

Manuel de travaux pratiques de biologie
chimique et de biochimie utilisant
l'expansion du code génétique

MANUEL DE TRAVAUX PRATIQUES DE BIOLOGIE CHIMIQUE ET DE BIOCHIMIE UTILISANT L'EXPANSION DU CODE GÉNÉTIQUE

ECAMPUSONTARIO

LAT MULTILINGUAL



Manuel de travaux pratiques de biologie chimique et de biochimie utilisant l'expansion du code génétique Copyright © 2023 by eCampusOntario is licensed under a License Creative Commons Attribution - Pas d'utilisation commerciale 4.0 International, except where otherwise noted.

TABLE DES MATIÈRES

Couverture	vii
Page titre	ix
Droits d'auteur	x
Table des matières	xi

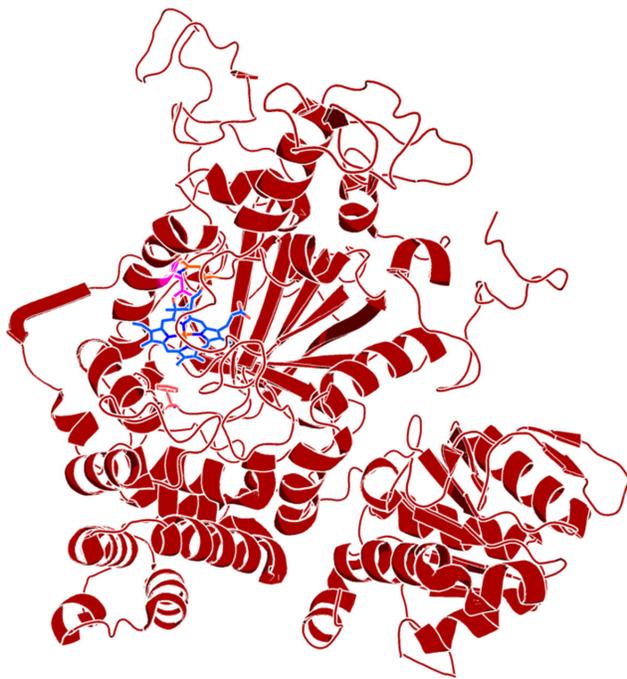
Partie I. Main Body

1. Contexte	1
2. Aperçu du calendrier provisoire des responsabilités du laboratoire	11
3. Objectifs de la semaine 1	15
4. Concepts de choix et d'expression des mutations	16
5. Objectifs de la semaine 2	20
6. Concepts d'expression des protéines	22
7. Méthodes d'expression des protéines	26
8. Concept pour l'électrophorèse SDS-PAGE	29
9. Méthodes pour l'électrophorèse SDS-PAGE	31
10. Objectifs de la semaine 3	34
11. Concepts de purification et de dessalage des protéines	35
12. Méthodes de purification et de dessalage des protéines	38
13. Méthode de lyse par microfluidiseur	39
14. Objectifs de la semaine 4	42
15. Méthodes pour les courbes étalons de protéines et l'électrophorèse SDS-PAGE	43
16. Objectifs des semaines 5 à 9	45
17. Concepts des dosages d'enzymes	46
18. Méthodes des dosages enzymatiques	48

Annexe 1 : Étalonnage des micropipettes	51
Annexe 2 : Séquences génétiques	52
Annexe 3 : Structures des acides aminés non canoniques disponibles	54
Annexe 4 : Milieux non inductifs ou à auto-induction	55
Annexe 5 : Liste de référence pour le matériel	57
Annexe 6 : Liste des sites, des acides aminés non canoniques et des plasmides disponibles	61
Licence Creative Commons	63
Recommandations pour les citations	64
Versionnage	66

BB494

Manuel de travaux pratiques de biochimie



Manuel de travaux pratiques de biologie chimique et de biochimie utilisant l'expansion du code génétique

RYAN MEHL, KARI VAN ZEE ET KELSEY KEAN

Université de l'Oregon
Corvallis, Oregon



Manuel de travaux pratiques de biologie chimique et de biochimie utilisant l'expansion du code génétique, écrit par Ryan Mehl, Kari van Zee et Kelsey Keen, bénéficient d'une licence internationale Attribution – Pas d'utilisation commerciale 4.0 de Creative Commons, sauf indication contraire.

