



Manipulation de liquides

Clonage automatique et expression de protéines en laboratoire de service

Par Tobias Häßner / Tecan Deutschland GmbH – Email : tobias.haessner@tecan.com – Web : www.tecan.com

Contact France : Tecan France - Tél : +33 472760480 - Fax : +33 472760499 - Email : tecan.france@tecan.com

Une plate-forme de manipulation de liquides Tecan simplifie les applications du laboratoire High Throughput Expression Laboratory (HiTEL) de l'Université de York. Ce laboratoire est spécialisé dans le clonage et l'expression de protéines à grande échelle.

La biotechnologie évolue à un rythme effréné : les chercheurs parviennent à décoder un génome complet en quelques jours seulement. Cela crée un flux de nouvelles connaissances dont l'application dans les secteurs pharmaceutique et médical n'en est qu'à ses débuts. En même temps, le secteur de la santé se voit de plus en plus contraint de prendre des mesures de réduction des coûts. Grâce à des procédures de test rapides et sûres, les opérations de recherche et développement et de diagnostic clinique peuvent se dérouler plus efficacement. Des technologies automatisées, capables de traiter un grand nombre d'échantillons en un laps de temps réduit, de manière précise et reproductible, sont de plus en plus demandées.

Au centre du laboratoire High Throughput Expression Laboratory (HiTEL) de l'Université de York, se trouve également un robot. HiTEL qui a été créé il y a deux ans et demi dans le cadre d'un projet commun des services de biologie et de chimie. Le clonage de gènes et l'expression de protéines y sont effectués à grande échelle. Utilisé par les scientifiques de l'Université de York [2], ce laboratoire offre également ses infrastructures à des organismes externes. En outre, HiTEL participe à SPINE II (www.spine2.eu), une initiative internationale pour l'identification des structures de protéines, ainsi qu'au projet Bacillus Systems Biology (BaSysBio, http://www.basysbio.eu/). A l'heure actuelle, BaSysBio est l'un des plus importants projets de recherche européens dont le but est d'approfondir les connaissances des principaux processus biologiques.

Freedom EVO : manipuler les liquides avec plus de liberté

Pour automatiser les processus, HiTEL utilise le poste de travail Freedom EVO[®] 200 de Tecan, une plate-forme de manipulation de liquides multifonctionnelle conçue pour les applications à haut débit de grande envergure. Les systèmes Freedom EVO peuvent être personnalisés et utilisés dans les applications les plus diverses. Ils automatisent les processus pour l'analyse du génome et du protéome, le développement d'agents actifs et d'autres secteurs des sciences humaines. Grâce à l'intégration du logiciel Freedom EVOware, ils sont flexibles, conviviaux et évolutifs.

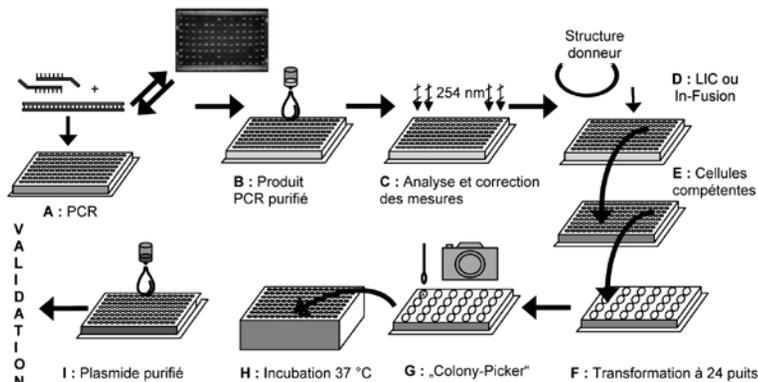
Illustration 1 : Système de manipulation de liquides Freedom EVO 200 de Tecan au laboratoire HiTEL de l'Université de York.

Les scientifiques du laboratoire HiTEL ont équipé la plate-forme Freedom EVO 200 d'un bras de manipulation de liquides à huit canaux et d'un bras de manipulation robotisé pour cloner rapidement des gènes (voir Illustration 1). Le processus de clonage se déroule via le « Ligation Independent Cloning » (LIC) [1] ou à l'aide de la méthode appelée « InFusion™ Cloning » (société Takara). La plate-forme Freedom EVO est également utilisée en association avec un système de type « Colony Picker » pour exprimer les protéines dans des cellules de bactéries ou d'insectes.

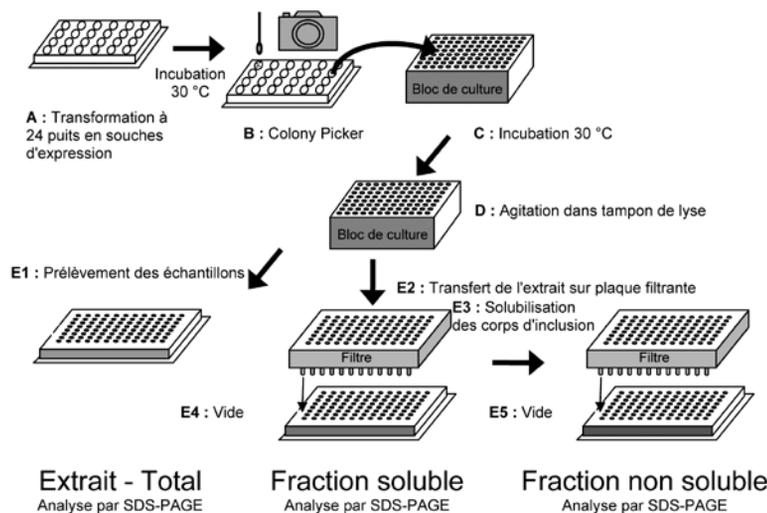
Clonage automatique

En quelques étapes, HiTEL peut cloner simultanément jusqu'à 96 séquences d'ADN dans des vecteurs d'expression (voir Illustration 2). Plusieurs vecteurs avec des étiquettes différentes (HIS-, HIS-GST, HIS-MBP, HIS-IM9, HIS-GFP, gp64-HIS) sont disponibles pour l'expression d'une bactérie, d'un insecte ou d'un baculovirus. Le protocole suivant (Illustration 2) pour les vecteurs HIS *Escherichia coli* peut facilement être adapté à d'autres vecteurs et cellules.

