3P5 Protéom'IC Université de Paris - Institut Cochin institut cochin	Fiche d'instruction : **Recherche des partenaires d'une protéine par MS**	
	Référence : PR3P5/IC/FI/014	Rédacteur : P. MAYEUX
	Création /Mise à jour : 04/05/2020	Approbateur : F. GUILLONNEAU
	Version : 1	Nb pages : 1/9

Préambule

L'analyse des immuno-précipités par spectrométrie de masse est une approche très puissante pour identifier des protéines associées à un appât moléculaire. Cette méthode a maintenant largement démontré sa fonctionnalité et a permis d'identifier de très nombreuses protéines impliquées dans des complexes. Néanmoins, elle requiert une approche rigoureuse pour être efficace. Les chercheurs qui ont réalisé des expériences d'immuno-précipitation suivie de western blot pour caractériser leur protéine voire pour vérifier la co-précipitation de partenaires déjà connus, pensent souvent que l'identification de nouveaux interactants par une analyse globale sera aisée et qu'il suffira de reproduire cette expérience puis de confier le produit d'immuno-précipitation à un service de protéomique pour identifier de façon exhaustive les partenaires de leur protéine appât. Dans la plupart des cas, cette approche ne fonctionnera pas ou d'une façon médiocre permettant rarement d'identifier des protéines intéressantes. Il y a deux raisons majeur es à cela : d'une part les analyses par western blot présentent une grande sélectivité dans la détection[1]. La présence de très nombreux contaminants dans l'IP ne gêne donc généralement pas la détection de la protéine ciblée et passe le plus souvent inaperçue alors que ces contaminants peuvent représenter plusieurs centaines voire plusieurs milliers de protéines et constituer en masse la fraction la plus abondante de l'échantillon. Par contre, dans le cas d'une analyse globale ces contaminants peuvent gêner la détection des protéines spécifiques s'ils sont trop nombreux mais surtout leur identification comme contaminant ou comme interactant spécifique pourra être extrêmement compliquée. La seconde raison est que les interactants déjà identifiés correspondent souvent à des protéines qui interagissent de façon assez stable dans les conditions classiquement utilisées pour ces immuno-précipitations. D'autres interactions, en particulier mais pas seulement celles qui mettent en jeu des protéines membranaires, peuvent être sensibles aux conditions utilisées lors de la préparation des extraits cellulaires et des lavages d'IP : type de détergent principalement mais aussi force ionique du tampon, présence de sels divers (Ca, Mg,…) etc….

Il nous est parfois demandé si cette méthode peut permettre d'identifier des substrats de kinases ou d'autres enzymes. Certaines réactions enzymatiques peuvent être précédées par l'association de l'enzyme avec son substrat en dehors du site catalytique et dans ce cas, l'association peut être suffisamment stable pour être identifiée. Mais, dans la très grande majorité des cas, la durée d'association lors de la catalyse est très courte et l'association ne pourra pas être détectée dans ces analyses.

Lorsque nous vous indiquons qu'une protéine est présente dans un échantillon, la probabilité d'erreur d'identification est généralement infinitésimale. Par contre, nous ne pouvons jamais affirmer que cette protéine est présente de façon spécifique. Il est donc de la plus haute importance de réaliser des contrôles les plus rigoureux possibles pour déterminer avec le plus de confiance possible si chaque protéine identifiée est un contaminant ou un partenaire potentiel sérieux.

Il faut donc être conscient que la recherche des partenaires d'une protéine appât est une analyse complexe qui nécessitera des mises au point poussées et la multiplication des analyses pour obtenir des résultats fiables et relativement exhaustifs. Ne pas réaliser ces expériences préalables, c'est à coup sûr s'exposer à des déceptions et à passer beaucoup de temps à vouloir confirmer l'interaction entre deux protéines qui n'est en fait qu'un artefact lié à l'association non spécifique de la protéine identifiée aux différentes matrices utilisées lors de l'immuno-précipitation : anticorps, billes, tube Eppendorf, etc…

[1] Attention toutefois de ne pas surestimer la spécificité des anticorps utilisés dans les expériences de WB : une bonne partie des anticorps commerciaux reconnaissent fréquemment des protéines de façon non spécifique (voir entre autres : Baker M. Reproducibility crisis: Blame it on the antibodies. Nature. 2015;521:274-276.)