Tableau de bord > Information sur le livre > Droits d'auteur > Avis de droits d'auteur > Éditeur de texte

Remplacer (éditeur de texte) :

La publication de ce manuel et sa mise à jour sont possibles grâce au soutien financier du campus virtuel de l'Université de l'Oregon.

Proposer une correction (bit.ly/33cz3Q1)

Confidentialité (open.oregonstate.edu/privacy)

Ce livre a été publié avec Pressbooks.

Table des matières

- Couverture
- 1. Contexte
- 2. Aperçu du calendrier provisoire des responsabilités du laboratoire
- 3. Objectifs de la semaine 1
- 4. Concepts de choix et d'expression des mutations
- 5. Objectifs de la semaine 2
- 6. Concepts d'expression des protéines
- 7. Méthodes d'expression des protéines
- 8. Concepts pour l'électrophorèse SDS-PAGE
- 9. Méthodes pour l'électrophorèse SDS-PAGE
- 10. Objectifs de la semaine 3
- 11. Concepts de purification et de dessalage des protéines
- 12. Méthodes de purification et de dessalage des protéines
- 13. Méthodes de lyse au microfluidiseur
- 14. Objectifs de la semaine 4
- 15. Méthodes pour les courbes étalons de protéines et l'électrophorèse SDS-PAGE
- 16. Objectifs des semaines 5 à 9
- 17. Concepts de dosage des enzymes
- 18. Méthodes de dosage des enzymes
- Annexe 1 : Étalonnage des micropipettes
- Annexe 2 : Séquences génétiques
- Annexe 3 : Structures des acides aminés non canoniques disponibles
- Annexe 4 : Milieux non inductifs ou à auto-induction
- Annexe 5 : Liste de référence pour le matériel
- Annexe 6 : Liste des sites, des acides aminés non canoniques et des plasmides disponibles
- Licence Creative Commons
- Recommandations pour les citations
- Versionnage

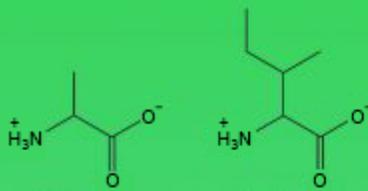
1.

