

Des solutions propres: Eau pour la purification de glutathion-S-transferase (GST) par chromatographie d'affinité

Jan Erwig, M.Sc. - Centre de recherche Schwann-Schleiden de biologie moléculaire de la cellule, département de biologie cellulaire des plantes, Georg-August Universität Goettingen, Allemagne

Dr Elmar Herbig - Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG - Goettingen, Allemagne – www.sartorius.com

La chromatographie d'affinité est une technique de chromatographie qui permet d'isoler des protéines dans des solutions. Le principe de base⁽¹⁾ est utilisé dans des laboratoires depuis un certain temps déjà. L'utilisation de systèmes FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) permet d'obtenir des protéines d'intérêt très pures et en grande quantité.

Cet article décrit les expériences qui ont été menées en vue de la purification de la protéine glutathion-S-transferase (GST). Ces expériences ont été réalisées dans le cadre de travaux destinés à déterminer la fonction des protéines qui jouent un rôle dans l'interaction pathogène-plante (*Arabidopsis thaliana*). La GST est ajoutée comme étiquette (ou tag) à des protéines pour permettre de les purifier par chromatographie d'affinité. Les GST jouent un rôle important lors de la détoxification de substances organiques externes (xénobiotiques). (Pour plus de détails sur la fonction et la régulation des GST dans les plantes, voir⁽²⁾). La propreté des substances utilisées est primordiale lors de la purification de cette protéine. Il est donc nécessaire de préparer tous les produits chimiques et toutes les solutions avec de l'eau ultrapure.

Principes de la chromatographie d'affinité

Pour pouvoir effectuer la purification, on utilise des méthodes biomoléculaires (entre autres clonage et transformation) pour ajouter une étiquette supplémentaire à la protéine d'intérêt et ainsi obtenir une protéine recombinante. La chromatographie d'affinité permet de purifier une quantité la plus grande possible de cette protéine recombinante. À cet effet, il est souvent nécessaire de transformer (cloner) au préalable la construction génétique dans des systèmes bactériens et de l'y surexprimer. La plupart du temps, la bactérie *Escherichia coli* sert d'organisme hôte, mais il est également possible d'utiliser des souches

de bacilles ou des systèmes non bactériens tels que des levures, des cellules d'insectes, de mammifères ou de végétaux⁽³⁾. La purification repose sur l'interaction spécifique entre deux partenaires de réaction : d'une part, l'étiquette protéique et d'autre part, un ligand ou anticorps fixé à une matrice de façon covalente. La protéine recombinante (ou l'étiquette) se lie spécifiquement à ce ligand. Après le lavage des protéines non spécifiques, la protéine d'intérêt recombinante peut alors être éluée de manière spécifique par un compétiteur (exemple, voir **figure 1**).

Le choix de la matrice de la colonne dépend ici de l'étiquette choisie. Cette dernière doit répondre à différentes exigences : spécificité élevée avec la matrice, détectabilité facile, élution avec des substances de faible poids moléculaire et possibilité d'obtenir des protéines de fusion N-terminales et C-terminales. De plus, les étiquettes doivent également avoir le moins d'effet possible sur la structure tertiaire et ne pas influencer l'activité biologique de la protéine⁽⁴⁾. Dans l'exemple montré ici, la glutathion-S-transferase (GST) est purifiée d'un extrait de cellules à l'aide d'une matrice contenant du glutathion. La GST a une taille d'environ 26 kDa et est donc bien plus grande par exemple qu'une étiquette poly-histidine (1 kDa). Les étiquettes de plus grande taille ont pour avantages de permettre une solubilité potentiellement meilleure de la protéine recombinante et une purification plus spécifique. Beaucoup d'étiquettes polypeptide plus courtes sont purifiées avec des matrices auxquelles des protéines non spécifiques peuvent se lier à un degré moindre. Ainsi la fraction purifiée est moins pure, comparée par exemple à l'étiquette GST. La plupart du temps, on élue les protéines recombinantes liées grâce à la liaison compétitive d'un ligand libre ou bien en modifiant la valeur de pH ou la concentration en sel. Notre exemple montre la purification de la GST par Protein Liquid Chromatography. En raison de la