Les chercheurs développent d'abord l'amorce à l'aide d'un programme de conception interne [3]. La plate-forme Freedom EVO amplifie ensuite les fragments d'ADN par PCR (Illustration 2A). Après avoir vérifié la pureté et la taille des produits PCR sur des gels d'agarose, les chercheurs de HiTEL les purifient également dans le système Freedom EVO (kit de purification PCR QIAquick[®] 96 de Qiagen[®], Illustration 2B). Les concentrations de fragment sont ensuite quantifiées et les valeurs normalisées (Illustration 2C) afin d'optimiser la quantité de produits PCR pour chacun des 96 essais de clonage. Puis, le système Freedom EVO ligature les fragments PCR et les transforme en cellules d'*E. coli* (Illustrations 2D-2F) (toutes les structures contiennent une séquence qui code six étiquettes HIS N terminaux permettant de vérifier l'expression et de purifier les protéines). La plate-forme Freedom EVO place les échantillons sur des plaques gélosées à 24 puits contenant un antibiotique. Ces plaques sont retirées du système de manipulation de liquides et incubées jusqu'au lendemain (37 °C). Un robot de type « Colony Picker » (KBiosystems) transfère ensuite les cellules dans des blocs à puits profonds contenant un milieu de culture de 2,5 ml et un antibiotique (Illustration 2G). Après une nouvelle incubation toute la nuit avec agitation à 37 °C (Illustration 2H), les blocs sont centrifugés. L'ADN plasmidique est extrait des culots de centrifugation dans la plate-forme



Processus de clonage automatique. Toutes les étapes (à l'exception du « Colony Picking ») sont effectuées sur la plate-forme Freedom EVO 200 de Tecan.



Processus d'expression d'une bactérie. Toutes les étapes (à l'exception du « Colony Picking ») sont effectuées sur la plate-forme Freedom EVO 200 de Tecan.

Freedom EVO (kit MiniPrep DirectPrep[®] 96, Qiagen, Illustration 2I).

A l'aide de la digestion par enzyme de restriction, les scientifiques vérifient si le fragment PCR cloné présente la taille souhaitée. Si tel est le cas, ils envoient les plasmides au séquençage pour s'assurer que les produits PCR ont été correctement clonés.

Illustration 2 : Processus de clonage automatique. Toutes les étapes (à l'exception du « Colony Picking ») sont effectuées sur la plate-forme Freedom EVO 200 de Tecan.

Expression de protéines à haut débit

Après un clonage réussi, les fragments de gène peuvent être exprimés à l'aide du système de manipulation de liquides (voir Illustration 3). Pour ce faire, la plate-forme transforme d'abord les plasmides en souches d'expression et place les cellules sur des plaques gélosées à 24 puits où elles sont incubées à 30 °C jusqu'au lendemain (Illustration 3A). Ensuite, le « Colony Picker » (KBiosystems) prélève les cellules (Illustration 3B) et les inocule dans des blocs à puits profonds contenant un milieu de culture (Illustration 3C). Après une nouvelle incubation toute la nuit avec agitation, les cellules sont agglomérées par centrifugation et lysées avec des agents réactifs BugBuster[®] (Novagen[®]) (Illustration 3D). Grâce à une technique de filtrage spéciale du système Freedom EVO, les chercheurs analysent les échantillons (Illustration 3E 1-5) afin de déterminer la proportion de protéines solubles et insolubles dans l'ensemble des protéines. Dans les fractions, ils vérifient la pureté et la taille des protéines exprimées par

SDS-PAGE et les identifient avec des anticorps anti-HIS en utilisant la technique de Western Blotting. Si les protéines sont exprimées correctement à petite échelle, le processus est généralement transposé à plus grande échelle. Des bioréacteurs de plus de 50 l sont disponibles pour les systèmes d'expression de bactéries et permettent de traiter jusqu'à 50 mg de protéine purifiée. Pour les cellules d'insectes, des bioréacteurs de 10 l à usage unique (Single Use Bioreactor Bags) sont utilisés.

Illustration 3 : Processus d'expression d'une bactérie. Toutes les étapes (à l'exception du « Colony Picking ») sont effectuées sur la plate-forme Freedom EVO 200 de Tecan.

Criblage d'expression sur mesure

Depuis peu, un service sur mesure a été ajouté à la gamme de HiTEL pour le criblage d'expression automatique. Dans l'ensemble, huit échantillons par expérience peuvent être testés dans 24 conditions d'expression différentes grâce à l'immunodétection de la fraction de protéine soluble et complète. De cette façon, plusieurs paramètres (lignée cellulaire, système d'induction, température et temps) peuvent être modifiés individuellement. Cela permet donc de tester 384 conditions d'expression par expérience.

Bibliographie

- [1] Alzari P. M. et al. (2006): Implementation of semi-automated cloning and prokaryotic expression screening: the impact of SPINE. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 62: 1103-1113.
- [2] www.york.ac.uk/depts/biol/tf/hitel/index.htm.
- [3] Ashton, P., Technology Facility, University of York.



Système de manipulation de liquides Freedom EVO 200 de Tecan au laboratoire HiTEL de l'Université de York.