1

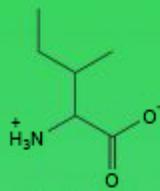
Contexte

Hydrophobe

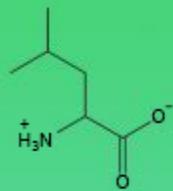
Chaînes latérales aliphatiques



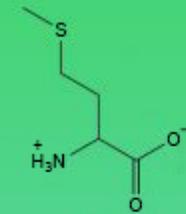
Alanine



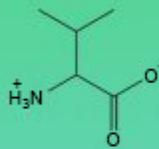
Isoleucine



Leucine

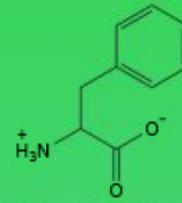


Méthionine

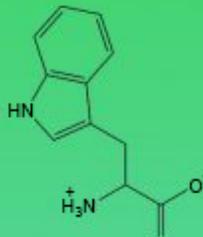


Valine

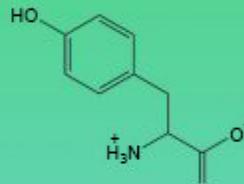
Chaînes latérales aromatiques



Phénylalanine



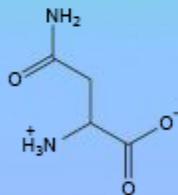
Tryptophane



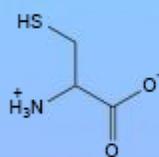
Tyrosine

Hydrophile

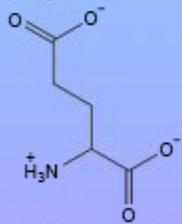
Chaînes latérales polaires neutres



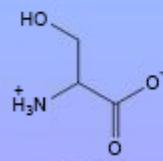
Asparagine



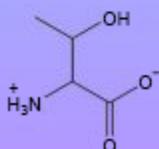
Cystéine



Glutamine

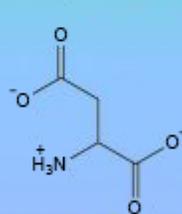


Sérine

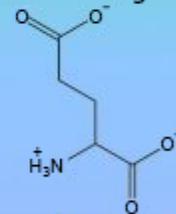


Thréonine

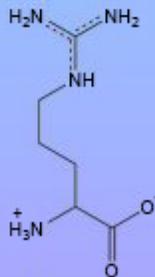
Chaînes latérales chargées



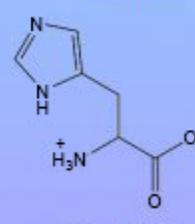
Aspartate



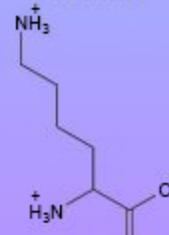
Glutamate



Arginine



Histidine



Lysine

Cas spéciaux



Figure 1.

Les protéines jouent un rôle essentiel dans la plupart des processus biologiques, notamment en tant que catalyseurs de réactions physiologiques, régulateurs de ces réactions ou cadre structurel autour duquel ces processus peuvent se produire. L'organisation complexe des diverses fonctionnalités des protéines dans l'espace 3D permet aux organismes vivants de disposer d'une surprenante gamme de fonctions. La compréhension de cette relation intime entre la structure et la fonction est au cœur de la compréhension du monde naturel et la clé de son contrôle.

La mutagenèse dirigée (le remplacement d'un codon d'acide aminé par un autre dans un gène) est un outil courant et pratique pour étudier la fonction des protéines. Cependant, malgré leur complexité fonctionnelle, les protéines ont une base structurelle assez simple : tous les organismes utilisent les mêmes 20 acides aminés pour construire les protéines, qui ont toutes une fonctionnalité chimique limitée (figure 1). Par conséquent, afin d'élargir la gamme d'études pouvant être réalisées sur les protéines, les acides aminés non canoniques (ou ncAA, aussi appelés acides aminés non naturels ou UAA), dont la fonctionnalité chimique est illimitée, sont des outils évidents pour étudier ces relations entre la structure et la fonction.

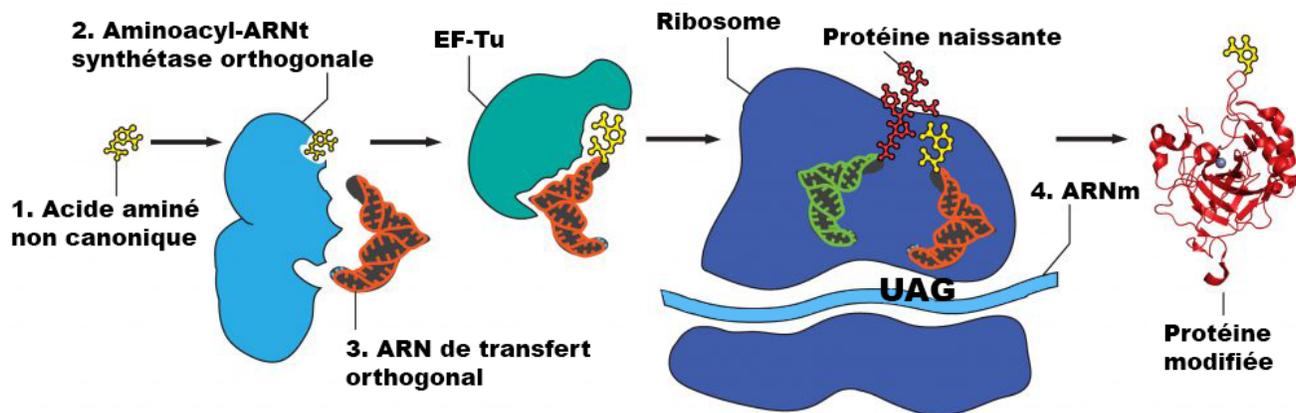


Figure 2. Survol des composants de l'expansion du code génétique. Chaque paire ARNt-RS génétiquement modifiée peut incorporer un ncAA de manière spécifique dans une protéine en réponse à un codon TAG. Lorsque le ncAA est retenu, il en résulte une protéine tronquée au niveau du codon TAG. Le facteur d'élongation thermo-instable (EF-Tu) est endogène à l'hôte *E. coli*.

