

TD de Biochimie 4 :

Coloration.

Synthèse de l'expérience 2

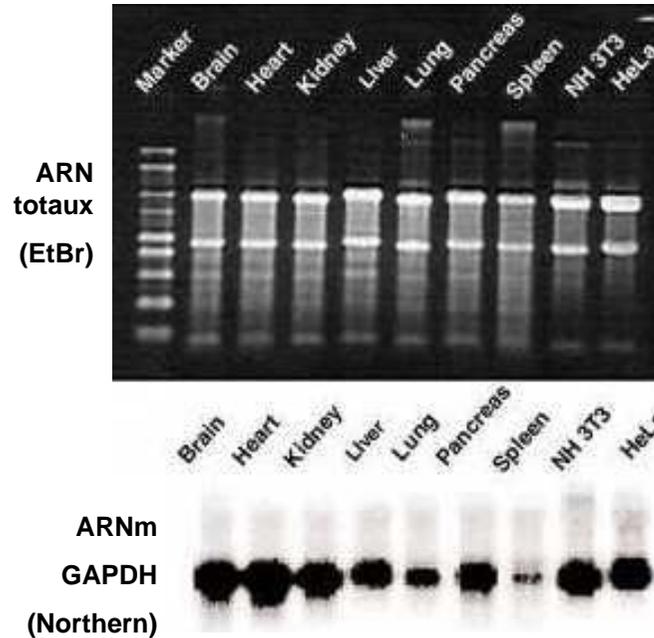
- ❖ Les questions posées durant l'expérience 2

- ❖ Exposé sur les méthodes de coloration des molécules :
 - **Générique**
 - **Spécifique**
 - **Autres**

Questions

- Pourquoi effectuer un marquage radioactif alors qu'une coloration peut être effectuée ?
- Comment détecter spécifiquement une protéine ou un ADN, dont la séquence est connue, parmi d'autres protéines ou ADN, après séparation par électrophorèse ?

La coloration peut être :



<http://www.sigmaaldrich.com>

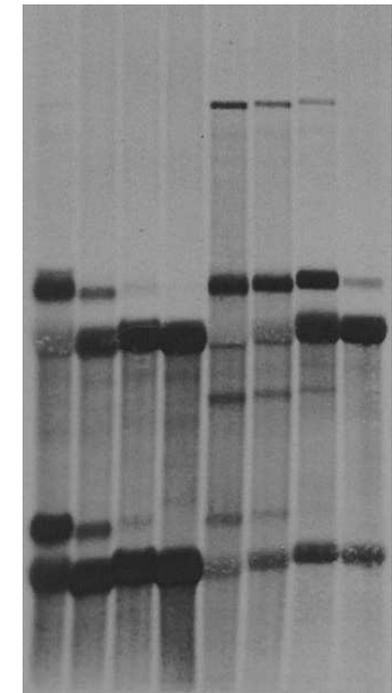
- **Générique** (*colore toutes les protéines ou tous les acides nucléiques*)

- **Sélective** (*marque une molécule spécifique*)

- **Autre** (*p.ex. Les ARNr méthylés en cours de maturation*)

ARNr méthylés (Pulse-chase)

0' 2' 5' 15' 0' 2' 5' 15'



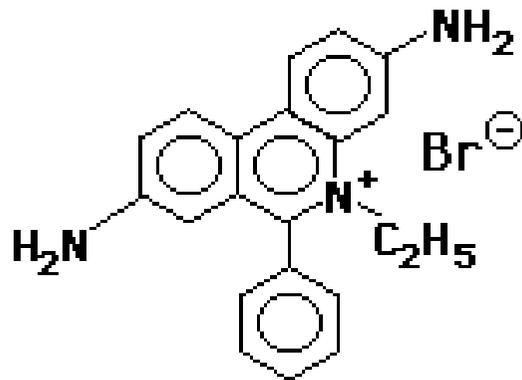
Coloration générique des acides nucléiques

Le bromure d'éthidium :

S'intercale entre les bases

( mutagène)

