

Coloration de l'activité enzymatique des complexes séparés en gel natif :

(pour un article récent, voir Sabar 2005, Plant J.)

En fin de migration, un gel natif peut être coloré par le bleu de Coomassie, au nitrate d'argent, par western blot et par différentes colorations qui utilisent l'activité enzymatique de chacun des complexes séparés en conditions natives.

Rq : L'activité des complexes est diminuée par la présence du colorant G250 lors des expériences de BN-PAGE. L'activité des complexes est donc plus facilement révélée après un CN-PAGE (sans colorant).

Complexe I : NADH:ubiquinol oxydoreductase

On révèle l'activité NADH:NBT oxydoreductase

Tris 5 mM, pH 7,4	0,303 g de Tris pour 500 ml
Nitrobleu tetrazolium (NBT) 1 mg/ml	10 mg pour 10 ml
NADH 0,2 mM	1,6 mg pour 10 ml

La coloration se développe rapidement (dès 5' pendant plus de 3 heures...). Dans les conditions que j'ai testé (membranes d'hépatocyte solubilisées par la digitonine ou le DDM, analysées en CN-PAGE), cette activité ne semble pas sensible à la roténone.

Complexe II : succinate déshydrogénase

on révèle l'activité succinate : PMS : NBT oxydoreductase.

La réduction du NBT par les électrons issus du complexe II est fortement augmentée par l'utilisation du PMS comme accepteur/donneur d'électron intermédiaire entre succinate et NBT.

Tris 5 mM, pH 7,4	0,303 g de Tris pour 500 ml
Nitrobleu tetrazolium (NBT) 1 mg/ml	10 mg pour 10 ml
Succinate de sodium 20 mM	200 µl à 1 M
Phenazine methosulfate (PMS) 0,2 mM	10 µl à 0,2 M

Complexe III :

Pour l'instant, pas de coloration sérieuse disponible. On trouve qq chose dans la publication de Wittig et coll. 2007 MCP mais je trouve ça bof...

Complexe IV : Cytochrome c oxydase

On révèle l'activité CytC : DAB oxydoreductase

MOPS 100 mM, pH 8 ou Tris 5 mM, pH 7,4	10,45 g pour 500 ml 0,303 g de Tris pour 500 ml
Diaminobenzidine (DAB) 0,5 mg/ml	5 mg pour 10 ml
Cytochrome C 0,05 mM	100 µl à 5 mM (59 g/l) pour 10 ml

Cette activité produit des bandes brunes en 30' minimum. Elle est partiellement sensible à l'addition de KCN 4 mM.

Complexe V : F1F0-ATP synthase

On révèle l'activité ATPasique. Le Pi produit au cours de cette réaction précipite en présence de plomb à **pH=8,4 (pH important)**. Il se forme ainsi un précipité de phosphate de plomb à l'endroit où il y a une activité ATP asique. L'utilisation de Triton x-100 dans le tampon permet de décrocher l'inhibiteur IF1.

Solution stock : Vf = 500 ml

Glycine 50 mM	1,88 g
MgCl ₂ 5 mM	0,238 g
Triton x-100 0,1 % (m/v)	0,5 g

Au dernier moment, ajouter 50 mg d'acétate de plomb (TOXIQUE) à 100 ml de cette solution stock. L'acétate de Pb est relativement insoluble. Tant pis. Ajuster à pH = 8,4 avec NaOH (!!! faible pouvoir tampon de la glycine !!!). Incuber le gel avec 50 ml de cette sauce. Remplacer ce premier bain par 50 ml de la même sauce additionnée de 2 ml d'ATP 0,1 M, pH=7.