La manipulation des protéines pour permettre l'utilisation des ncAA exige l'exploitation du dogme central de la biologie moléculaire : la transcription d'une séquence d'ADN en ARNm et la traduction de cette séquence d'ARNm en une chaîne peptidique repliable et fonctionnelle. Un changement à l'ADN causera donc un changement dans la protéine. Cependant, la nature du code génétique, comportant plusieurs codons dégénérés spécifiant le même acide aminé, ne laisse pas de codons « inutilisés » permettant d'ajouter facilement des ncAA *in vivo*. Le codon doit donc être « détourné » pour pouvoir spécifier le ncAA en remplaçant un codon naturel dans une séquence. Le codon TAG, le moins utilisé des trois codons STOP, joue ce rôle et peut facilement remplacer n'importe quel codon existant dans une séquence grâce à la mutagenèse dirigée. Afin

d'empêcher ce codon de signaler la fin de la chaîne peptidique, il doit fonctionner comme les autres codons « naturels » : une aminoacyl-ARNt synthétase (RS) doit lier un acide aminé à un ARNt personnalisé, qui ajoute ensuite l'acide aminé à la chaîne peptidique par l'intermédiaire du ribosome (figure 2). Étant donné que l'acide aminé n'est pas produit naturellement, il n'y a pas de paire RS/ARNt naturellement présente dans la cellule.

Pour faciliter l'incorporation spécifique du ncAA, la cellule doit donc disposer d'un ncAA-RS qui permet l'aminocyclation de l'ARNt couplé avec le ncAA uniquement, mais pas avec les acides aminés endogènes. Pour cela, il faut d'abord trouver dans la nature une RS et un ARNt utilisables par une cellule hôte (*orthogonaux*). Cette paire doit pouvoir fonctionner ensemble et avec le ribosome d'*E. coli*, et l'ARNt doit être capable de reconnaître le codon TAG de manière spécifique. Un nouveau ncAA non toxique peut être choisi pour les propriétés chimiques intéressantes qu'il peut introduire dans la protéine. Il faut ensuite sélectionner une RS capable de lier le ncAA pertinent lors de l'aminocyclation de l'ARNt. L'évolution dirigée des RS implique des cycles de sélection positive et négative sur une liste de RS (jusqu'à 108 membres), qui partagent toutes la même structure globale, mais présentent une variété de mutations concentrées autour du site de liaison de l'acide aminé. Les cycles de sélection positive consistent à transformer les membres de la liste en cellules contenant un plasmide avec le gène du chloramphénicol acétyl transférase (CAT), qui confère la résistance au chloramphénicol, contenant un codon TAG. Les cellules sont ensuite cultivées en présence du ncAA et de l'antibiotique chloramphénicol; les membres qui parviennent à incorporer le ncAA (ainsi que ceux qui incorporent des acides aminés endogènes) produisent une protéine CAT complètement fonctionnelle et peuvent survivre dans le milieu contenant du chloramphénicol. Pour exclure les membres restants qui ont utilisé un acide aminé endogène à la place du ncAA, un cycle de sélection négative est ensuite effectué. Les cycles de sélection négative consistent à isoler les plasmides contenant la RS des cellules ayant survécu à la sélection positive, puis à transformer les membres restants de la RS en cellules contenant un autre plasmide. Ce plasmide contient le gène toxique de la barnase avec un codon TAG en son milieu, qui encode une protéine toxique qui tue la cellule si elle est produite avec succès. Le ncAA est exclu du milieu dans les cycles de sélection négative, de sorte que les RS qui incorporent un acide aminé naturel en réponse au codon TAG ne survivent pas. Plusieurs cycles alternés de sélection positive et négative sont effectués jusqu'à ce que les RS restantes soient celles qui peuvent lier efficacement un ncAA à un ARNt (et donc produire une protéine contenant un codon TAG), mais qui ne peuvent pas lier un acide aminé naturel à cet ARNt.

Pour que la cellule produise la protéine TAG mutante et la paire ncAA-RS/ARNt nécessaire, il faut lui fournir les gènes qui les encodent. Les gènes sont introduits dans les cellules d'*E. coli* à l'aide des plasmides *pBad* et *pDule* (figure 3).