Fluorescent sous UV



Ethidium
Bromide



<http://www.vib.be/VIB/EN/>

© 2002 - 2005, VIB

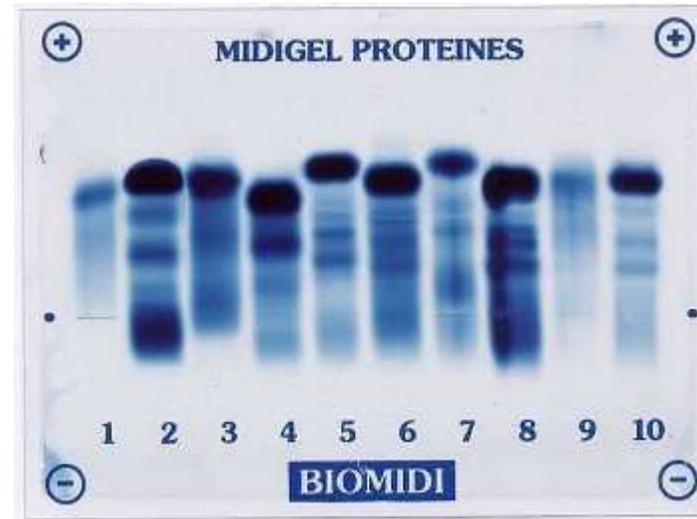
Coloration générique des protéines

Bleu de coomassie :

Fixe les protéines de manière non-spécifique.

Visible à l'œil nu (colorant bleu)

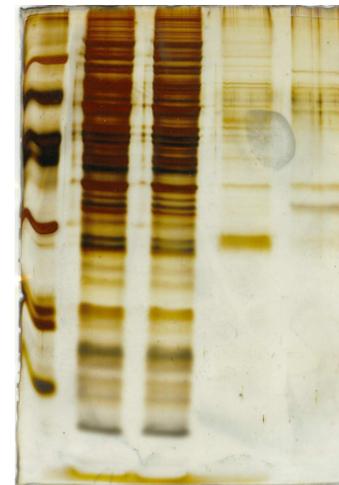
Sensibilité : ~100 [ng] de protéines



Sels d'argent :

Similaire au bleu de coomassie mais avec une meilleure sensibilité :

0.1 - 1 [ng] de protéines



↑
Electrophorèse de Serums

←
Electrophorèse de différentes étapes de purification par chromatographie d'affinité.

Marquage spécifique des acides nucléiques : *Southern (ADN) et Northern (ARN)*

Rappel :

