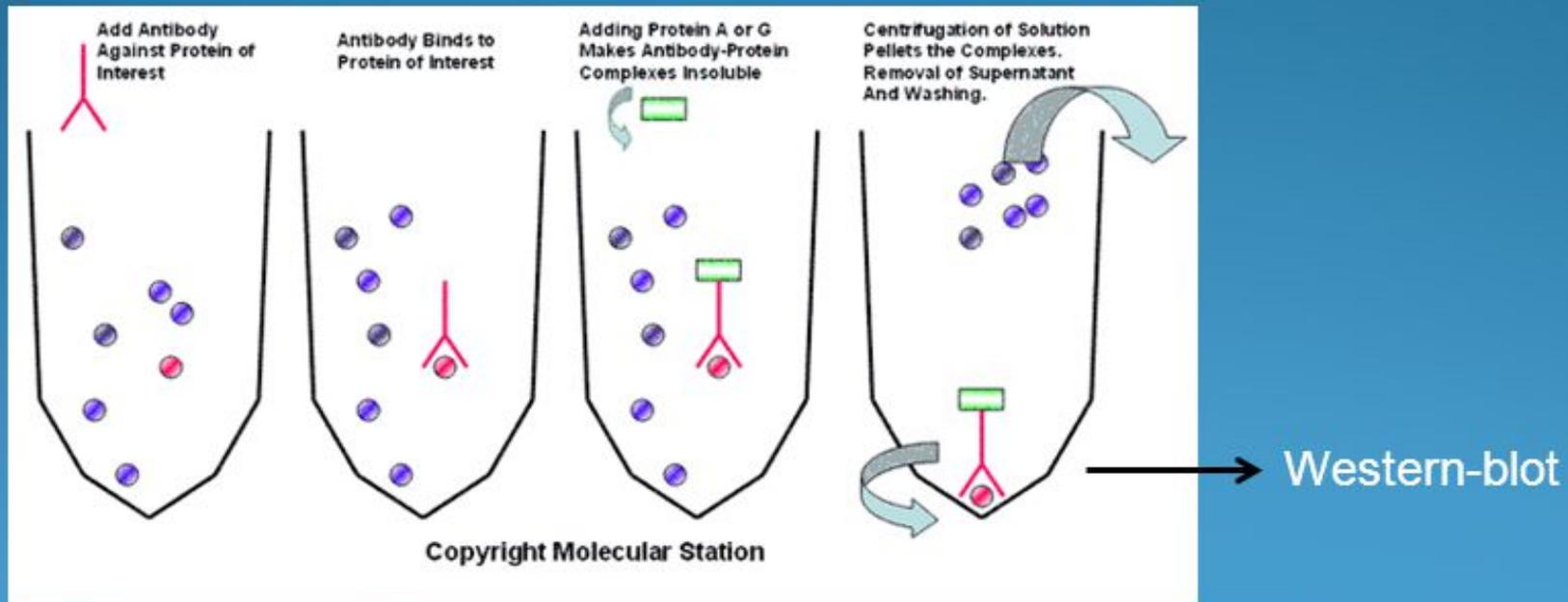


A faible concentration les sels augmentent la solubilité de nombreuses protéines ; phénomène appelé la dissolution par les sels ou salting-in, l'action des sels sur les protéines est fonction de leur force ionique qui mesure à la fois la concentration et charge sur les cations et les anions fournis par les sels.



Immunoprécipitation

- Isoler une protéine d'intérêt à partir d'un lysat cellulaire
- Utiliser un Ac spécifique de la protéine d'intérêt
- Précipiter le complexe Protéine-Ac avec une forme insoluble de protéines se liant à les anticorps (ex: Protein G)
- Centrifuger la suspension: la protéine d'intérêt est séparée



- Interactions protéines-protéines, protéine-médicament
- Concentration d'une protéines présente en faible quantité

Tests d'expression de la protéine recombinante

Detection in Western Blots