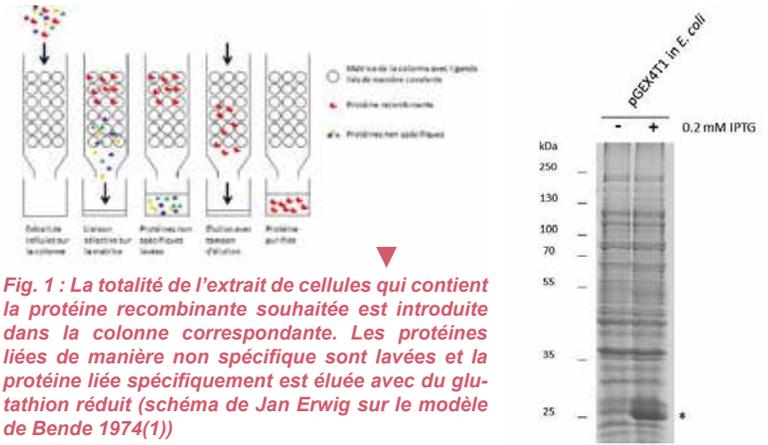


Fig. 1 : La totalité de l'extrait de cellules qui contient la protéine recombinante souhaitée est introduite dans la colonne correspondante. Les protéines liées de manière non spécifique sont lavées et la protéine liée spécifiquement est éluée avec du glutathion réduit (schéma de Jan Erwig sur le modèle de Bende 1974(1))

Fig. 2 : SDS-Page d'un gel de polyacrylamide à 10% sur lequel l'extrait total de cellules SDS des cellules d'E. coli non induites (-) et induites (+) a été appliqué. Gel coloré avec du bleu de Coomassie colloïdal. GST indiquée par *

construction complexe du système, il est indispensable de travailler avec précision et surtout proprement, mais aussi de veiller à ce que les matières utilisées, y compris l'eau, soient extrêmement pures. Dans le cas contraire, des valeurs de pH changeantes et des concentrations en sel variables risqueraient d'influencer le comportement de liaison et d'élution et par conséquent de fausser les résultats. La GST liée est éluée de la colonne avec du glutathion réduit et récupérée en différentes fractions. La pureté de ces fractions est ensuite examinée.

Matières et méthodologie

Pour la purification, on a inoculé une culture liquide avec des cellules d'E. coli TOP10 qui ont été transformées avec le vecteur d'expression pGEX4T1 et on l'a ensuite laissé se développer jusqu'à une densité optique OD600 ~0,6.

On a alors ajouté l'inducteur (IPTG) avec une concentration finale de 0,2 mM et on a secoué la culture pendant 4 heures à 28°C. 1 ml de culture a été prélevé avant et après l'induction pour être contrôlé. La culture liquide a ensuite été centrifugée et le culot cellulaire a été resuspendu et lysé dans un tampon phosphate salin (PBS) froid qui contenait du PMSF et du lysozyme. Le lysat cellulaire a ensuite été centrifugé à 24000 x g. Des échantillons de contrôle ont été prélevés après chaque étape. Après cela, le surnageant a été transféré et dégazé dans un bain à ultrasons. La purification a été effectuée et analysée dans un système de chromatographie d'affinité. Étant donné que le système mesure également l'absorption des UV de l'échantillon pendant la purification, il est possible d'identifier la

protéine d'intérêt grâce à une augmentation de l'absorption des UV lors de l'élution avec du glutathion réduit. La protéine purifiée a été recueillie dans des fractions de 200 µl. Pour l'analyse ultérieure à l'aide de SDS-PAGE, on a mélangé 20 µl d'une ou de deux fractions de pic groupées et 4 tampons de charge SDS et on les a ensuite chargés sur un gel de polyacrylamide à 10%.

On a ensuite coloré le gel avec du bleu de Coomassie colloïdal (cf. 5). La totalité des tampons, solutions et milieux utilisés lors des expériences ont été préparés avec de l'eau ultrapure provenant d'un système arium® pro (Sartorius).