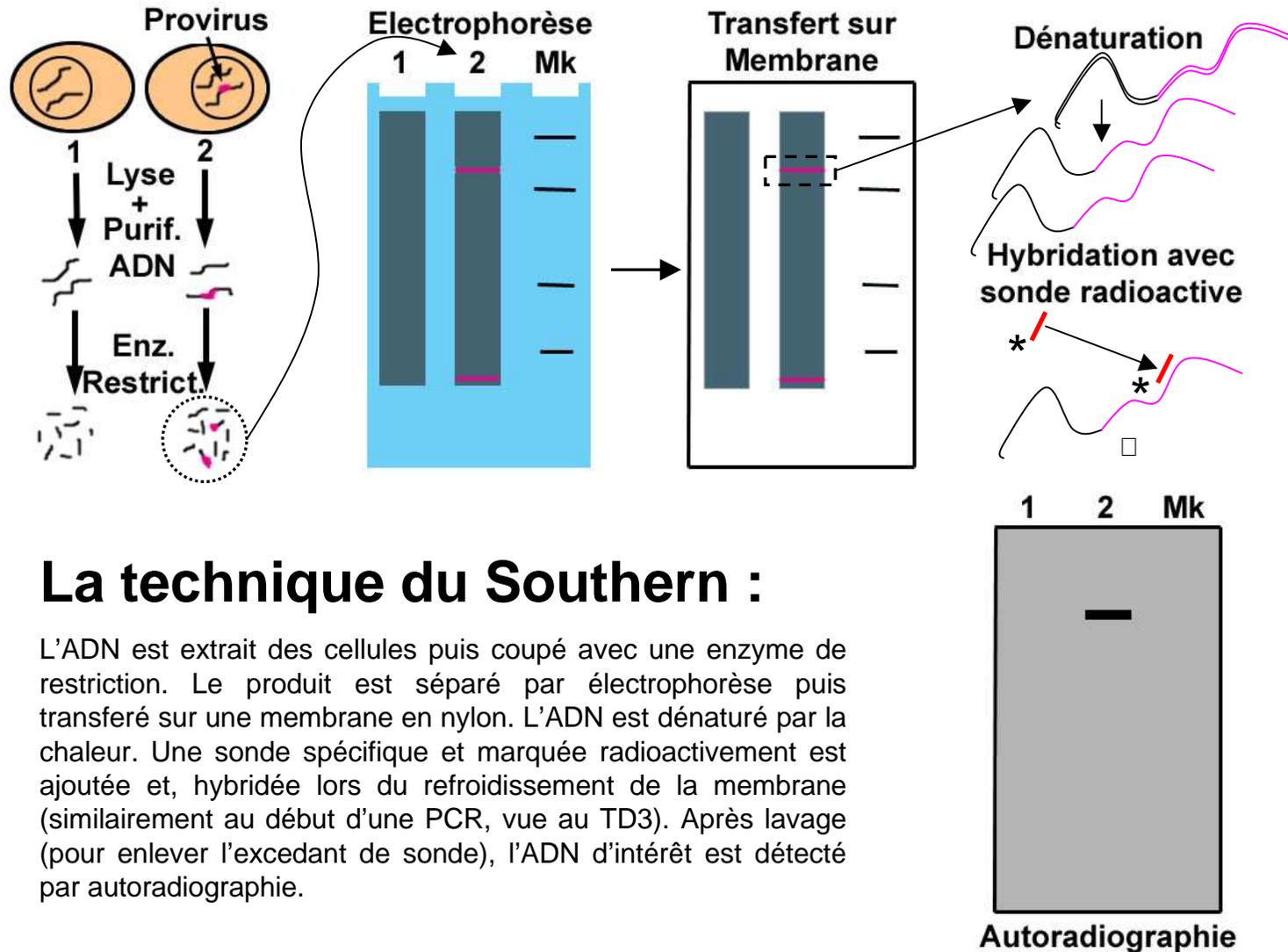
L'ADN et l'ARN sont capables de s'assembler spécifiquement (selon leur séquence) sous forme bicaténaire. En augmentant la température, il est possible de séparer les deux brins (dénaturation) et, en redescendant la température, les brins **s'hybrident selon la complémentarité de leur séquence.**

Le principe :

Une **sonde** d'hybridation **marquée** (p.ex. un oligonucléotide marqué radioactivement) et de **séquence spécifique**, s'hybride spécifiquement à l'acide nucléique cible.

Marquage spécifique des acides nucléiques :

Exemple : *Southern* (ADN)



La technique du Southern :

L'ADN est extrait des cellules puis coupé avec une enzyme de restriction. Le produit est séparé par électrophorèse puis transféré sur une membrane en nylon. L'ADN est dénaturé par la chaleur. Une sonde spécifique et marquée radioactivement est ajoutée et, hybridée lors du refroidissement de la membrane (similairement au début d'une PCR, vue au TD3). Après lavage (pour enlever l'excédant de sonde), l'ADN d'intérêt est détecté par autoradiographie.

Marquage spécifique d'une protéine :

Western, immunoelectrophorèse

Le principe :

Un anticorps spécifique pour un épitope (partie de protéine) donné, se fixe spécifiquement à sa cible, qui peut ainsi être détectée (p.ex formation d'un précipité blanc).

