

Plateau de Protéomique de l'IBPC  
13, Rue Pierre et Marie Curie  
75005 Paris



Version 2

Mars 2015

## Abréviations

**$\alpha$ -CHCA** : acide  $\alpha$  -cyano-4-hydroxycinnamique

**AMBIC** : ammonium bicarbonate

**DTT** : dithiothréitol

**FA** : acide formique

**IAM** : iodoacétamide

**RT** : température ambiante

**SINAP** : acide sinapinique (3,5-diméthoxy-4-hydroxycinnamique)

**TFA** : acide trifluoroacétique

## **Avant-propos**

Afin de limiter la contamination des échantillons par les kératines (humaines et/ou animales), il est nécessaire de respecter certaines règles. Tout au long de la préparation des échantillons (et même en amont de l'analyse par spectrométrie de masse si possible), il est recommandé d'utiliser les produits les plus purs disponibles commercialement. Il est également recommandé de limiter la poussière dans l'environnement de travail en nettoyant préalablement la paillasse à l'éthanol, en limitant les courants d'air susceptibles de mettre de la poussière en suspension, en travaillant éloigné de toute zone de passage et en éteignant la climatisation. Il est vivement conseillé de travailler avec gants non poudrés, de porter une blouse fermée et de tenir éloigné de la paillasse tout vêtement en laine.

Afin d'éviter des contaminations avec les polymères et plastifiants, il est conseillé également de stocker dans la mesure du possible les réactifs dans des récipients en verre plutôt qu'en plastique (surtout si ils contiennent des solvants organiques). En ce qui concerne les micro-tubes, on pourra privilégier ceux de la marque Treff.

## Coloration au nitrate d'argent

Protocole Fast Silver Nitrate de Rabilloud *et al.* (Electrophoresis, 1992, 13 :429-39) correspondant au protocole de Blum *et al.* (Electrophoresis, 1987, 8 :93-99) avec modifications. Il est compatible avec une analyse par spectrométrie de masse.

*Les quantités énoncées dans les notes 2 & 3 sont suffisantes pour 2 grands gels bidimensionnels. Pour 2 petits gels, diviser les quantités par 4.*

### Procédure

1. Fixation du gel : 1 heure dans une solution d'éthanol 30% et d'acide acétique 10% **ou** Toute la nuit dans une solution d'éthanol 30% (v/v) et d'acide acétique 5% (v/v).
2. Lavage du gel dans une solution d'éthanol 20% pendant 10 min.
3. Lavage du gel dans une solution d'éthanol 10% pendant 10 min.
4. Lavage du gel dans de l'eau distillée pendant 10 min. Répéter l'opération.
5. Sensibilisation pendant 1 min par une solution de thiosulfate de sodium à 0,02% (w/v) (Note 1).
6. Lavage du gel dans de l'eau distillée pendant 1 min. Répéter l'opération.
7. Incubation du gel dans une solution de nitrate d'argent à 0,212% (w/v) pendant 30 min (Note 2).
8. Lavage du gel dans de l'eau distillée pendant 15 secondes.
9. Développement de la coloration dans une solution contenant du carbonate de sodium 3 %, du thiosulfate de sodium 0.00125% (w/v) et de la formaline 0.03% (v/v) (Note 3).
10. Arrêt de la coloration par une solution d'acide acétique à 5% (v/v) pendant 30 min.
11. Rinçage du gel dans de l'eau distillée pendant 30 min.

**Note 1 :** 0.8 mL de thiosulfate de sodium (pentahydrate) 10 % (w/v) + H<sub>2</sub>O dd QSP 400mL.  
(soit une concentration de 0.8 mM)

**Note 2 :** 850 mg de nitrate d'argent dissous dans 400 mL d' H<sub>2</sub>O dd.

**Note 3 :** 12 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + H<sub>2</sub>O dd QSP 400mL. Ajouter extemporanément 50 µL d'une solution de thiosulfate de sodium 10% (w/v) et 120 µL de formaline (solution de formaldéhyde à 37 %). Si l'on dispose d'une solution de formaline à 10%, ajouter alors 1,2 mL de cette solution.