Résultats

Pour analyser l'expression de la protéine d'intérêt, on a cassé des cellules induites et non induites d'E.coli directement dans du SDS et on les a séparées à l'aide de SDS-PAGE dans un gel de polyacrylamide à 10% (voir **fig. 2**). La GST a une masse moléculaire d'environ 26 kDa. Les cellules induites montrent ici une quantité nettement plus grande d'une protéine de la même taille (cf. **fig. 2** : *). Les cellules induites ont ensuite été lysées et le lysat cellulaire a été séparé par centrifugation dans des fractions insolubles et solubles (voir **fig. 4**). La purification d'une protéine par chromatographie d'affinité suppose que la protéine à purifier puisse être dissoute dans une phase liquide. La solubilité de la GST a été confirmée par SDS-PAGE suivi d'une coloration avec du bleu de Coomassie (**fig. 4**).

Pour la chromatographie d'affinité, on a utilisé la fraction soluble de la protéine. Le logiciel permet de suivre la purification en temps réel (chromatogramme : **fig. 3**). La charge de la colonne avec l'échantillon de protéine entraîne une augmentation de l'absorption d'UV (cf. **fig. 3, ligne bleue**), puis la valeur des UV diminue quand la charge est terminée. Dans le premier tiers des fractions d'élution, la GST est reconnaissable au net pic dans l'absorption d'UV (**fig. 3, astérisque**). Après la purification, on a analysé le taux de protéine et la pureté des fractions respectives à l'aide de SDS-PAGE. Les contrôles respectifs (extrait total de cellules, extrait total de cellules après lyse, surnageant et protéines non liées) ainsi que les fractions à l'intérieur (A7-B7) et à l'extérieur (A4 et C4) du pic d'UV ont été chargés. On peut voir que les fractions de pic contiennent une grande quantité de la protéine d'intérêt et que la protéine est d'une grande pureté (**fig. 4**). En comparaison avec les contrôles, on peut reconnaître, à 26 kDa, une bande de protéine nette qui présente le taux de protéine le plus élevé dans les fractions de pic A11-B12. En même temps, dans la comparaison du surnageant utilisé et du taux de protéine non liée, on peut voir que la GST exprimée et soluble a pu être presque entièrement purifiée. ▶▶▶

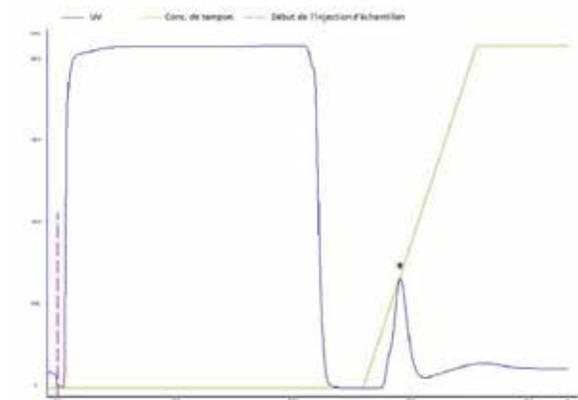


Fig. 3 : Diagramme de l'évolution de la chromatographie d'affinité. Le chromatogramme permet d'analyser directement les différents paramètres. L'absorption UV (bleu), la concentration du tampon d'élution (vert) et le début de la charge de l'échantillon sur la colonne sont indiqués. Pic d'élution indiqué par *

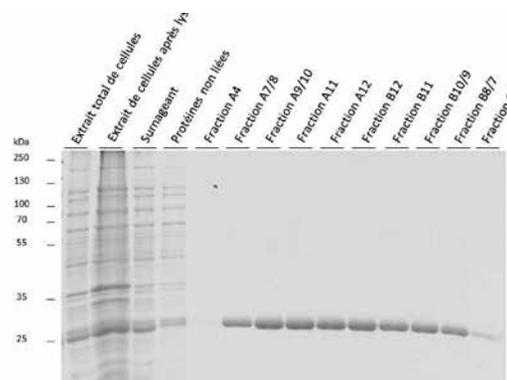
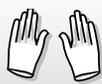


Fig. 4 : Gel SDS-PAGE 10% coloré avec du bleu de Coomassie colloïdal, montrant la GST purifiée dans des fractions de non pic et de pic. Contrôles : extrait total de cellules, partie insoluble après la lyse cellulaire (extrait de cellules après la lyse), partie soluble utilisée pour la chromatographie (surnageant) et protéines non liées