Western :

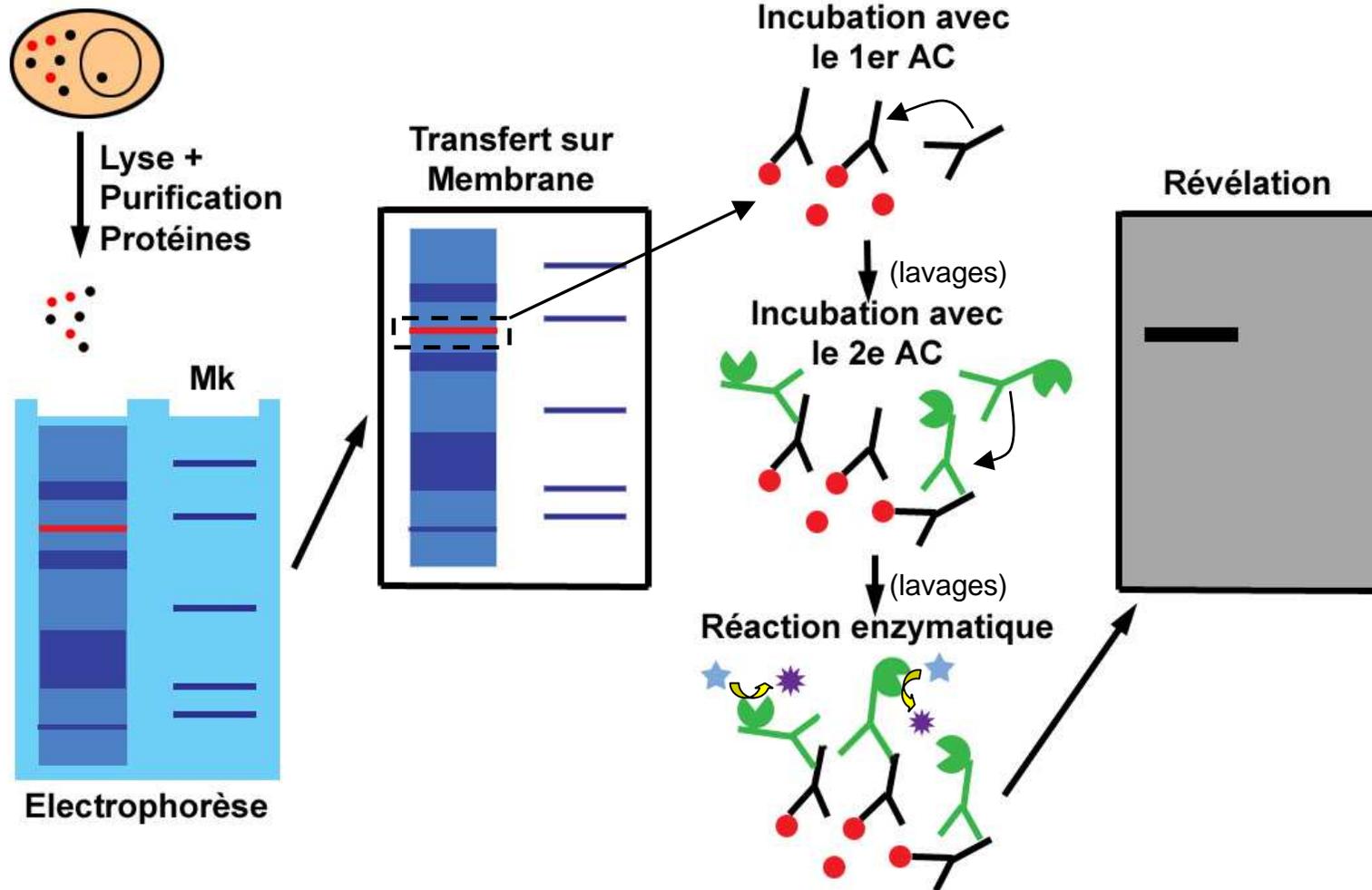
Un premier anticorps (AC) reconnaît spécifiquement la protéine d'intérêt.

Un second AC reconnaît spécifiquement le premier AC et, est lié à une enzyme (AP, HRP). Le substrat de l'enzyme est ajouté et la réaction chimique révèle indirectement la position de la protéine.

Pourquoi utiliser deux anticorps et une enzyme ?