Design et mise au point des expériences

Cette étape indispensable aura plusieurs objectifs :

- Définir les contrôles les plus judicieux compte tenu du matériel disponible
- Identifier la composition optimale des différents tampons
- Mettre en place les méthodes permettant de limiter au maximum les contaminants

Les deux derniers points sont en partie antagonistes puisque plus un tampon sera dénaturant, moins il conduira à la fixation non spécifique des protéines mais aussi plus il conduira à la perte des interactions spécifiques. La condition extrême correspond à la purification des protéines dérivées de façon covalente avec de la biotine, où une purification réalisée dans un tampon contenant 4M urée permet de se débarrasser de la plupart des contaminants mais ne permet que de récupérer la protéine taggée sans aucun interactant fixé de façon covalente.

1- Design de la manip et définition des contrôles

1-1 le système d'immunoprécipitation et les anticorps

Les anticorps (AC) peuvent être issus de différentes modes de préparation.

Les antisérums complets obtenus par immunisation d'animaux avec des protéines entières sont souvent très efficaces mais présentent l'inconvénient de contenir énormément d'AC non spécifiques. La concentration sérique d'IgG chez le lapin est d'environ 12-15 µg/µl. Il est donc fortement conseillé de purifier les AC spécifiques sur l'antigène (NB une purification des anticorps totaux sur protéine A ou protéine G n'apporte en général aucun avantage). Lorsque c'est impossible, il faut naturellement adapter la quantité (voire le type, voir ci-dessous) de billes de protéines A ou G pour tenir compte de cette quantité importante d'immunoglobulines totales.

Les anticorps spécifiques purifiés, soit de type monoclonal ou purifiés par affinité, sont généralement mieux adaptés à ces analyses, s'ils présentent une bonne efficacité d'immuno-précipitation (attention de nombreux anticorps monospécifiques, parfaitement efficaces en WB, et en particulier beaucoup de ceux produits en utilisant des peptides pour l'immunisation, ne sont pas précipitants). Ce type d'anticorps permet d'utiliser des faibles quantités du système d'IP (AC et billes), ce qui d'une part permet d'éviter une saturation temporaire du spectromètre de masse par des peptides des Ig qui peut se produire lorsqu'elles sont trop abondantes et d'autre part de limiter les contaminants dont la quantité est généralement proportionnelle à la quantité de billes et d'AC utilisés.

Les anticorps anti-tags alliés à des protéines taggées présentent de nombreux avantagesoutre le fait qu'ils permettent de pallier l'absence d'anticorps immunoprécipitants dirigés contre une protéine. Ces AC sont toujours monoclonaux, de haute affinité et immunoprécipitants (se méfier quand même que pour certains tags, il existe des AC pour le WB différents des AC pour l'IP). Ils présentent aussi l'énorme avantage de permettre souvent d'éluer leur cible avec un excès de peptides. Cette élution est réalisée dans des conditions non dénaturantes ce qui évite de libérer simultanément la plupart des protéines fixées non spécifiquement sur le système de purification. D'autre part, les complexes restant associés lors de cette étape d'élution, il est possible de réaliser à la suite une autre immuno-purification avec un autre anticorps (principe du TAP-Tag). Cependant, l'expérience acquise sur la plateforme montre que dans un nombre non négligeable et imprévisible de cas, cette élution spécifique n'est pas efficace. Cette approche utilisant une protéine taggée présente aussi un inconvénient lié au niveau d'expression de cette protéine exogène qui peut soit entrainer des associations non physiologiques ou à l'inverse, si l'expression est

trop faible, compéter difficilement avec la protéine endogène pour la formation des complexes multimoléculaires lorsque l'expression de cette dernière n'a pas été inhibée. Enfin, la présence du tag peut, dans certains cas rares mais documentés empêcher l'association avec certaines protéines.