## Décoloration de spots/bandes

### I/ Echantillons issus de gels SDS-PAGE colorés au bleu de Coomassie (standard ou colloïdal)

La décoloration se réalise en microtubes au thermomixer (800 rpm ; 37°C).

1. Couvrir les bouts de gel avec 100 µL de CH<sub>3</sub>CN pendant 5 min puis éliminer le surnageant.
2. Ajouter sur les bouts de gel 100 µL d'AMBIC 50 mM pendant 5 min puis ajouter 120 µL de CH<sub>3</sub>CN pendant 15 mn. Eliminer ensuite le surnageant.
3. Ajouter sur les bouts de gel 100 µL d'AMBIC 50mM pendant 5 min puis ajouter 100 µL de CH<sub>3</sub>CN pendant 15 min. Eliminer ensuite le surnageant. Répéter l'opération jusqu'à décoloration complète.
4. Couvrir les bouts de gel avec 100 µL de CH<sub>3</sub>CN pendant 5 min puis éliminer le surnageant.
5. Déshydrater les bouts de gel au Speed Vac pendant 20min.

### II/ Echantillons issus de gels SDS-PAGE colorés au nitrate d'argent

Protocole modifié de Gharahdaghi *et al.* (Electrophoresis, 1999, 20 :601-605)

1. Préparer une solution stock de ferricyanure de potassium 30 mM.
2. Préparer une solution stock de thiosulfate de sodium 100 mM.
3. Préparer la solution de décoloration en mélangeant les solutions stocks décrites ci-dessus en ratio 1 : 1 (Note 1).
4. Couvrir les bouts de gels avec 100 µL de la solution de décoloration et vortexer occasionnellement. Attendre la décoloration complète.
5. Rincer les bouts de gels par 100 µL d'eau distillée pendant 5 min. Répéter l'opération à 3 reprises.
6. Ajouter 100 µL d'eau pendant 5 min puis ajouter 220 µL de CH<sub>3</sub>CN pendant 10 min. Eliminer le surnageant.
7. Ajouter 100 µL d'eau pendant 5 min puis ajouter 200 µL de CH<sub>3</sub>CN pendant 10 min. Eliminer le surnageant.
8. Ajouter 100 µL de CH<sub>3</sub>CN pendant 5 min puis éliminer le surnageant.
9. Déshydrater les bouts de gel au Speed Vac pendant 20 min.

**Note 1** : La solution de décoloration n'est pas stable et doit être préparée à chaque fois.

## Digestion « *in gel* » de spots/bandes issus de gels SDS-PAGE

### Excision des bandes/spots

1. Découper les bandes/spots à l'aide d'un scalpel en petits bouts ayant une surface comprise entre 1 et 4 mm<sup>2</sup>.
2. Les rincer avec de l'eau MilliQ

### Décoloration

3. A adapter en fonction de la coloration utilisée, se reporter aux protocoles précédents.

### Réduction & alkylation (Note 1 & 2)

4. Réhydratation des bouts de gels dans 150 µL d'une solution de DTT 10 mM dans AMBIC 50 mM. L'ensemble est placé au thermomixer (800 rpm) à 56°C pendant 30 mn.
5. Aspirer la solution de DTT et ajouter 150 µL de CH<sub>3</sub>CN et placer au thermomixer à 30°C pendant 5 min.
6. Alkylation des résidus cystéine par une solution d'IAM 50 mM dans AMBIC 50 mM à température ambiante à l'obscurité pendant 30 mn.
7. Réaliser 2 lavages successifs par une solution d'AMBIC 50 mM à 37°C pendant 10 mn.
8. Laver une dernière fois avec du CH<sub>3</sub>CN pendant 5 mn.
9. Le gel est ensuite déshydraté au Speed Vac pendant 20 min.

### Digestion à la trypsine

6. Les morceaux de gel sont réhydratés à 0°C par diffusion passive dans 8 à 10 µL de solution de trypsine pendant 20 min (Note 3).
7. Dans chaque tube, on rajoute ensuite 50 à 100 µL d'AMBIC 50 mM et on place ces derniers pendant la nuit au thermomixer à 37°C.