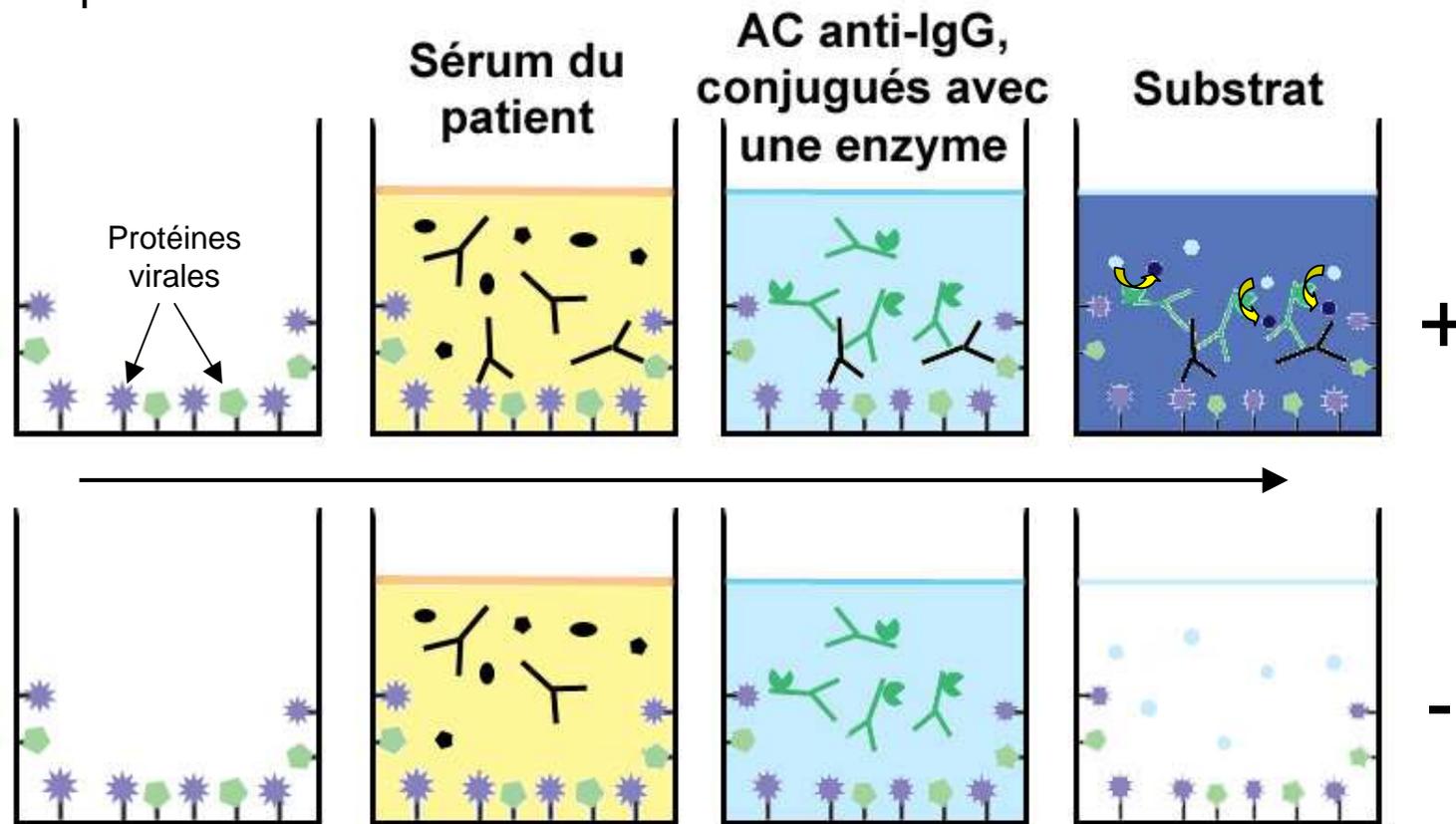
⇒ Amplification du signal.

Marquage spécifique d'une protéine : *Western blot*



Détection spécifique d'une protéine : *Test Elisa*

Petite parenthèse sur un test très utilisé en médecine et dont le mécanisme est très similaire au Western. Il existe plusieurs variantes mais voici notamment celle appliquée pour le test de seropositivité au VIH.