Les billes utilisables pour récupérer les anticorps sont de plusieurs types. L'utilisation de protéine A ou G est généralement indifférente tant que les Ig utilisées sont bien reconnues par les deux types de protéines qui présentent quelques différences de spécificité parmi les classes et sous-classes d'immunoglobulines reconnues. Les matrices sont de plusieurs types : magnétiques ou à centrifuger, agarose ou polymères de synthèse. Les billes magnétiques présentent de nombreux avantages et devraient maintenant être utilisées systématiquement pour ces analyses par spectrométrie de masse, elles raccourcissent considérablement les temps de lavages et permettent une meilleure élimination des surnageants. Les matrices réalisées à partir de polymères synthétiques présentent des fixations non spécifiques généralement plus faibles et sont à privilégier. Néanmoins, il faut aussi prendre en compte la capacité de fixation des billes. La capacité de fixation des billes de Proteine G-agarose vendues par Thermo est de 27 mg d'IgG de lapin /ml de billes alors que celle des billes de type Dynabeads ou équivalent n'est que de l'ordre de 500-600 µg/ml. Lors de l'utilisation d'AC purifiés, la quantité d'AC est faible et ce dernier type de billes doit être privilégié. Par contre, cette capacité peut être limitante dans le cas d'un antisérum complet et obliger à l'utilisation de billes de Proteine G (ou A ou A/G)-Agarose (ou Sépharose) magnétiques.

1-2 Les contrôles

Comme indiqué plus haut, les contrôles sont un point majeur dans l'expérience puisqu'ils vont jouer un rôle indispensable dans la différenciation des interactants et des protéines associées non spécifiquement au système de purification dans son ensemble (contaminants). Il convient donc de traiter les contrôles avec exactement le même protocole et la même rigueur que l'IP spécifique.

Le meilleur contrôle est l'utilisation de cellules identiques à celles utilisées pour l'IP spécifique mais qui n'expriment pas la protéine appât. Il suffit alors de réaliser l'IP contrôle en utilisant ce matériel biologique et exactement le même protocole et les mêmes réactifs que pour l'IP spécifique. Attention toutefois à ce que l'expression de la protéine appât dans les cellules contrôle soit bien nulle. Ce but n'est généralement pas atteint avec des systèmes d'inactivation transitoire de type shRNA ou siRNA. Seuls les systèmes d'inactivation définitive (souris KO ou système de type CRISPR) peuvent permettre d'obtenir une absence complète d'expression de la protéine. Lorsque l'appât est une protéine exogène taggée, il suffit bien entendu d'utiliser des cellules non transfectées avec le vecteur d'expression.

En absence de cellules n'exprimant pas la protéine appât, on utilisera un AC non relevant. Cet anticorps sera bien entendu le plus proche possible de l'AC spécifique (même espèce, même sous classe). Si un sérum complet est utilisé, il conviendra d'utiliser le sérum pré-immun chaque fois qu'il sera disponible sinon utiliser du sérum d'un animal non immunisé de la même espèce.

Il est bien entendu primordial que les immuno-précipitations de contrôle soient réalisées rigoureusement dans les mêmes conditions que les IP spécifiques : mêmes tampons, mêmes quantités de réactifs, mêmes températures, mêmes lavages, mêmes conditions d'élution….

2- Manipulation préalable : mise au point des conditions d'IP en vue de l'analyse par spectrométrie de masse

Les buts de cette étape essentielle sont doubles : 1- vérifier la présence de l'appât dans toutes les étapes successives du processus d'IP, 2- optimiser les quantités du système d'IP à utiliser (AC et billes) pour limiter au maximum les quantités utilisées tout en récupérant une quantité importante de l'appât.

La première analyse peut se faire avec une quantité limitée d'extrait total et d'AC : de l'ordre de quelques millions de cellules et 1-2µg d'AC spécifique ou 2-4 µg de sérum complet. Prévoir une IP de contrôle. Un protocole type est joint à ce document (voir chapitre 5). Les indications suivantes se réfèrent à ce protocole type qui fonctionne dans la majorité des cas mais peut devoir être adapté pour certaines analyses (voir plus loin). Le principe de cette première analyse est de tester le rendement de chaque étape de la manip : solubilisation, accrochage sur l'AC, lavages, élution. Pour cela, il est essentiel de déposer lors de l'analyse par WB une quantité de matériel **correspondant à la même quantité de cellules pour chaque étape.** Les différents points du WB seront :

1- lysat total avant centrifugation,

2- fraction solubilisée

3- (optionnel) culot après solubilisation

4- fraction non fixée sur l'AC

5-Lavage 1

6- Lavage 2

…

13- lavage 9 (NB, si nécessaire, les lavages avec un même tampon peuvent être poolés)

14- fraction éluée avec le tampon d'élution

15- ré-extraction du culot de billes avec du tampon d'électrophorèse.