### Extraction des peptides

8. Le surnageant est prélevé et on ajoute 100 µL d'une solution de TFA 1% pendant 15 min à 30°C.
9. Le surnageant est prélevé et mélangé avec le précédent. 100 µL d'une solution aqueuse CH<sub>3</sub>CN/TFA 60/1 sont ajoutés et le tube est placé à 30°C pendant 15 min. Réaliser l'opération 2 fois.
10. Le surnageant est prélevé et mélangé avec le précédent, puis on ajoute 100 µL de CH<sub>3</sub>CN à 30°C pendant 15 min.
11. On place la totalité des pools au Speed Vac jusqu'à évaporation presque complète.

**Note 1 :** Ces étapes sont inutiles dans le cas d'échantillons issus de gels bidimensionnels, ces étapes ayant été réalisées lors des phases d'équilibration des strips.

**Note 2 :** Ces deux étapes ont pour but de rendre tous les sites de coupures accessibles à la protéase utilisée. Il est donc possible de les omettre pour accélérer le protocole de digestion mais cela se fera au détriment du rendement de la digestion et de la couverture de séquence.

**Note 3 :** La trypsine commerciale est préparée dans de l'HCl 1 mM à la concentration de 1 µg/µL, aliquotée par 5µL et conservée à -20°C. Il est préférable de ne pas décongeler les aliquotes plus de 2 fois.

Avant utilisation, la trypsine est diluée à 25 ng/µL dans de l'HCl 1 mM (coloration au bleu de Coomassie) ou 12.5 ng/µL dans de l'HCl 1 mM (coloration au nitrate d'argent).

## Digestion en solution LysC/Trypsine d'un mélange complexe de protéines

Ce protocole consiste en une double digestion en milieu dénaturant. Il est utilisé pour améliorer les rendements de digestion de la trypsine (coupure en C-ter des acides aminés basiques) en autorisant d'une part une protéolyse par la Lys-C (coupure en C-Ter des lysines) en conditions dénaturantes (urée 6-8M) et en diminuant d'autre part le nombre de coupures manquantes laissées au niveau des lysines par la trypsine.

En fonction de la nature de l'échantillon (présence de sels, détergents, nature du tampon), ce protocole devra être adapté.

### Réduction & alkylation

1. Placer l'échantillon protéique en tampon AMBIC 50mM / Urée 6 à 8M dans un volume total de 30  $\mu$ L. (Note 1 à 3)
2. Ajouter 1  $\mu$ L d'une solution aqueuse de DTT 200 mM pour atteindre une concentration finale d'environ 6 mM et laisser incuber au thermomixer à 37°C pendant 15-20 min.
3. Ajouter 3  $\mu$ L d'une solution aqueuse d'IAM 200mM et laisser incuber dans le noir à 25°C pendant 30 min.
4. Quencher l'IAM résiduel en ajoutant 0.5  $\mu$ L d'une solution aqueuse de DTT 200 mM.

### Digestion

5. Ajouter l'endoprotéase Lys-C avec un ratio enzyme/protéines (w/w) d'environ 1/50 et laisser incuber au thermomixer (37°C ; 1000 RPM) pendant 3 heures minimum.
6. Diluer l'urée 6 à 8 fois par de l'AMBIC 50 mM pour atteindre une concentration finale de 1 M.
7. Ajouter la trypsine avec un ratio enzyme/protéines (w/w) d'environ 1/40 et laisser incuber au thermomixer (37°C ; 1000 RPM) toute la nuit.

### Filtration particulière

8. Filtrer le volume de la digestion sur Amicon-Ultra 30kDa (14000 x g maximum) (Note 3) et récupérer le filtrat. Eliminer les 20  $\mu$ L du rétentat (pour diminuer les pertes, il est possible de diluer le rétentat en rinçant les membranes par 60  $\mu$ L d'eau milliQ, centrifuger de nouveau et ajouter le second filtrat au premier).
9. Acidifier le filtrat par ajout progressif de TFA 10% (v/v) pour atteindre 0.5% (v/v) final. Vérifier le pH au papier pH. Si pH >2, continuer l'ajout progressif de TFA 10%. Si le pH est inférieur à 2, passer à l'étape de concentration/dessalage sur phase inverse C-18.