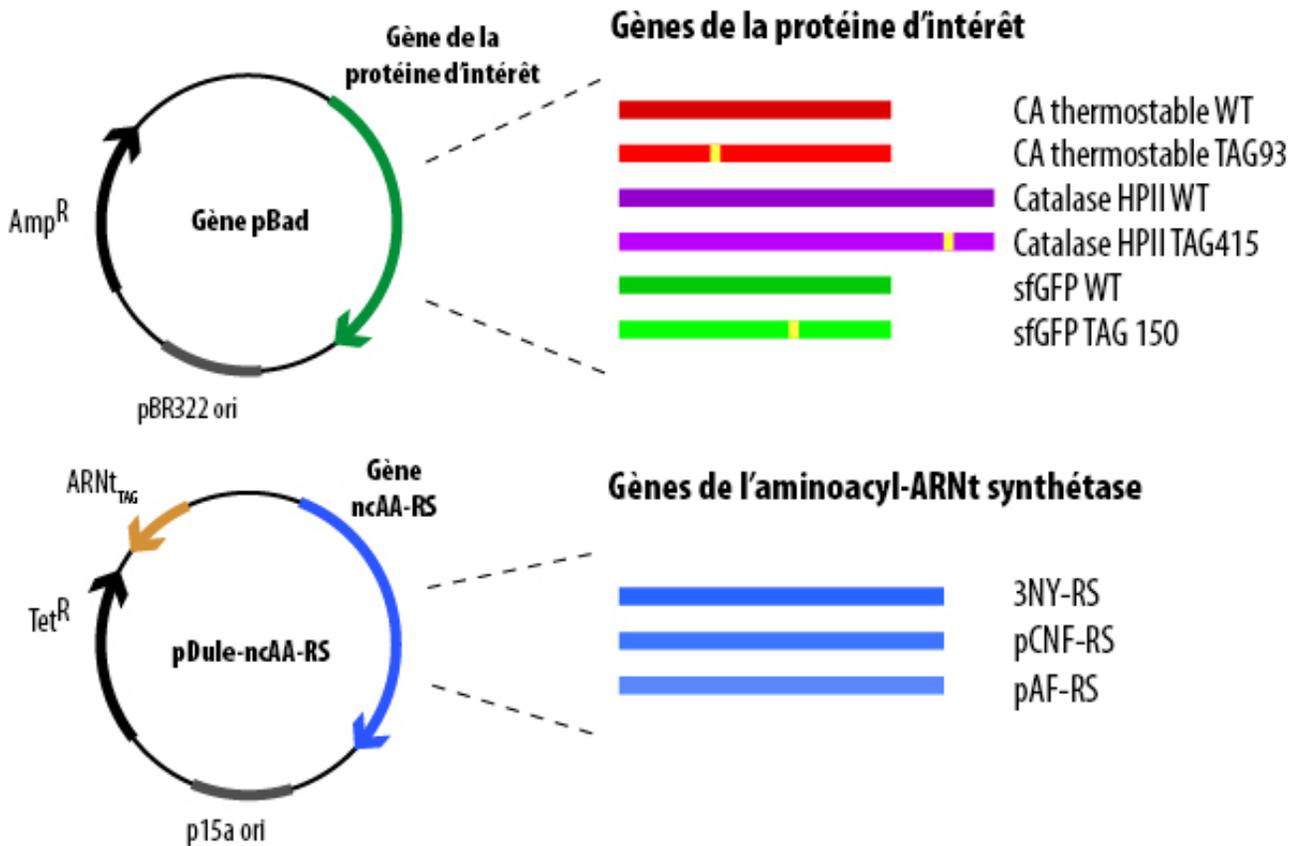


Figure 3. Gènes et éléments présents sur les plasmides pBad et pDule

Le plasmide *pBad* contient le gène (lui-même contenant un codon TAG) qui encode la protéine pertinente contrôlée par un promoteur induit par l'arabinose, qui est une origine de la réplication, et un gène qui encode la bêta-lactamase (qui confère une résistance à l'ampicilline). Lorsqu'ils sont clonés dans le plasmide pBad, les codons pour 6 histidines sont ajoutés à la terminaison N ou C du gène, ce qui permet la purification par affinité de la protéine surexprimée. Le plasmide *pDule* contient les gènes qui encodent la ncAA-RS et l'ARNt(CUA), une origine de réplication (qui doit être compatible avec l'origine de réplication de pBAD) et un gène qui encode la protéine TetA (qui confère la résistance à la tétracycline). Ces plasmides doivent tous deux être transformés dans la cellule pour que la protéine de pleine longueur contenant le ncAA soit produite. Pour vérifier que les cellules contiennent les deux plasmides avant de commencer la surexpression, les cellules sont cultivées en présence des antibiotiques ampicilline et tétracycline, ce qui garantit que seules les cellules contenant les deux plasmides pourront se développer dans le milieu.