Si le résultat est satisfaisant, passer à l'optimisation de la quantité d'AC et de billes à utiliser. Sinon, modifier le protocole avant de passer à l'étape suivante. Les modifications essentielles concernent principalement la composition du tampon de solubilisation. Si les protéines ciblées sont cytosoliques, la quantité de détergent peut généralement être diminuée jusqu'à 0.5 voire 0.25%. Si les protéines sont nucléaires, il peut être nécessaire d'ajouter jusqu'à 0.5M de sel (NaCl ou KCl, attention le KCl précipite le SDS et peut poser des problèmes lors du WB).

L'objectif à atteindre pour optimiser la quantité d'AC et par conséquent de billes de protéine A ou G à utiliser est de précipiter 50 et 70% de la protéine appât solubilisée. Il n'est pas nécessaire, voire pas souhaitable de chercher à dépasser ce chiffre; l'augmentation du rendement au-delà de 70% nécessitera des augmentations importantes de la quantité d'AC nécessaire (n'oublions pas que 100% d'IP n'est théoriquement obtenu que pour une concentration infinie d'AC) pour un gain négligeable. Dans le cas d'un anticorps monoclonal ou purifié par affinité, des quantités d'AC variant de 1 à 20 µg pour 20 à 40 millions de cellules peuvent être testées. Dans le cas d'un antisérum complet, tester de 1 à 20 µl de sérum dans un premier temps (notez que pour un sérum de lapin, cela correspond à 15-300µg d'IgG).

Dans les cas très favorables, 1µg d'anticorps non purifié suffit pour atteindre cet objectif de 70% de l'appât immuno-précipité. Dans ce cas, il est inutile de rechercher à diminuer encore cette quantité dans la mesure où l'essentiel des fixations non spécifiques sont réalisées sur les billes plutôt que sur les anticorps et qu'une quantité minimum de billes est nécessaire pour permettre les manipulations.

3- Analyse complémentaire souhaitable

Il est maintenant possible, à partir d'une quantité très faible de matériel biologique de réaliser la quantification absolue de plusieurs milliers de protéines en une seule expérience. Ces données permettent de connaitre en profondeur le protéome du matériel sur lequel on travaille. Dans le cas de ces recherches de protéines partenaires, elles permettront de déterminer le nombre de copies cellulaires de l'appât et de chaque partenaire identifié, que l'appât soit une protéine endogène ou une protéine transfectée portant un tag. Ces quantifications absolues à haut débit peuvent donc fournir une aide importante dans l'interprétation des résultats de ces recherches de partenaires protéiques en donnant une précision quant au niveau d'expression des protéines dans les différentes conditions étudiées.

4- Nombre de replicats à prévoir

Il est difficile d'apporter une réponse définitive à cette question. Deux points sont néanmoins à prendre en considération : 1- plus le nombre de replicats sera élevé et plus la différence entre interactants spécifiques et contaminants sera fiable. Le temps et le coût utilisés pour réaliser ces replicats sera en général largement récupéré en évitant de tester des candidats potentiels qui in fine se révèleront être des contaminants, 2- certains interactants spécifiques seront totalement absents des contrôles mais d'autres seront aussi présents, bien qu'en quantité nettement plus faible dans ces contrôles. Il sera donc nécessaire de réaliser une analyse statistique pour déterminer si la différence est significative. <u>Ces analyses ne pourront être réalisées que si nous disposons d'au moins 4 replicats.</u>

5- Protocle standard

Le protocole proposé ci-dessous a été utilisé avec succès dans plusieurs analyses. Aucune méthode en biochimie des protéines n'est universelle. Le protocole proposé peut être considéré comme une base de départ pour ces expériences si l'équipe demandeuse n'a pas déjà mis en place un protocole mais pourra nécessiter des modifications pour l'adapter au matériel analysé.