Conclusion

La purification et l'isolation de protéines spécifiques suivies de leur analyse biochimique est une méthode importante permettant de mieux comprendre la fonction des protéines. Les résultats démontrent que la protéine recherchée a pu être isolée sans équivoque comme bande différenciable. Une telle séparation distincte n'est possible que si on utilise des solutions parfaitement propres. Les solutions utilisées ont donc été préparées avec de l'eau ultrapure qui convient parfaitement aux expériences, car toutes les valeurs requises telles que la conductivité, le COT, le taux de sel sont constamment d'une excellente qualité. L'identification par électrophorèse sur gel n'a pas montré de stries gênantes, de mauvaise focalisation ni de bandes de protéines non spécifiques comme cela peut arriver en présence de sels ou de particules organiques chargées dans les solutions⁽⁶⁾. Pour obtenir des analyses fiables et reproductibles du gel, il faut veiller à utiliser des tampons et des solutions colorantes d'une grande propreté. Étant donné que la réalisation des expériences décrite ici (culture des bactéries, préparation des solutions, déroulement de la chromatographie et enfin électrophorèse sur gel) demande beaucoup de travail, est onéreuse et prend beaucoup de temps, il est d'emblée exclu d'utiliser de l'eau ou des produits chimiques qui n'ont pas la propreté requise. Pour ces raisons, il n'a pas été possible de comparer directement des eaux ultrapures de différentes qualités.

Comparée à de l'eau en bouteille, l'eau ultrapure fraîchement préparée doit, selon⁽⁶⁾, également permettre d'obtenir un plus grand nombre et une meilleure répartition des spots de protéines dans un gel 2D.

Remerciements

Les auteurs remercient tout particulièrement le professeur Dr Volker Lipka pour l'accompagnement scientifique de ces travaux ainsi que le Dr Elena Petutschnig pour la relecture du manuscrit et pour les discussions constructives sur ce sujet (tous les deux du Centre de recherche Schwann-Schleiden de biologie moléculaire de la cellule, département de biologie cellulaire des plantes, Georg-August Universität Göttingen, Allemagne).

Bibliographie

- [1] Bende, Heinz : Affinitäts-Chromatographie, Chemie in unserer Zeit, 8ème année, n° 1 (1974)
- [2] Marrs, Kathleen A. : The Functions and Regulation of Glutathione S-Transferases in Plants, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. , 47:127-158 (1996)
- [3] Terpe, K. : Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. Appl. Microbiol. Biotechnol. 72: 211-222, (2006)
- [4] Terpe, Kay : Protein-Affinitäts-Tags, BIOSpektrum 0.4 07, 13ème année (2007)
- [5] Dyballa, N. ; Metzger, S. : Fast and Sensitive Colloidal Coomassie G-250 Staining for Proteins in Polyacrylamide Gels. JoVE.30, (2009). <http://www.jove.com/details.php?id=1431>, doi:10.3791/1431
- [6] Tarun, M. ; Mabic, S. et Schrader, M. : Auf die Reinheit kommt es an – Laborwasserqualität beeinflusst die Proteinauftrennung, Laborpraxis pages 48-50, oct. (2011) Informations sur : <http://bit.ly/Affinitätschromatographie> Webcast sous <http://bit.ly/Proteinreinigung>

BUCHI présente sa nouvelle plateforme DYNAMIC dédiée à l'évaporation rotative

BUCHI France - www.buchi.com – France@buchi.com
Tél : 01 56 70 62 50 - Fax : +33 1 46 86 00 31

Le nouveau Rotavapor® R-300 conçu par BUCHI, leader mondial de l'évaporation rotative, révolutionne les méthodes de synthèse et d'analyse en laboratoire grâce à des innovations technologiques inégalées qui permettent de répondre aux besoins uniques de chaque utilisateur.

Concept de la plateforme unique et modulable

Cette solution novatrice s'appuie sur une plateforme flexible et évolutive qui s'adapte aisément aux exigences de chaque laboratoire, d'un simple évaporateur rotatif à un système d'évaporation complet (évaporateur, pompe et refroidisseur), perfectionné et totalement automatisé. Un large choix d'options permet de fournir des solutions sur mesure. Le système de montée/descente est ainsi disponible en version manuelle ou électronique. Quant au bain chauffant, il vous est proposé en deux versions : chauffage rapide pour ballons de 1L max., ou classique pour ballons de 5L max.