Les cellules contenant les plasmides adaptés peuvent ensuite être induites pour surexprimer la protéine pertinente à l'aide d'un milieu d'auto-induction à base d'arabinose. Le plasmide *pBad* contient un système promoteur d'arabinose qui active l'expression du gène sur ce plasmide en présence d'arabinose. Le milieu d'auto-induction est conçu pour permettre aux cellules d'atteindre une densité élevée *avant* que la surexpression soit induite, afin qu'un plus grand nombre de cellules soit disponible pour surexprimer la

protéine lorsque l'induction commence. L'auto-induction du milieu est réalisée en utilisant des concentrations de sucre définies : lorsque les niveaux de glucose commencent à diminuer en raison du métabolisme cellulaire et de la croissance, les cellules commencent à absorber l'arabinose disponible. Bien qu'elles ne puissent pas le métaboliser pour poursuivre leur croissance, l'arabinose fonctionne comme un activateur du promoteur du plasmide *pBad*, induisant ainsi la surexpression de la protéine. L'électrophorèse sur gel des protéines brutes permet ensuite de vérifier facilement le succès de ce processus en contrôlant la taille de la protéine (de pleine longueur ou tronquée) produite en présence ou en l'absence de ncAA. La production d'une protéine de pleine longueur en présence d'un ncAA et d'une protéine tronquée en l'absence de ncAA indiquerait que le système ncAA-RS/ARNt(CUA) a été capable de reconnaître le codon TAG et d'incorporer le ncAA, mais pas les acides aminés endogènes.

La qualité d'une étude sur les protéines avec ncAA est définie par ce que l'on peut comprendre de la structure ou de la fonction de la protéine, ou par la nouvelle capacité conférée par la présence de ncAA dans la protéine. Étant donné que les ncAA élargissent le potentiel chimique limité des résidus d'acides aminés, une grande variété d'études et d'applications deviennent possibles pour explorer la nature à la fois sensible et résistante des protéines lorsqu'on utilise des ncAA. Selon l'emplacement et le type de substitution d'acide aminé, un large éventail d'effets sur la stabilité et/ou la fonction de la protéine peut se produire : les deux peuvent ne pas être touchées, la stabilité peut ne pas être touchée mais l'activité détruite, ou encore la protéine peut même ne pas se replier correctement, détruisant ainsi la fonction. Il a même été démontré que certains ncAA placés dans le site actif de l'enzyme *améliorent* la fonction de l'enzyme en modifiant l'électrostatique de la liaison ou de la catalyse. Si la stabilité et la fonction de la protéine ne semblent pas très perturbées par l'ajout du ncAA, les propriétés chimiques du ncAA peuvent être utilisées pour fournir des données pertinentes sur les états structurels de la protéine. Le tableau 1 présente des exemples de différents ncAA et d'études d'application.

Tableau 1. *Quelques-unes des familles de ncAA et leurs applications.*

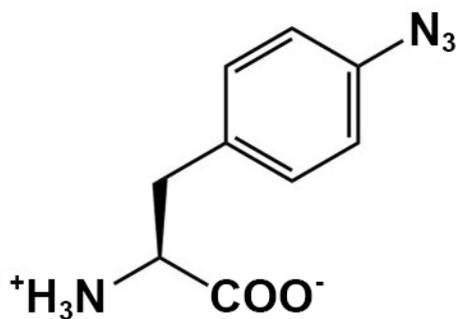
Que la fonction de la protéine soit améliorée ou apparaisse plus clairement, ou que la structure et la dynamique de l'enzyme soient mieux comprises, l'utilisation des ncAA a permis de réaliser un plus grand nombre d'études sur les relations entre la structure et la fonction des protéines.