Protocole d'immunoprécipitation en vue d'une recherche de partenaires par spectrométrie de masse

Matériel et réactifs :

- Tampon de solubilisation et de lavages
  - Solution stock 2x : 50 mM Tris, 300mM NaCl, 10 mM EDTA, 20% glycérol, 0.02% azide de Na (optionnel, permet d'éviter les contaminations par micro-organismes) pH7.5 avec HCl (NB pHer après toutes les additions sauf glycérol et azide). Filtrer sous hotte et répartir par aliquots de 10 ou 50 ml. Conserver à 4°C.
    Attention, l'azide de sodium est très toxique et ne doit jamais être utilisé avec des solutions acides. On peut faire une solution stock 2% dans de l'eau (conservation très longue à température ambiante)
  - Solutions de travail :
    - Tampon de solubilisation et de lavages 1 : tampon stock 1X, 1% de NP40, 1X inhibiteurs de protéase, 1X inhibiteurs de phosphatases, 1mM vanadate, QSP H_2O
    - Tampon de lavages 2 : tampon stock 1X, 0.1% de NP40, inhibiteurs de protéases et de phosphatases y compris vanadate 1mM possibles mais généralement pas vraiment nécessaires sauf tissus particuliers type pancréas ou neutrophiles (NB pour les neutrophiles, il existe une procédure particulière pour inactiver les protéases des granules avant solubilisation des cellules, **cette procédure doit absolument être utilisée lors de l'utilisation de neutrophiles**, à considérer aussi pour quelques autres types cellulaires avec forte charge en protéases très actives)
- Inhibiteurs de protéases : exemple Complete EDTA-free de Roche: 1 tablette peut être dissoute dans 1ml d'eau (solution 50X), peut se conserver 1 mois à 4°C
- Inhibiteurs de phosphatases : optionnel, exemple Phos-Stop de Roche (NB 1- une tablette PhosStop peut être dissoute dans 1 ml d'eau (10X) et conservé à 4°C pendant 1 mois NB2- en ce qui concerne les inhibiteurs de phosphatases et de protéases il existe de nombreuses autres possibilités chez Thermo, Sigma ou autres fournisseurs qui présentent la même efficacité. NB3- pour les inhibiteurs de phosphatases (si on juge que des inhibiteurs de phosphatases sont nécessaires), il est préférable de compléter les mélanges commerciauxavec 1 mM de vanadate de Na).
- H_2O : penser à mettre un flacon d'eau type MilliQ à 4°C
- Solution de NP40 10% (solution stock), <u>membrane research grad</u>e (Roche mais existe aussi chez d'autres fournisseurs). <u>Ne pas utiliser de vieux flacons de détergents, généralement bourrés de peroxides</u>
- PBS (garder à 4°C), attention aux contaminations
- Tampon d'élution : 50 mM Tris/HCl pH8.5 contenant 2% de SDS. Optionnel : ajouter 10mM de TCEP au moment de l'utilisation. (NB solutions 0.5M de TCEP disponibles chez Sigma)
- Billes de protéines G : il est préférable d'utiliser des billes magnétiques type Dynabeads (vendues par ThermoFisher). Néanmoins, attention : ces billes ont une capacité de fixation nettement plus faible que celle des billes magnétiques type Sépharose (aussi vendues par ThermoFisher ; ref 78609). Dans le cas de l'utilisation d'un anti-sérum complet, il peut être nécessaire d'utiliser des billes de Sépharose plutôt que des billes de type Dynabeads.
- Aimant pour tubes Eppendorfs
- Centrifugeuse de type Eppendorf <u>réfrigérée</u> capable de délivrer au moins 20 000g.