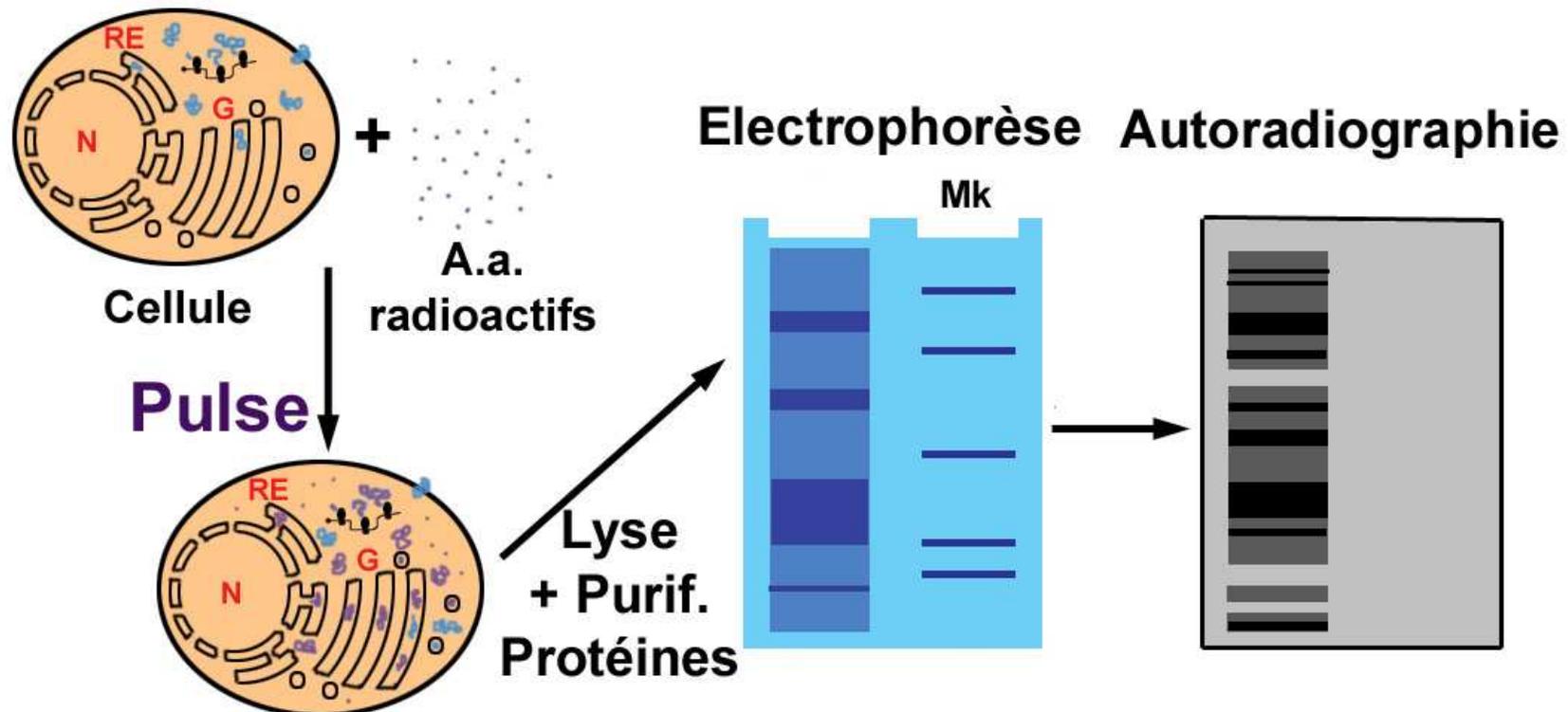


Note : Chaque étape est séparée par des lavages (pour enlever les protéines non-liées)

Marquage de protéines nouvellement synthétisées

Pulse :