Unité intégrée : contrôle centralisé

Par contrôle centralisé, nous comprenons le suivi de tous les paramètres du processus, tels que la température du bain chauffant, du liquide de refroidissement et des vapeurs, de la vitesse de rotation et de la pression du système. Par conséquent, les opérateurs bénéficient d'un affichage unique et peuvent désormais évaluer le déroulement du processus de manière instantanée et procéder à des éventuels ajustements manuels concernant la vitesse de rotation, la température du bain chauffant et du liquide de refroidissement.

« Méthodes » et le Cloud BUCHI : automatisation et suivi de vos processus

La nouvelle fonctionnalité appelée « Méthodes » est une des innovations majeures du nouveau système Rotavapor® Dynamic. L'interface I-300 Pro permet l'automatisation en routine de vos processus. Pour des laboratoires qui suivent les procédures d'utilisation normalisées (SOPs), cette caractéristique représente une réelle valeur ajoutée car elle assure le contrôle automatique de chaque étape du processus, définie au préalable. Si une intervention manuelle est nécessaire, une notification directe peut être envoyée sur un smartphone.

Distillation automatique / Détecteur de Mousse

La nouvelle fonction AutoDest utilise un nouveau mode opératoire. Le vide est automatiquement régulé en tenant compte de la différence de température à l'entrée et à la sortie du condenseur, et le changement de température des vapeurs. Ces nouvelles fonctionnalités assurent la distillation automatique des formulations les plus complexes. Même les échantillons mousseux



ne représentent plus aucun défi, grâce au détecteur de mousse positionné à l'entrée du ballon.

Simplicité d'opération

Lors du développement de cette nouvelle solution, notre souci premier a été l'ergonomie. A l'instar des précédentes générations, le Rotavapor® R-300 est disponible avec sept réfrigérants différents et de nombreuses verreries conçues pour répondre aux diverses problématiques telles que les réactions reflux, l'extraction Soxhlet ou les échantillons mousseux.

Une source de vide parfaitement silencieuse : la V-300

Pour accompagner le nouveau Rotavapor® R-300, BUCHI lance également la nouvelle pompe à vide V-300. Parfaitement intégrable sur le système d'évaporation, la pompe V-300 assure un contrôle centralisé grâce aux Interfaces I-300 ou I-300 Pro et impressionne par un fonctionnement ultrasilencieux.

Recondensation respectueuse de l'environnement

Le système Rotavapor® R-300 est complété par les refroidisseurs à circulation F-305, F-308 ou F-314, selon la capacité de refroidissement nécessaire, dimensionnés spécifiquement pour l'évaporation. Le mode ECO garantit des économies d'énergies grâce à la mise en veille des refroidisseurs en cas de non utilisation.

Le nouveau système Rotavapor® R-300 se distingue par son ergonomie et sa flexibilité hors pair qui assurent un fonctionnement optimal des processus d'évaporation.

BIOSPA 8

automated incubator



Partez en confiance, vos cellules sont en bonnes mains.

Il est tard. Vous êtes fatigué. Et demain est une autre longue journée.

Pour les dosages cellulaires sur plusieurs jours, l'incubateur automatisé BioSpa 8 est la solution idéale. Il maintient les cellules en conditions optimales et exécute l'ensemble des étapes expérimentales. Incubation, lavage, distribution de réactifs, lecture de plaque ou imagerie automatique, tout est intégré et automatisé. Equipé d'un système de notifications automatique BioSpa 8 vous assure du succès de vos expériences sur cellules en toute sérénité.

- incubation
- lavage
- distribution
- lecture
- imagerie



Think Possible

BioTek®

BioTek France

BioTek Instruments SAS
50 avenue d'Alsace, 68025 Colmar Cedex
Tel: 03 89 20 63 29, Fax: 03 89 20 43 79
info@biotek.fr, www.biotek.fr

BioTek Switzerland

BioTek Instruments GmbH
Zentrum Fanghöfli 8, 6014 Luzern
Tel: 041 250 40 60, Fax: 041 250 50 64
info@biotek.ch, www.biotek.ch