- Agitateur en chambre froide (rotatif ou type Thermomixeur)
- Bloc chauffant (95°C) pour l'élution

Manip :

NB1 : il est nécessaire de réaliser l'ensemble de l'IP sans congeler l'extrait

NB2 : toute l'immuno-précipitation doit être réalisée à 0-4°C : centrifugeuse équilibrée à 4°C, tous les extraits et tampons dans un **bain de glace** (bain de glace = eau +glace : la glace seule refroidit assez peu les tubes qui seront surtout en contact avec l'air présent entre les morceaux de glace)

1- Lavage des cellules

Cellules en suspension : laver les cellules 2 fois avec du PBS, laisser 5-10 µl de PBS lors du dernier lavage et resuspendre les cellules dans cette faible quantité de PBS, transférer les tubes dans le bain de glace

Cellules adhérentes : exemple de boites de 10 cm : laver 3 fois les cellules avec 10-15 ml de PBS, bien éliminer tout le PBS à chaque lavage y compris (surtout) le dernier. Placer la boite sur de la glace (pas un bain de glace bien entendu à ce stade), ajouter 750 µl de tampon de solubilisation, racler avec un grattoir à cellules et transférer dans un tube Eppendorf, placer le tube Eppendorf dans un bain de glace. Si vous avez plusieurs boites de cellules identiques à traiter, il est préférable d'utiliser 1 ml de tampon de solubilisation et de transférer l'extrait de boite en boite.

2- Solubilisation des cellules

Cellules en suspension : ajouter 0.5 ml de tampon de solubilisation (volume suffisant jusqu'à au moins 40 millions de cellules). Pipeter et vortexer pour solubiliser les cellules.
Laisser les tubes dans le bain de glace pendant 20 minutes en vortexant occasionnellement (environ toutes les 5 minutes). Prélever l'équivalent de 1 million de cellules, ajouter du tampon échantillon d'électrophorèse, chauffer 5 minutes à 95°C et conserver à -20°C (fraction totale à utiliser lors du WB de contrôle)

Centrifuger le reste de l'extrait cellulaire 15 minutes à 20 000g, transférer le surnageant dans un tube propre, prélever à nouveau l'équivalent de 1 million de cellules (fraction solubilisée) et traiter comme précédemment.

3- Immunoprécipitation

Ajouter l'anticorps au surnageant 20 000g selon la quantité déterminée par les prémanips, incuber 1-2 heures dans le bain de glace (NB contrôler de temps en temps la qualité du bain de glace et compléter si nécessaire).
Préparer des tubes avec les billes de protéine G. Prélever la quantité de billes nécessaire (déterminée par les prémanips), et la transférer dans un tube Eppendorf, laver 3 fois les billes avec le tampon de solubilisation. Transférer l'extrait avec l'anticorps sur le culot de billes. Placer le tube sur un agitateur en chambre froide. Incuber avec agitation pendant une heure.

Récupérer les billes, transférer le surnageant (fraction non fixée) dans un tube propre, prélever l'équivalent de 1 million de cellules et traiter comme précédemment. Congeler le tube pour l'électrophorèse de contrôle à -20°C et le tube avec le reste de l'extrait non fixé à -80°C pour d'éventuelles analyses ultérieures.

Lavages :

NB1, placer tous les tampons de lavage dans le bain de glace au moins 30 minutes avant utilisation

NB2, à chaque lavage, bien resuspendre les billes en évitant qu'elles se collent sur la paroi du tube

- 3 lavages avec le tampon de solubilisation puis,

- 3 lavages avec le tampon de solubilisation ne contenant que 0.1% de NP40 puis,

- 3 lavages avec du PBS. Du TBS (25 mM Tris/HCl pH 7.5, 150 mM NaCl) peut être utilisé à la place du PBS. **Il ne doit y avoir ni détergent ni inhibiteur de protéases dans le PBS ou le TBS utilisé (attention, pas de TBS tween….).** Lors du dernier lavage, transférer les billes dans un tube propre (ce changement de tube permet d'éliminer les protéines et les autres contaminants fixés sur les parois du tube) Bien éliminer tout le surnageant lors du dernier lavage (un cône effilé type cône de dépôt peut aider pour cela, NB1 avec des billes magnétiques, les tubes doivent être laissés sur le portoir magnétique lors de l'élimination des surnageants, NB2 des fractions du surnageant des différents lavages peuvent aussi être récupérées pour contrôler que la protéine appât n'est pas perdue lors des lavages)

Elution :

Utiliser au moins 3 volumes de tampon d'élution par volume de billes (volume du culot de billes), ne pas descendre en dessous de 50µl quel que soit le volume de billes). Incuber 5 minutes à 95°C, séparer les billes, transférer le surnageant dans un tube propre.

