

Initiation au « Western blot »

Détection d'une protéine étiquetée 6-his à l'aide d'un anticorps anti-polyhistidine par SDS-PAGE puis Western blot

Il s'agit de montrer la présence d'une protéine étiquetée 6-his à l'aide d'un anticorps anti-polyhistidine par Western blot. Dans le cas d'espèce proposé, il s'agit de montrer la présence de his6-EGFP (voir travaux pratiques « purification de his6-EGFP (his6-tagged Enhanced Green Fluorescent Protein) à partir de *E. coli* transformé par la construction pET15-EGFP », fichier tp-gfp-tagpolyhishis.odt).

Note : ce document s'adresse à des étudiants en fin de formation en BTS Biotechnologies. Les questions de sécurité ne sont pas abordées dans ce document. Savoir gérer les questions de santé et de gestion des déchets liées au travail proposé est un pré-requis.

1. Etape d'électrophorèse SDS-PAGE

Pour la partie SDS-PAGE, voir travaux pratiques « purification de his₆-EGFP (his₆-tagged Enhanced Green Fluorescent Protein) à partir de *E. coli* transformé par la construction pET15-EGFP », fichier tp-gfp-tagpolyhishis.odt et « Manipulation d'initiation à l'électrophorèse de protéines en gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE) », fichier « tp_sdspage_base.odt ». Les dépôts étaient : marqueur de taille, extrait brut, extrait brut dilué au 1/10, fraction protéines non retenues, fraction protéines non retenues au 1/10, fraction EGFP purifiée concentrée vers 1g/L.

2. Semi-dry western blot transfer

This protocol describes the procedure for transferring protein from polyacrylamide gel onto membrane using semi-dry transfer method. (Note: It is recommended to transfer very large proteins by wet transfer other than semi-dry transfer).

0. Transfer buffer composition : 25 mM Tris, 192 mM Glycine, 20% methanol, pH 8,3 (3,03 g Tris, 14,4 g glycine, ddH₂O, 200 mL methanol, qsp 1L ddH₂O). Optional : add SDS 0,04% final.

1. Cut 12 sheets of whatman 3MM the same size as the PAGE gel. Soak whatman filter paper in transfer buffer for several minutes to 10 min

2.

Nitrocellulose membranes should be handled carefully and with gloves. Nitrocellulose membranes can be brittle and may crack or tear, especially when dry. Cut to the size of the SDS-PAGE gel. Slowly lower the membrane into 20% (v/v) ethanol and agitate briefly. The membrane will become translucent as it wets. Rinse the membrane with high purity water and equilibrate in transfer buffer for 5 minutes prior to use. Do not allow the membrane to dry out during processing. (If membrane does become partially dry, allow to dry fully, re-wet with 20% alcohol, exchange to buffer, and proceed. This extra alcohol step does not usually interfere with detection.)

Polyvinyliden Fluoride Membrane. Activation: Wet PVDF membrane in methanol for 15 seconds and then transfer to a container filled with ddH₂O for 5 min. Soak membrane in 1x transfer buffer for 10 min while preparing transfer sandwich. The binding of protein to PVDF is much more sensitive to SDS levels. Too much SDS can inhibit the protein's ability to bind to the PVDF and can, in fact, help proteins already bound to the membrane to slip off. SDS levels should never exceed 0.05% for PVDF.

3. Equilibrate also the gel in transfer buffer (15-20 min).

4. Place 6 absorbent pads on the anode (+) plate.

5. Carefully place the membrane on the saturated pads. Roll a clean glass pipette slowly and gently over the membrane in one direction to eliminate air bubbles that may exist between the pads and the membrane.

6. Place the gel on top of the membrane, rolling a glass pipette slowly and gently over the gel in one direction to eliminate air bubbles that may exist between the gel and membrane.

7. Place 6 absorbent pads on top of the gel, then place the cathode side (-) of the apparatus on top of the stack.

8. Insert the stack in the tank and add transfer buffer per the manufacturer's instructions.

Connect the tank to the power supply and start the transfer. Follow the manufacturer's recommendations for current*. Transfers are generally complete in 15-90 minutes.

For nitrocellulose membrane: after the transfer is complete, allow the membrane to air dry at room temperature. This helps the proteins to bind more strongly to the membrane, preventing loss during subsequent washes and detection steps.

Note * : 0,8 à 1,2 mA/cm², soit environ 50 mA pour un minigel, avec le matériel utilisé au lycée St Louis de Bordeaux.

3. Wet western blot transfer

This protocol describes the procedure for transferring protein from polyacrylamide gel onto membrane using a wet transfer method with a cassette system.

1.

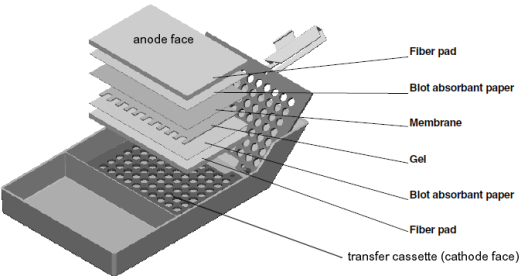
Nitrocellulose membranes should be handled carefully and with gloves. Nitrocellulose membranes can be brittle and may crack or tear, especially when dry. Cut to the size of the SDS-PAGE gel. Slowly lower the membrane into 20% (v/v) ethanol and agitate briefly. The membrane will become translucent as it wets. Rinse the membrane with high purity water and equilibrate in transfer buffer for 5 minutes prior to use. Do not allow the membrane to dry out during processing. (If membrane does become partially dry, allow to dry fully, re-wet with 20% alcohol, exchange to buffer, and proceed. This extra alcohol step does not usually interfere with detection.)

