

Extraction de protéines (Western Blot) - tampon de lyse

Préparer tampon de lyse :

- 0.3 mL NaCl 5M
- 0.5 mL Tris-base pH 8
- 0.1 mL Nonidet P 40 (NP40)
- 0.5 mL Desoxycholate 10 %
- 0.1 mL SDS 10 %
- 0.5 mL Sodium pyrophosphate (Na₄PP) 0.2 M
- 0.1 mL EDTA 0.5M pH 8
- 7.9 mL H₂O
- 1 comprimé inhibiteur de protéases (Mini, EDTA-free)(Roche)(1 comprimé / 10 mL de solution)

Préparer tampon Laemli 4X :

- 25 mL Tris/SDS pH 6.8 4X (6.05 g Tris-base, 0.4 g SDS, compléter avec H₂O à 100 mL).
- 20 mL Glycérol
- 4 g SDS
- 2 mL Mercaptoéthanol
- 1 mg (minimum) Bromophénol bleu
- Compléter avec H₂O à 50 mL.

1. D'une plaque à 6 puits dans lesquels sont conservées les cellules sous étude, transférer le contenu de chaque puits dans un tube Falcon de 15 mL approprié.
2. Rincer les puits avec environ 1 mL de PBS 1X froid puis transférer le liquide également dans le tube Falcon (15 mL).
3. Mettre 750 µL de trypsine dans les puits et incuber à 37 °C pendant 2-3 minutes.
4. Décoller et recueillir, en pipettant, les cellules de chaque puits dans leur tube Falcon respectif.
5. Centrifuger à 1000 rpm pendant 5 min à 4 °C.
6. Enlever le surnageant (par inversion du tube) et suspendre le culot dans 1 mL de PBS 1X froid.
7. Transférer cellules en suspension dans eppendorf correspondant et centrifuger à 2000 rpm pendant 5 min à 4 °C. Puis faire un quick-spin pendant 30 sec.
8. Enlever le surnageant (avec pipetman ou par siphon).
9. Suspendre culot dans 1 mL de PBS 1X froid et centrifuger à 2000 rpm pendant 5 min à 4 °C. Puis faire un quick-spin pendant 30 sec.
10. Enlever le surnageant (avec pipetman ou par siphon).
11. Suspendre le culot dans 50 µL de tampon de lyse à 4 °C.
12. Faire tourner les eppendorfs contenant le culot sur le rotateur pendant 1 h à 4 °C.
13. Centrifuger les eppendorfs à 13000 rpm pendant 20 min à 4 C.
14. Retirer le culot visqueux.
15. Ajouter au surnageant 25 µL de tampon Laemmli 4X.
16. Prélever 10 µL pour éventuel dosage de protéines Lowry.
17. Conserver l'extrait des protéines à -20 °C jusqu'à son électrophorèse (SDS-PAGE).

Electrophorèse des protéines

A) Solutions utilisées

Lower Gel Buffer 4X (LGB) (pour 100 ml):

- ⤴ 18.16 gr de Tris-Base (1.5 M final)
- ⤴ 2 ml de SDS 20 % (0.4 % final) ajuster à pH 8.8 avec HCl

Upper Gel Buffer 4X (UGB) (pour 100 ml):

- ⤴ 6.05 gr de Tris-Base (0.5 M final)
- ⤴ 2 ml de SDS 20 % (0.4 % final) ajuster à pH 6.8 avec HCl

10X Running Buffer (pour 4 litres):

- ⤴ 121.1 gr Tris-BASE (0.25 M final)
- ⤴ 40g de SDS (1 % final)
- ⤴ 576.4 gr de Glycine (1.92 M final)

Solution acrylamide 30%: bis acrylamide 0.8 % (pour 100 ml):

- ⤴ 29.2 gr d'acrylamide
- ⤴ 0.8 gr de bis-acrylamide
- ⤴ Compléter à 100 ml avec H₂O nanopure
- ⤴ Filtrer sur 0.22 µm
- ⤴ Conserver à 4 °C à l'**obscurité**.