Faire une seconde élution des billes avec le même volume de tampon d'élution, pooler les deux surnageants, prélever l'équivalent de 1 million de cellules de départ (exemple, si 40 millions de cellules solubilisées et que le volume total d'éluat est de 100 µL, prélever 2.5 µl). Ajouter du tampon d'électrophorèse et congeler les deux tubes à – 20°C (éluat pour l'analyse par spectrométrie de masse et fraction pour le contrôle par WB).

NB, après les deux élutions il est possible de faire une troisième élution avec du tampon d'électrophorèse pour analyser par WB ce qui n'a pas été élué par le tampon d'élution (surtout intéressant s'il n'y a pas de TCEP dans le tampon d'élution)

Contrôle de l'IP (NB le contrôle de la présence de l'appât dans l'éluat est nécessaire pour chaque échantillon envoyé pour analyse à la plateforme)

Faire un WB dirigé contre la protéine appât en déposant chaque fraction de la manip (lysat total, fraction solubilisée, non fixé sur l'AC, lavages, élution, reste sur les billes) et évaluer le rendement de chaque étape. **Utiliser le même équivalent-cellules pour chaque fraction** de façon à pouvoir faire une analyse quantitative et calculer le rendement

NB, il peut être intéressant de déposer un aliquot de l'éluat de l'IP contrôle sur le WB pour s'assurer que la protéine appât n'a pas été précipitée de façon non spécifique

Méthode pour réaliser l'immuno-précipitation de contrôle et l'immuno-précipitation spécifique sur le même échantillon lorsque le matériel biologique est en quantité limitante

Il arrive que le matériel biologique disponible pour une IP en vue d'une recherche de partenaires soit en quantité très limitante. C'est le cas par exemple lors de l'utilisation de matériel non propageable ou de cellules primaires. La réalisation d'IP de contrôle est néanmoins totalement indispensable pour pouvoir interpréter les résultats et identifier les contaminants, toujours présents en quantité importante, même lorsque le processus d'IP a été optimisé. Il est possible d'économiser le matériel normalement dédié à ces IP de contrôle en réalisant des IP successives. Néanmoins, lorsque le matériel biologique n'est pas en quantité limitante, il est fortement conseillé de réaliser l'analyse de façon normale en dédiant une partie de l'échantillon aux IP de contrôle. La variante proposée ici complexifie en effet la manip et rallonge le temps de traitement de l'échantillon.

Les tampons sont les mêmes que pour le protocole général d'IP.

Manip

1- Accrocher l'AC de contrôle sur les billes de protéine G

- Préparer des tubes Eppendorf avec la même quantité de billes de protéine G magnétiques que celle qui sera utilisée pour l'IP spécifique, laver les billes 3 fois avec du PBS, les reprendre dans 200µl de PBS, ajouter l'AC de contrôle et incuber 1H à 4°C avec agitation (la température n'est pas cruciale à ce niveau). Laver les billes deux fois avec du PBS et une fois avec du tampon de solubilisation, conserver les tubes avec les billes + une dizaine de µl de tampon dans un bain de glace. <u>NB les billes ne doivent jamais être « sèches » CAD non recouvertes par quelques µl de tampon</u>

2- Solubiliser les cellules comme décrit dans le protocole principal et centrifuger à 20 000g

3- Réalisation de l'IP contrôle

Transférer le surnageant 20 000g sur les culots de billes et incuber 30 minutes à 1heure <u>dans une chambre froide</u> avec agitation

A la fin de l'incubation, séparer les billes du surnageant.

- <u>Surnageant</u>

  Transférer le surnageant dans un tube propre et ajouter l'AC spécifique. A ce stade, traiter ce tube exactement comme décrit dans le protocole principal

- <u>Billes</u>

Laver les billes 3 fois avec le tampon de solubilisation, 3 fois avec le tampon de lavage 2 et 3 fois avec du PBS (ou du TBS). Utiliser exactement les mêmes volumes de lavages que pour l'IP spécifique et bien travailler dans un bain de glace. Ne pas oublier de les transférer dans un tube propre lors du dernier lavage. Eluer les billes comme décrit dans le protocole principal. Cette IP constitue l'IP de contrôle

4- Terminer l'IP spécifique (incubation avec les billes, lavages et élution)