Catégorie de ncAA

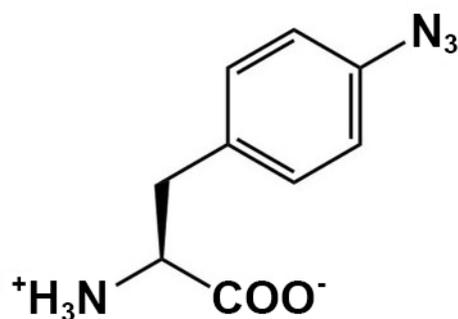
Exemple de structure

Applications

Photoréticulation

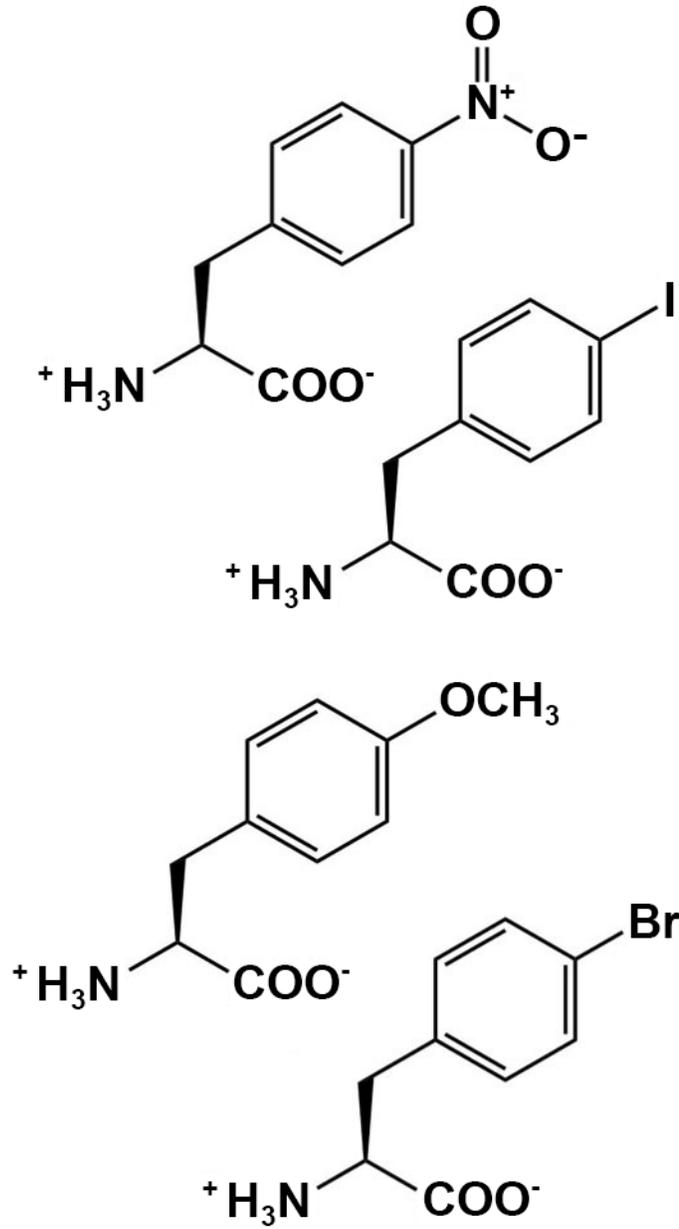
Aperçu des interactions entre protéines *in vivo*

Ligature bi-orthogonale



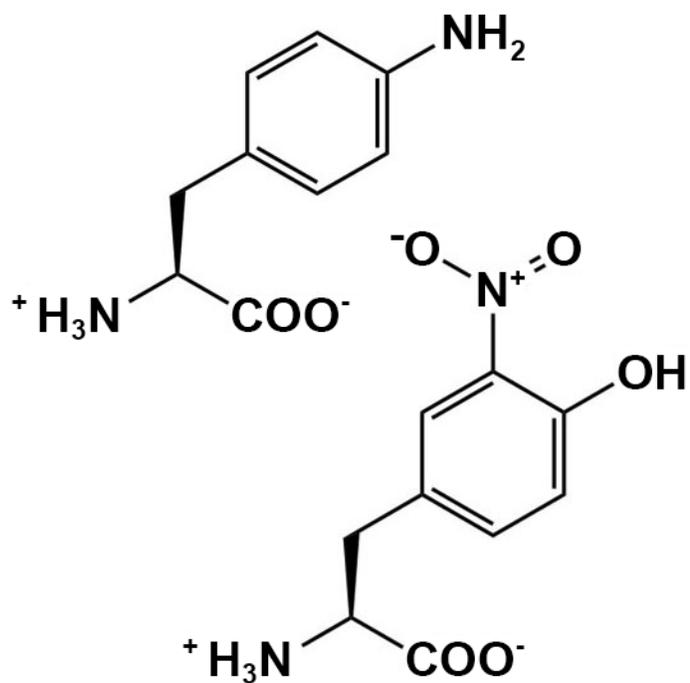
Conjugaison des fluorophores; fonctionnalisation de surface