Polyvinyliden Fluoride Membrane. Activation: Wet PVDF membrane in methanol for 15 seconds and then transfer to a container filled with ddH₂O for 5 min. Soak membrane in 1x transfer buffer for 10 min while preparing transfer sandwich. The binding of protein to PVDF is much more sensitive to SDS levels. Too much SDS can inhibit the protein's ability to bind to the PVDF and can, in fact, help proteins already bound to the membrane to slip off. SDS levels should never exceed 0.05% for PVDF.

2. Equilibrate the gel in transfer buffer (15-20 min).

3. Fill the Blotter tank to about 50% of the fill volume with transfer buffer (0-4°C). (Connect with the cooling system or place an ice block (-20°C) in the dedicated location. Place a magnetic stir bar inside the tank.)

4. Set up the gel membrane sandwich :

	<p>Pour some chilled transfer buffer in the compartment and place the transfer cassette in the compartment of the gel/blot assembly tray. Cathode side (black) is laying horizontal. Place a fiber pad, <u>thoroughly wet</u>. Place a fiber paper piece on top of the fiber pad (it will wet immediately). Place the gel on top of the filter paper. Use roller to remove any air bubbles that may be trapped underneath the gel.</p> <p>Place the membrane on top of the gel taking care not to trap air. The membrane should not be adjusted once it touches the gel. Use roller to roll out bubbles.</p> <p>Place a wet fiber paper piece on top of the membrane.</p> <p>Wet a second fiber pad, <u>completely saturated</u> with transfer buffer. Then place on top of the second filter paper.</p>
--	--

5. Lock the cassette.

6. Move the locked cassette into the groove in the blotter tank (red side with red electrode = anode, black side with black electrode = cathode). Add the remaining transfer buffer to fill level. Turn on magnetic agitation.

Connect the tank to the power supply and start the transfer. 100V. Transfers are generally complete in 30-60 minutes.

For nitrocellulose membrane: after the transfer is complete, allow the membrane to air dry at room temperature. This helps the proteins to bind more strongly to the membrane, preventing loss during subsequent washes and detection steps.

4. Etapes de révélation des protéines (EGFP étiquetée poly-his) transférées

4.1 Réactifs

- Solution colorante de Rouge Ponceau S : 0,1 % (w/v) dans 5% acide acétique (v/v)
- Tampon TBS standard
- TTBS = TBS + 0.05 % tween 20
- Solution de lait écrémé à 4% en TBS
- Anticorps anti-polyhistidine monoclonal conjugué à la peroxydase (clone His-1), Sigma-aldrich A7058, dilution au 1/2000 en TTBS
- Solution de révélation de l'activité peroxydase (conservée à 4° C) 4-chloro-1 naphthol (0.5 mg.mL⁻¹ en TBS) + H₂O₂ (0,03%)(au dernier moment).

4.2 Coloration de la membrane au rouge ponceau

Immerger complètement la membrane (face marquée vers le haut) dans la solution colorante de rouge ponceau pendant 5 minutes sous agitation. Éliminer le colorant (récupérer dans la bouteille de stockage). Recouvrir d'eau distillée et observer la décoloration. Photographier. Sécher légèrement la membrane en la posant sur un papier absorbant quand la décoloration permet d'observer les protéines. Marquer à l'aide d'un stylo à bille les positions des protéines marqueurs de masses moléculaires.

Remarque : si on a utilisé un marqueur de masses moléculaires de type « coloré » (mais c'est plus cher ...), on peut visualiser le transfert du marqueur lors du démoulage du sandwich juste après l'électrotransfert.

4.3 Révélation d'une protéine étiquetée poly-histidine (anticorps anti-his6 conjugué à la POD)

- Incuber, sous agitation, 1 heures à température ambiante la membrane avec la solution de lait écrémé en TBS.
- Réaliser 2 lavages de 5 minutes avec 10 mL de TTBS.
- Placer en « enveloppe plastique scellée » (appareil à fil chauffant). Et incuber 1 heure 30 avec l'anticorps à température ambiante et sous agitation. (Eviter absolument les bulles d'air dans les zones à révéler !)
- Réaliser 2 lavages de 5 minutes avec 10 mL de TTBS.
- Réaliser un dernier lavage de 5 minutes avec 20 mL de TBS.
- Incuber avec 10 mL de solution de révélation.
- Arrêter la révélation quand la coloration vous semble convenable en éliminant le substrat et en ajoutant de l'eau distillée.
- Laisser sécher ensuite la membrane à l'abri de la lumière (coloration photosensible). Photographier.

5. Compte-rendu

Expliquer le rôle et l'importance de chacune des étapes de révélation et des réactifs utilisés. Réaliser un schéma général de la révélation à l'échelle moléculaire

Dans la plupart des « western blots », on utilise des révélations indirectes (avec 2 anticorps). Expliquez en quoi cela consiste. Quel est l'intérêt ?

Tracer le graphe d'étalonnage du gel permettant de déterminer les masses molaires des protéines révélées.

Analyse qualitative de la révélation.

Superposer les images obtenues lors de la coloration au rouge ponceau et lors de la révélation par les anticorps. Conclure.

Bibliographie

la partie en langue anglaise des modes opératoires est adaptée de :

<http://www.strgen.org/protocols/western.pdf>

[http://openwetware.org/wiki/Western_Blot_\(immunoblot\)](http://openwetware.org/wiki/Western_Blot_(immunoblot))

<http://www.pall.com> (doc. Technique western blotting)

<http://www.bio-rad.com> (doc. Technique western blotting)