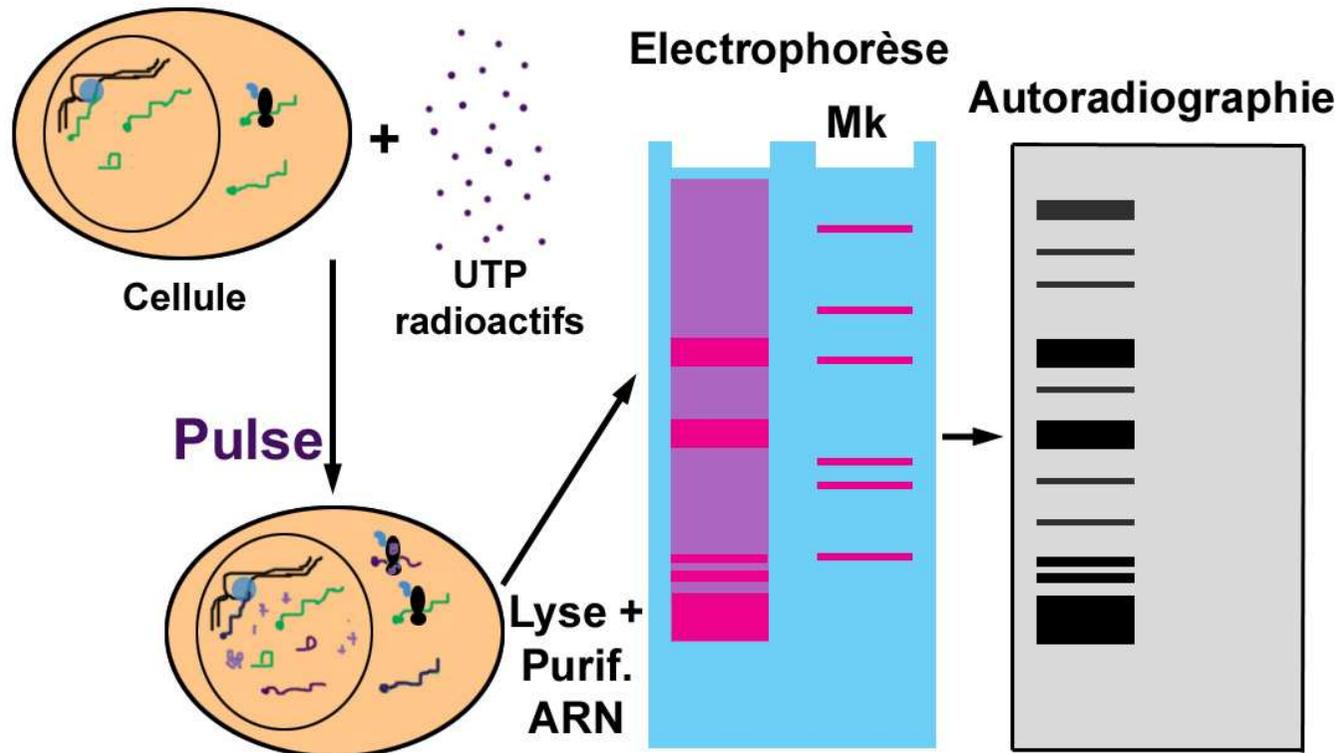
- marquage *in vivo* (avant extraction des protéines)
- par des acides aminés marqués : *par exemple* avec un isotope radioactif (^{35}S : Met, Cys ; ou ^{14}C : tous les aa)



Marquage des acides nucléiques nouvellement synthétisés

Pulse :

- marquage *in vivo* (avant extraction des ADN/ARN) ou *in vitro* (p.ex lors de la création d'ADNc)
- par de l'UTP ou des dNTP marqués : *par exemple* avec un isotope radioactif (le phosphate α du nucléotide tri-phosphate est composé de ^{32}P)



Marquage par phosphorylation

- marquage *in vivo* (marquage en conditions naturelles) ou *in vitro* (artificiellement avec des enzymes purifiées) de protéines pouvant être phosphorylées (ou d'acides nucléiques : 5' Phosphate).
- avec de l'ATP dont le phosphate γ contient du ^{32}P

Marquage par glycosylation

- P.ex : Marquage *in vivo* de protéines pouvant être glycosylées, avec un Mannose marqué.

Etc...