Ammonium persulfate 10 % (pour 10 ml):

- ⤴ 1 gr d'ammonium persulfate dissous dans 10 ml H₂O final
- ⤴ Conserver à 4 °C à l'**obscurité** ou aliquoter et congeler à -20 °C

B) Montage des gels

1. Nettoyer soigneusement et sécher toutes les composantes du montage: vitres, spacers, peignes à l'éthanol
2. Monter les gels selon les recommandations du fabricant. Mettre de l'eau pour voir l'étanchéité du montage. Retirer l'eau et assécher avec un bout de papier Whatman.

3. Recette pour gel séparateur (resolving gel) : **respecter l'ordre pour le mélange**

Ps : tourner la solution en évitant de faire des bulles

	Final acrylamide concentration in the seperating gel (in ml)									
	5	6	7	7.5	8	9	10	12	13	15
1 - H2O	8.75	8.25	7.75	7.5	7.25	6.75	6.25	5.25	4.75	3.75
2 - 4X Tris-Cl/SDS, pH 8.8	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75
3 - 30% acrylamide / 0.8% bis-acrylamide	2.5	3	3.5	3.75	4	4.5	5	6	6.5	7.5
4 - 10% Amonium persulfate	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
5 - TEMED	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01

4. faire un point sur vitre à 6.5 cm du bas
5. Couler le gel à 7 cm du bas et enlever bulle
6. Mettre à l'aide d'une seringue un peu de n-butanol saturé en H2O pour aplanir le haut du gel.
7. Prévoir 25 min pour la polymérisation. Enlever le n-butanol.
8. Rincer abondamment le haut du gel avec H2O bidistillée afin d'éliminer toute trace de butanol. A l'aide d'un morceau de papier Whatman enlevé toute trace d'eau sans toucher le gel
9. Recette pour gel concentrateur (stacking gel):

	# of upper gel (in ml)					
	1	3	6	8	10	15
1 - H2O	1.5	4.5	9	12	15	22.5
2 - UGB 4X	0.625	1.875	3.75	5	6.25	9.375
3 - 30% acrylamide / 0.8% bis-acrylamide	0.375	1.125	2.25	3	3.75	5.625
4 - 10% Amonium persulfate	0.02	0.06	0.12	0.16	0.2	0.3
5 - TEMED	0.003	0.009	0.018	0.024	0.03	0.045

10. Couler au-dessus du gel séparateur. Mettre le peigne (en enfonçant plus les dents) et une pince à chaque coin. Rajouter de la solution à la pipette si le niveau baisse.
11. Laisser polymériser 20 min.
12. Monter le gel sur l'appareil contenant du Running Buffer 1X
13. Mettre Running Buffer 1X dans le réservoir du haut
14. Enlever le peigne lentement de sorte que du tampon rentre dans les puits et nettoyer les puits à l'aide d'une seringue munie d'une aiguille (recommencer juste avant de déposer)
15. Bouillir les échantillons 3 min et les centrifuger. Déposer sur gel
16. Conditions de migration : 120 volts dans gel concentrateur / puis 180 volts dans gel séparateur

PS : prévoir toujours un gel en plus

Transfert des protéines sur membrane

Solutions utilisées

Tampon de transfert (4L)

- ⤴ 58g Glycine
- ⤴ 12.1g Tris
- ⤴ 1000 ml Methanol
- ⤴ Ne pas ajuster le pH

TBS-T (4L)

- ⤴ 120 ml NaCl 5M
- ⤴ 40 ml Tris-HCl 2M pH 7.6
- ⤴ 4 ml Tween 20
- ⤴ Compléter à 4 litres avec eau bidistillée

Solution rouge de Ponceau S

- ⤴ 30g Trichloroacetic acid
- ⤴ 30g sulfosalicylic acid
- ⤴ 2 g Ponceau S
- ⤴ Compléter à 100 ml avec eau nanopure
- ⤴ **Solution de travail (dilution 1:5):** 100 ml solution stock dans 400 ml H₂O nanopure

