
	Protocole : FIXATION COVALENTE ET ORIENTEE D'ANTICORPS SUR DES BILLES		
	Référence : PR3P5/PCMS/PO/HP002/1	Création/Mise à jour : 05/11/2013	
	Version : 1	Nb de pages : 1/2	

	Fonction	Nom
Rédacteur	Responsable Scientifique plate-forme	P. MAYEUX
Vérificateur	Ingénieur d'études	C. BROUSSARD
Approbateur	Responsable Technique plate-forme	P. MAYEUX

Révisions			
Version	Description	Auteur	Date
1	Création	P. MAYEUX	05/11/2013

Nous utilisons des billes de type protein G Ultralink vendues par Pierce. Ces billes synthétiques présentent une fixation non spécifique plus faible que les billes d'agarose (ou de leur équivalent commercial, le Sépharose) et supportent des pressions plus élevées. La protéine G reconnaît mieux certaines sous classes d'IgG murines que la protéine A. Les billes d'agarose et les billes dérivées avec de la protéine A peuvent néanmoins être couplées de la même façon.

Le couplage comprend plusieurs étapes :

- 1- liaison des anticorps sur les billes et élimination des molécules non liées aux billes
- 2- pontage covalent avec du diméthyl pimélimidate (DMP)
- 3- blocage du diméthyl pimélimidate en excès
- 4- élimination des anticorps liés de façon non covalente aux billes

1. Matériels (Réactifs)

- Billes avec protéine A ou protéine G (Pierce si Ultralink)
- Anticorps à fixer
- PBS
- Tampon bicarbonate 0.2M, NaCl 0.5M pH8.00
- Dimethyl pimélimidate hydrochloride le DMP en solution est extrêmement instable. En poudre, il s'hydrate très vite. Nous utilisons des doses à usage unique (Sigma D8388-250mg). Préparer une solution 10mM, JUSTE AU MOMENT DE L'EMPLOI dans le tampon bicarbonate
- Tampon ethanolamine 1M pH8.00
- Tampon glycine 50 mM pH2.8
- Azide de Na 2%

2. Description

1- fixation des anticorps : laver au PBS les billes de protéine A ou G, incuber avec la solution contenant l'anticorps. Nous utilisons en général 10 mg d'anticorps pour 1ml de billes ou 1 ml de sérum. Incuber 2 heures à 4°C avec agitation (roue). Conserver la fraction non fixée, laver 4 fois les billes au PBS et une fois au tampon bicarbonate.

2- pontage covalent : dissoudre le DMP dans le bicarbonate, transférer immédiatement 5 ml de solution DMP/1ml de billes. Incuber 1 heure à 4°C sur roue.

3- faire 1 lavage PBS puis 1 lavage bicarbonate

4- blocage du cross-linker en excès : Incuber 1H avec une solution d'éthanolamine 0.1M dans le tampon bicarbonate (roue)

5- laver 2 fois en PBS

6- Elimination des AC fixés de façon non covalente : incuber 2 minutes dans 4 volumes de billes avec le tampon glycine pH2.8, centrifuger et éliminer le surnageant (peut être conservé, neutralisé immédiatement avec du Tris 1M pour ne pas perdre les AC si pb de pontage) Ajouter immédiatement du PBS sur les billes.

7- faire 3 lavages PBS et conserver à 4°C dans PBS + 0.02% azide