

Séparation de complexes et supercomplexes protéiques par Gels Natifs du type Blue Native ou Clear Native : BN-PAGE et CN-PAGE (Schägger 1991, Wittig 2006)

Electrophorèses en condition non-dénaturante (ni SDS ni β -mercaptoethanol) : les protéines conservent leur structure "native" (structure tertiaire, quaternaire et quaternaire). Elles conservent donc *a priori* leur activité, qui pourra être révélée dans le gel.

L'étude de protéines membranaires telles que les complexes des OXPHOS (complexes I à IV et F1F0-ATP synthase) nécessite leur extraction de la membrane dans laquelle ils sont ancrés >> choisir/tester le détergent adapté (les plus courants sont le Triton x-100, DDM ou digitonine).

Les protéines sont chargées négativement par : 1/ un colorant anionique, le Coomassie G250 ("Serva Blue G"), cousin du Coomassie R250 (cas des BN-page) ou bien 2/ par leur charge intrinsèque (CN-page).

Un gradient d'acrylamide est nécessaire pour augmenter la résolution du gel : les complexes et supercomplexes sont arrêtés lorsque les mailles du gel sont "plus petites que leur taille". En fonction des complexes natifs étudiés, on ajuste le T% du gradient. Pour les complexes des OXPHOS, on utilise des gradients de 3 à 13 %.

rappel : $T\% = (m_{\text{acryl.}} + m_{\text{bisacryl}}) / 100$ (exprimé en g/100ml)

$$C\% = m_{\text{bisacryl}} / (m_{\text{acryl}} + m_{\text{bisacryl}})$$

MATERIEL :

- Plaques Mini-protean (Biorad): bien nettoyer, **éliminer toute trace de détergent**.
- Faiseur de gradient (Hoefer) et un tubule adapté, terminé par une pointe de seringue
- Pompe péristaltique
- Agitateur magnétique et un tout petit barreau.
- Solutions stocks (conservées à 4°C) :

Tampon natif 3X : Vf = 100 ml

6-aminocaproic acid 1,5 M	19,68 g
Immidazole 75 mM	0,51 g
HCl	pH = 7 à 4°C \Leftrightarrow pH = 6,7 à TA

Mélange acrylamide/bis-acrylamide (AB) :

POUDRE NEURO-TOXIQUE

C% = 3 >> Contrairement aux protocoles classiques de gel d'acrylamide, les solutions commerciales ne sont pas utilisables car le C% n'est pas bon.

Mélange T% = 33, C% = 3 : Vf = 100 ml; 50 ml Bis-acrylamide 2 % (solution commerciale, placard BM) + acrylamide 32 g.

Tampons de migration :

<i>Anode</i>	<i>Vf = 2000 ml</i>	<i>Cathode</i>	<i>Vf = 1000 ml</i>
Immidazole 25 mM	3,04 g	Immidazole 7,5 mM	0,510 g
		Tricine 50 mM	9,0 g
		Coomassie G250 0,02 %	50 mg pour 250 ml
HCl	pH = 7 à 4°C \Leftrightarrow pH = 6,7 à TA	HCl	pH = 7 à 4°C \Leftrightarrow pH = 6,7 à TA

Pour les expériences de BN-page, ajouter au dernier moment 0,02 % (m/v) du colorant G250 dans le tampon cathodique. Chauffer une partie de la solution au micro-ondes pour aider la dissolution de la poudre. Puis laisser refroidir à 4°C.

COULER LE GRADIENT :

<i>T% final</i>	bas du gradient			haut du gradient et stacking		
	16,5	13	10	5	4	3
<i>Mélange AB (T%=33) (ml)</i>	2,5	2	1,52	0,76	0,61	0,45
<i>Tampon natif 3X (ml)</i>	1,67	1,67	1,67	1,67	1,67	1,67
<i>Glycerol (g)</i>	1	1	1	/	/	/
<i>Eau mQ (ml)</i>	/	0,5	1	2,57	2,75	2,88
<i>Vf (ml)</i>	5			5		
<i>APS 10 % (µl)</i>	12,5			16,3		
<i>TEMED (µl)</i>	1,25			1,63		

Attention au mélange délicat du glycérol à la solution. Refroidir les solutions 10' dans la glace. De même, le faiseur de gradient est laissé à 4°C au frigo avant de l'utiliser (le froid retardera la polymérisation de l'acrylamide, nécessaire pour couler le gradient tranquillement).

Prélèver **4,7 ml de solution «haut du gradient»**, déposés dans la chambre « 2 » du faiseur de gradient. Chasse la bulle d'air entre les deux chambres. Puis ajouter **4,4 ml de solution «bas du gradient» dans la chambre « 1 »**. Vérifier l'horizontalité du faiseur de gradient. Lancer l'agitateur magnétique (barreau dans la chambre " 1 "). Ouvrir les robinets, et démarrer la pompe péristaltique à **250 rpm¹**.