Protocole de transfert

1. Remplir le fond d'un grand plat de plastique avec du tampon de transfert froid
2. Mettre la cage de transfert, le côté noir (anode) dans le tampon.
3. Imbiber une première éponge avec du tampon de transfert (dans un autre bac) et déposez cette dernière sur la plaque noire de la cage de transfert
4. Démouler le gel à transférer en retirant la vitre tout en laissant ce dernier sur la plaque de porcelaine et enlever la partie supérieure à l'aide d'un spacer (Si le gel ondule mettre de la solution de transfert dessus)
5. Mettre sur le gel 2 morceaux de Whatman pré-imbibés de tampon de transfert
6. A l'aide d'un spacer, enlever les bulles d'air en passant ce dernier de gauche à droite et de bas en haut
7. Retourner le montage et enlever la plaque de porcelaine. (décoller le haut du gel avec la spatule métallique et retirer le reste du gel de la plaque sur le papier comme pour une peau de banane)
8. Déposer le montage sur l'éponge (étape 3)
9. Recouvrir le gel d'un morceau de nitrocellulose pré-mouillé avec la solution de transfert (faire un point au stylo en haut à gauche sur la mb)
10. Enlever les bulles d'air comme en 6.
11. Mettre sur ce montage 2 autres morceaux de papier Whatman pré-imbibés avec la solution de transfert
12. Faire de même pour les autres gels à transférer (étape 4 à 11)
13. Recouvrir avec une autre éponge pré-imbibée avec du tampon de transfert
Rabattre la plaque transparente du module de transfert et fermer l

14. Mettre la cage de transfert dans le réservoir contenant du tampon de transfert froid, le panneau noir du côté de la paroi identifiée par un bouton noir.
15. S'assurer que le réservoir est suffisamment rempli.
16. Mettre au fond du réservoir un petit barreau magnétique
17. Installer le montage dans le frigo vitré sur une plaque agitatrice.
18. Faire tourner le barreau magnétique.
19. Brancher l'appareil de transfert à un power supply
20. Conditions de transfert: 100 volts / 300 mA de 1h10 à 1h30

Coloration au rouge de Ponceau S

Ceci nous indiquera si le transfert a bien fonctionné (absence de bulles d'air) et que les échantillons sont quantitativement équivalents.

1. Démontez le système.
2. Placer les membranes dans de petits récipients de plastique contenant une solution de Ponceau S.
3. Laisser colorer environ 10 min avec agitation.
4. Enlever la solution de rouge de Ponceau S et rincer à l'eau du robinet.
5. Laver les membranes avec TBS-T pour 5 min. afin d'éliminer toute trace de Ponceau S

PS : utiliser uniquement la pince plate pour manipuler la membrane.

Immunodétection

1. Transférer les membranes dans de petits récipients de plastique contenant la solution de blocage (TBS-Tween 0.1 % / 5 % lait)
2. Incuber 60 min à température ambiante avec agitation lente
3. Transférer les membranes dans des sacs de plastique
4. Ajouter anticorps primaire (dilution appropriée selon spécification anticorps dans TBS-Tween 0.1% / 5% lait)
5. Incubation O/N à 4°C avec agitation sur Nutator
6. Laver les membranes : 4 X 10 minutes dans TBS-Tween 0.1%
7. Transférer les membranes dans des sacs de plastiques
8. Ajouter anticorps secondaire (dilution appropriée selon anticorps dans TBS-Tween 0.1% / 5% lait)
9. Laver les membranes : 4 X 10 minutes dans TBS-Tween 0.1%

PS : mettre la solution sur le côté des protéines et mettre le sac de plastique côté protéine en dessous lors de l'incubation.

Révélation ECL (avec kit Western lightning chemiluminescence reagent Plus de Perkin Elmer)

1. Retirer les membranes de la solution de lavage (reconstitué les mb)
2. Enlever le surplus de liquide en tenant à la verticale la vitre où les membranes sont posées sur un papier absorbant

3. Recouvrir les membranes avec solution ECL (voir mode de préparation - solutions utilisées) Mélange 1 :1, environ 4ml/mb
4. Incuber 2 min. à température ambiante
5. Enlever l'excès de solution ECL comme en 2.
6. Transférer les membranes dans pochette de plastique et enlever les bulles d'air à l'aide d'un papier mouchoir.
7. Mettre cette dernière dans une cassette pour autoradiographie recouverte de sarin
8. Dans la chambre noire : Exposer avec un film Hyperfilm ECL (1 à 2 min. pour test puis ajuster le temps pour un résultat adéquat)
9. Après l'exposition, laver les membranes dans TBS-Tween 0.1% 2X 10 min. avant stripping s'il y a lieu.

PS : 10 min pour faire la révélation