**Note 1 :** En fonction de la nature et de la composition du tampon de l'échantillon, ce dernier devra subir des étapes de préparation préliminaires le rendant compatible avec les étapes ultérieures. Pour cela, on pourra lui faire subir une précipitation à l'acétone si l'échantillon n'est pas trop dilué ou bien des cycles de concentration/dilution (dialyse) à l'aide d'unité de filtration par centrifugation (Amicon-Ultra 0.5 mL, 10kDa ; 14000 x g maximum). Dans ce dernier cas, il est préférable de « dialyser » avec de l'AMBIC 50 mM en absence d'urée et après récupération de l'échantillon, d'ajouter la quantité d'urée en poudre nécessaire pour avoir 6-8 M au final.

**Note 2 :** Le chlorure de guanidinium est à éviter car il inhibe la trypsine à plus faible concentration que l'urée.

**Note 3 :** Lors de l'utilisation d'unités de filtration par centrifugation, il est recommandé de les rincer en centrifugeant 400  $\mu$ L d'eau MilliQ avant de centrifuger les échantillons d'intérêt.

## Concentration et dessalage de peptides sur phase inverse C-18

### Micro-dessalage sur ZipTip<sub>C-18</sub> (Merck-Millipore)

La capacité de chargement des ZipTip<sub>C18</sub> indiquée par le fabricant est de 5 µg en condition saturante en peptides à dessaler.

1. Mettre le ZipTip<sub>C18</sub> sur une pipette type P10 et la régler sur le volume 10 µL.
2. Mouiller la résine par un cycle de 3 aspirations /refoulements de 10 µL avec une solution de CH<sub>3</sub>CN 50% (v/v)/TFA 0.1% (v/v).
3. Equilibrer la résine par un cycle de 3 aspirations/refoulements de 10 µL avec une solution de TFA 0.1% (v/v).
4. Adsorption des peptides issus de la digestion par un cycle de 10 aspirations /refoulements.
5. Dessaler les peptides par un cycle de 3 à 5 aspirations / refoulements avec une solution de TFA 0.1% (v/v).
6. Eluer les peptides avec 4 µL d'une solution de CH<sub>3</sub>CN 50% (v/v)/TFA 0.1% (v/v). Renouveler l'élution 2 autres fois.
7. Evaporer au Speed Vac jusqu'à 3-5 µL pour éliminer le CH<sub>3</sub>CN. Rajouter 10 µL de FA 0.1% (v/v).
8. Placer les 15 µL en vial d'injection et le fermer par un septum.

### Dessalage sur spin column (ThermoFisher)

La capacité de chargement des spin-columns indiquée par le fabricant est de 30 µg en condition saturante en peptides à dessaler.

1. Placer la spin-column dans un tube Treff de 2 mL.
2. Mouiller la résine par 200 µL d'une solution de CH<sub>3</sub>CN 50% (v/v). Centrifuger (RT; 1000 x g ; 1 min). Renouveler 2 fois.
3. Equilibrer la résine par 200 µL d'une solution de CH<sub>3</sub>CN 5% (v/v)/TFA 0.5% (v/v). Centrifuger (RT; 1000 x g ; 1 min). Renouveler 2 fois.
4. Charger l'échantillon à dessaler (200µL maximum). Centrifuger (RT; 1000 x g ; 1 min). Récupérer le flow-through et recharger sur la colonne (renouveler 2 fois maximum).
5. Laver la résine par 200 µL d'une solution de CH<sub>3</sub>CN 5% (v/v)/TFA 0.5% (v/v). Centrifuger (RT; 1000 x g ; 1 min). Renouveler 2 fois.
6. Eluer les peptides par 20 µL d'une solution de CH<sub>3</sub>CN 70% (v/v)/FA 0.1%. Centrifuger (RT; 1000 x g ; 1 min). Renouveler avec 40 µL puis 20 µL d'une solution de CH<sub>3</sub>CN 70% (v/v)/FA 0.1%.
7. Evaporer au Speed Vac jusqu'à 15 µL pour éliminer le CH<sub>3</sub>CN. En fonction de la quantité initiale de peptides à dessaler, ajouter le volume nécessaire d'une solution de FA 0.1% (v/v) pour avoir une concentration maximale de 1 µg/µL.
8. Placer les peptides en vial d'injection et le fermer par un septum.