Le gradient se coule en ~10 minutes.

A la fin, on dépose **délicatement** avec la pompe de l'eau en surface du gel (pompe à la vitesse minimum pour ne pas perturber le haut du gradient, très fragile).

Polymérisation en 2-3 h.

Couler le stacking + peigne ensuite.

PREPARATION DES ECHANTILLONS pour l'analyse des complexes OXPHOS

Tampon d'extraction (Arnold 1998) :

	<i>Pour 100 ml de solution :</i>
<i>NaCl 50 mM</i>	292 mg
<i>Immidazole 50 mM</i>	340 mg
<i>Ac. aminocaproïque 2 mM</i>	26,2 mg
<i>EDTA 1 mM</i>	200 µl à 0,5 M
<i>Glycérol 10 % (m/v)</i>	10 g
<i>pH = 6,7 à 24°C <=> pH ~ 7 à 4°C</i>	ajuster pH puis volume à 100 ml
<i>Inhibiteurs de protéases</i>	cocktail commercial ajouté au dernier moment

1/ A partir de mitochondries (fraîches ou congelées) :

Pour des volumes confortables, prévoir 0,5 mg de protéines mito pour une piste (limite inférieure ~ 0,1 mg de protéines par piste)

suspension mitochondriale > centrifugation (10.000 rpm, 7', 4°C) pour obtenir un culot dont on connaît la quantité de protéines

mitochondries culottées (0,5 mg protéines totales)

+ 50 µl du détergent (DDM 1-4%, digitonine 2-8% dans du tp extraction)

Solubilisation : 20' à 4°C puis centrifugation : 30' à 20.000 g. Récupérer le surnageant.

¹pas plus sinon on perturbe le gradient...

2/ A partir d'hépatocytes : Prévoir 2 mg de poids humide pour une piste.

Culot de 2 mg.

+ 200 µl de tampon d'extraction +PMSF 1 mM

Briser les membranes des cellules par 3 cycles de congélation/décongélation puis centrifuger 10' à 15.000 g >>> Culot

+ 20 µl de tampon d'extraction + PMSF 1 mM + détergent (DDM 1-4%, digitonine 2-8% dans du tp extraction)

Solubilisation : 20' à 4°C puis centrifuger 30' à 20.000 g

DEPOT DES ECHANTILLONS :

Pour les expériences de BN-page, les surnageants sont additionnés de Coomassie **G250** 5% à raison de 1/20 (v/v). Dépôts de 5 à 20 µl pour les mini-gels (~50 à 100 µg).

HIGH MOLECULAR WEIGHT MARKERS :

Thyroglobuline (669 kDa), Apoferritine (443 kDa) et BSA (monomère et dimère : 66 et 132 kDa) : 350 µg de chaque protéine, QSP (buffer + glycerol) 350 µl (total PN concentration : 3 µg/µl)

Ajouter 1 µl de bleu G250 5% pour 20 µl du mélange. Charger 5 à 10 µl.

MIGRATION : 2 ou 4 mini-gels : 1 heure à 50 V constant puis 300V jusqu'à la sortie du colorant G250 (toujours prévoir au moins une piste avec ce colorant pour marquer le front de migration)

COLORATIONS :

1. bleu de coomassie ou nitrate d'argent (10 fois plus sensible)
2. par l'activité (complexes 1, 2, 4 et 5 des OXPHOS : cf protocole activités dans un gel natif)
3. par western blot

REMARQUES :

1/ on peut remplacer l'imimidazole par du Bis-tris, deux fois plus concentré. La résolution des gels peut être meilleure ou au moins différente... La migration est plus lente avec le Bis-tris.

Dans ce cas :

Tp 3X : 6-aminocaproic acide 1,5 M, Bis-tris 150 mM, pH=7 à 4°C

anode : Bis-Tris 50 mM (10,4 g/l), pH=7 à 4°C

cathode : Bis-tris 15 mM (0,51 g/l), Tricine 50 mM (9 g/l), pH=7 à 4°C

2/ on peut utiliser les systèmes Biorad Protean II. Pour le gradient, prévoir un gradient de 24 ml (gel de 1 mm d'épaisseur), avec 11,5 de solution " bas de gradient " et 12,5 ml de solution " haut du gradient ". La migration a lieu sur la nuit (1 heure à 100 V constant puis une nuit à 150 V).

RÉSULTAT D'UN BN-PAGE :

Hépatocytes (congelés/décongelés 3x, centrifugés pour récupérer les membranes) puis solubilisées par un détergent. Analyse en BN-page.

