

TP DE BIOCHIMIE - L2 - S4BG2 (J. BOVE / F. MONTRICHARD)

Purification de la calmoduline de feuilles de plantules de pois de 3 semaines

JOUR 1

1 – Extraction des protéines solubles

Mettre le bain-marie à chauffer à 90°C.

- Prélever 50 feuilles de plantules de pois (20 °C ; 3 semaines ; 16 h lumière/8 h obscurité) soit environ 1,5 g et les broyer dans un mortier avec 10 ml de tampon d'extraction (Tris-HCl 30 mM, pH 7,5 ; EGTA 5 mM) en présence de PVP insoluble (une pointe de spatule) et de 50 µl de DTT 1 M.
- Transférer l'homogénat dans un tube à centrifuger de 40 ml. Equilibrer les tubes 2 à 2 et centrifuger 20 min x 15000 g x 4°C (Sigma – rotor 12156). Prélever le surnageant (S1) dans une éprouvette, mesurer son volume puis le transférer dans un bécher en verre. Faire un prélèvement d'un aliquote de fraction S1 de 300 µl dans un tube eppendorf orange, noter votre numéro de binôme/trinôme sur le couvercle et le placer dans de la glace.

2 – Dénaturation à la chaleur des protéines thermosensibles

- Incuber le bécher à 90 °C pendant 10 min pour dénaturer les protéines thermosensibles, puis transférer son contenu dans un tube à centrifuger de 40 ml propre et centrifuger 10 min x 15000 g. Prélever le nouveau surnageant (S2) dans l'éprouvette et mesurer son volume. Faire un prélèvement d'un aliquote de fraction S2 de 300 µl dans un tube eppendorf bleu, noter votre numéro de binôme/trinôme sur le couvercle, et le placer dans la glace.

3 – Purification de la calmoduline sur phénylsépharose (deux colonnes de chromatographies pour toute la salle)

- Equilibrer le gel de phénylsépharose, placé à l'intérieur de chacune des deux colonnes de chromatographie, à l'aide de 5 ml de tampon A (= Tris-Cl 30 mM, pH 7,5 ; CaCl₂ 10 mM), un tampon qui permettra l'adsorption de la CaM sur le gel.
- Calculer le volume de CaCl₂ 250 mM à ajouter dans S2 afin que la concentration finale de CaCl₂ soit 10 mM.
- Dans deux éprouvettes, réunir les fractions S2 provenant des binômes/trinômes 1 à 5 (éprouvette 1) et 6 à 10 (éprouvette 2) et mesurer les volumes. Filtrer le contenu de chaque éprouvette dans une colonne vide et le déposer sur une des deux colonnes de phénylsépharose en récupérant les protéines non fixées sur le gel dans un bécher en plastique placé sous la colonne.
- Laver la colonne avec 10 ml de tampon A, puis 3 ml de tampon B (= Tris-Cl 30 mM, pH 7,5) en récupérant les fractions de lavage dans le même bécher en plastique.

- Numéroté des tubes eppendorf blancs de E1 à E5.
- Eluer la calmoduline avec le tampon C (= Tris-Cl 30 mM, pH 7,5 ; EGTA 10 mM) par fractions de 0,5 ml dans les tubes eppendorf E1 à E5.
- Congeler à – 20 °C les aliquotes des fractions S1 et S2 et les fractions éluats E1 à E5.

4 – Dosage des protéines

- Mettre le bain-marie à chauffer à 90°C
- Préparer les échantillons à doser :

Pour cela, faire des dilutions de S1 (dilution 20) et S2 (dilution 5) en tubes à hémolyse.

Noms des tubes	S1D20	S2D5
S1	50	---
S2	---	50
H ₂ O	950	200
Volume final (en µl)	1000	250

Répartir 200 µl de S1D20, S2D5 ou des éluats E1 à E5 non dilués dans des tubes eppendorf blancs (les éluats E1 à E5 communs à 5 binômes/trinômes seront dosés par un seul binôme/trinôme).

Nom des tubes	S1D20	S2D5	E1	E2	E3	E4	E5
DO _{595 nm}							

- **Préparer une gamme étalon d'albumine (BSA) dans des tubes eppendorf blancs.**

N° des tubes de la gamme	T0	T1	T2	T3	T4	T5
Albumine (µg/tube)	0	4	8	12	16	20
Albumine à 400 µg/ml (µl)	0	10	20	30	40	50
H ₂ O (µl)	200	190	180	170	160	150
DO _{595 nm}						

- Quand les 8 tubes ou 13 tubes (pour le binôme qui dose les protéines dans les éluats) sont prêts (essais et gamme étalon), ajouter 800 µl de réactif BioRad, attendre 5 min puis lire la DO à 595 nm.

5 – Analyse de S1, S2 et d'un éluat de chromatographie sélectionné après séparation des protéines par électrophorèse en gel de polyacrylamide

- **Mettre des gants** et couler un gel de polyacrylamide 15 % à partir des solutions de séparation et de concentration préparées dans des béchers en verre.

	Gel de séparation 15 %	Gel de concentration 6 %
H ₂ O	3,0 ml	3 ml
Glycérol 80 %	1,5 ml	-----
Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8 ; SDS 0,4 %	2,5 ml	-----
Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 ; SDS 0,4 %	-----	1,25 ml
Acrylamide/bisacrylamide 40 % (37,5/1) toxique	3,0 ml	0,75 ml
	Juste avant de couler les solutions dans la cuve	
TEMED	15 µl	8 µl
Persulfate d'ammonium 40 %	15 µl	8 µl
Volume final	10 ml	5 ml

Le glycérol permet d'augmenter la densité de la solution de séparation. Ainsi, on peut couler entre les deux plaques de verre successivement la solution de séparation puis la solution de concentration (moins dense) sans que les deux solutions ne se mélangent.

- Insérer un peigne de 10 puits dans la solution de concentration.
- Préparer les échantillons à déposer dans des tubes eppendorf jaunes.

Echantillons	S1	S2	E1
	20 µl	20 µl	20 µl
Tp de charge x 5	5 µl	5 µl	5 µl

10 ml de tampon de charge sont préparés de la façon suivante : 1,75 ml de Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 ; 6,25 ml de glycérol 80 % ; 1 ml de SDS 20 % ; 1 ml de bleu de bromophénol 1 %.

Les échantillons sont incubés à 90°C pendant 3 min.

- Préparer du tampon d'électrophorèse x 1 à partir du tampon d'électrophorèse x 10 (Glycine 1M ; Tris 0,25 M ; SDS 1 %).
- Quand le gel est polymérisé, le placer dans l'appareil à électrophorèse et ajouter le tampon d'électrophorèse x 1, puis déposer les échantillons ainsi que 10 µl de protéines de référence. Faire migrer les protéines à 200 V x 1 h.
- Colorer le gel. Pour cela, en utilisant un micro-ondes, faire bouillir 3 fois le gel dans 20 ml d'H₂O puis 3 fois dans 20 ml de solution de colorant « Simply blue » (W3222D ; Fisher). Puis décolorer le gel dans de l'eau.

JOUR 2

- Remplir le tableau récapitulatif et analyser tous les résultats

TABLEAU RECAPITULATIF

Nb total de feuilles :		
	Volume total (ml)	Quantité totale de protéines (mg)
S1		
S2		
E1		
E2		
E3		
E4		
E5		