## Analyses d'échantillons peptidiques et protéiques par MALDI-TOF

Les deux protocoles portent sur une méthode de dépôts dits en goutte séchée. Ils sont simples à mettre en œuvre et donnent de manière générale de bons résultats. Dans ces deux protocoles, l'échantillon est mélangé avec une solution acide de matrice (préparée à saturation ou de concentration connue). Une goutte (1-1.5  $\mu\text{L}$ ) de cette préparation est ensuite déposée sur la surface de la plaque porte-échantillon du spectromètre MALDI-TOF. Le mélange peut être réalisé au préalable dans un micro-tube (solution à privilégier) ou bien directement sur la plaque par une série d'aspirations-refoulements dans le cône de la pipette.

La cristallisation de la goutte se réalise à température ambiante mais peut être également accélérée par la présence d'un léger courant d'air.

Il existe d'autres méthodes (méthode de la couche mince ou du sandwich) qui seront à explorer si les deux protocoles décrits ci-dessous ne donnent pas les résultats escomptés.

### **Analyse d'un mélange peptidique « simple »**

1. Préparer une solution acide de  $\text{CH}_3\text{CN}$  30% (v/v)/TFA 0.3% (v/v).
2. Sans peser, prélever une pointe de spatule de matrice  $\alpha$ -CHCA et ajouter 500  $\mu\text{L}$  de la solution de  $\text{CH}_3\text{CN}$  50% (v/v)/TFA 0.3% (v/v). Vortexer pendant 1 à 2 min et s'assurer que la solution est toujours bien saturée (présence de cristaux de matrice). A défaut, rajouter de la matrice et vortexer à nouveau. Centrifuger (12000 rpm ; 2 min).
3. Préparer une solution à demi-saturation en prélevant 200  $\mu\text{L}$  de la solution saturée et en la diluant par 200  $\mu\text{L}$  de la solution de  $\text{CH}_3\text{CN}$  50% (v/v)/TFA 0.3% (v/v).
4. Mélanger 1  $\mu\text{L}$  de l'échantillon peptidique à analyser avec la solution de matrice à demi-saturation de sorte que la concentration en peptides soit de l'ordre de plusieurs centaines de fmol/ $\mu\text{L}$  (au maximum 1 pmol/ $\mu\text{L}$ ). (Note 1)
5. Prélever 1.5  $\mu\text{L}$  de ce mélange, les déposer rapidement sur la plaque porte-échantillons et laisser cristalliser.

### **Analyse d'une protéine**

1. Préparer une solution acide de  $\text{CH}_3\text{CN}$  30% (v/v)/TFA 0.3% (v/v).
2. Sans peser, prélever une pointe de spatule de matrice SINAP et ajouter 500  $\mu\text{L}$  de la solution de  $\text{CH}_3\text{CN}$  30% (v/v)/TFA 0.3% (v/v). Vortexer pendant 1 à 2 min et s'assurer que la solution est toujours bien saturée (présence de cristaux de matrice). A défaut, rajouter de la matrice et vortexer à nouveau. Centrifuger (12000 rpm ; 2 min).
3. Mélanger 1  $\mu\text{L}$  de l'échantillon protéique à analyser avec la solution de matrice à saturation de sorte que la concentration de la protéine soit comprise entre 1 et 10 pmol/ $\mu\text{L}$ . (Note 1).
4. Prélever 1.5  $\mu\text{L}$  de ce mélange, les déposer rapidement sur la plaque porte-échantillons et laisser cristalliser.

**Note 1 :** La dilution de l'échantillon à réaliser est donnée à titre indicatif, elle dépend notamment de la concentration en sels/tampons/autres contaminants susceptibles d'être présents dans l'échantillon. En absence de signal MALDI, tester différents facteurs de dilution.