Sondes d'évaluation de la taille et de la polarité



Altération du remplissage, de l'effet stérique et des autres interactions pour sonder les relations entre la structure et la fonction

Sonde du pH



Ajout,
suppression et
modification des
interactions de
liaison hydrogène
pour étudier les
relations entre la
structure et la
fonction

***Réflexions approfondies sur
les réflexions approfondies***

Tout au long de ce manuel, vous verrez des remarques intitulées « Réflexions approfondies » portant sur différents sujets. Elles ont été ajoutées pour vous aider à mieux comprendre votre projet et les techniques que vous utilisez, et pour vous fournir des éléments à prendre en compte lors de la conception de votre expérience, de l'analyse de vos résultats et de l'exécution des différentes étapes de ce laboratoire. Ces suggestions ne sont pas exhaustives; elles ont pour but de vous aider à réfléchir de manière critique à ce que vous faites et de guider votre conception et votre processus de réflexion.

Nous nous attendons à ce que vous ayez lu, réfléchi et répondu à ces questions par vous-même avant de demander de l'aide à l'enseignant ou à l'assistant d'enseignement.

2.

2

Aperçu du calendrier provisoire des responsabilités du laboratoire

Semaine Aperçu du calendrier provisoire des responsabilités du laboratoire
Se reporter à l'autre calendrier pour les échéances spécifiques de remise des travaux

Effectuer une recherche documentaire sur l'enzyme, sa séquence génétique, les ncAA potentiels et les sites d'incorporation.

- 1 Les étudiants auront besoin de leurs ordinateurs portables pour effectuer une recherche documentaire sur l'enzyme, sa séquence génétique, les ncAA potentiels et les sites d'incorporation.
- Télécharger et étudier la structure cristalline de l'enzyme.
 - Examiner les ncAA et les sites qui seront étudiés tout au long du semestre.
- Afin d'éviter la congestion dans l'utilisation du matériel pour les dosages cinétiques, trois groupes dans chaque section ont été assignés à l'anhydrase carbonique et trois groupes à la catalase.*

Exprimer la protéine de type sauvage et continuer à élaborer l'hypothèse et à planifier les expériences

- Mélanger le milieu à auto-induction et obtenir les cellules d'*E. coli* avec les plasmides d'expression adaptée pour que le processus d'expression de la protéine de type sauvage commence dans la nuit.
 - Élaborer une hypothèse expérimentale sur la base des ncAA et des sites que votre équipe a choisi d'étudier.
- 2
- Indiquer au professeur, avant le jeudi de la semaine 2 à 17 h, quels sont les sites protéiques et les ncAA qui seront exprimés, afin que les cultures de départ puissent être préparées pour la 3^e semaine du cours.
 - Commencer une recherche documentaire sur les procédures de dosage.
 - Récolter les cellules 48 heures après l'induction et les conserver à -80 °C.
 - Préparer les solutions SDS-PAGE.
 - Analyser la production de protéine de type sauvage par SDS-PAGE brute.

Exprimer les protéines mutantes ncAA et les protéines de type sauvage, purifier les protéines de type sauvage et continuer d'élaborer les dosages.

- Mélanger le milieu à auto-induction et obtenir les cellules d'*E. coli* avec les plasmides d'expression adaptée pour que le processus d'expression de protéines mutantes ncAA de type sauvage commence dans la nuit.
- 3
- Préparer les tampons de purification des protéines.
 - Se familiariser avec la procédure de dosage.
 - Éliminer les cellules d'*E. coli* pour purifier la protéine de type sauvage.
 - Créer les tampons de dosage ou de stockage.
 - Dessaler les protéines de type sauvage dans le tampon de dosage ou de stockage.
 - Récolter les cellules 48 heures après l'induction et les conserver à -80 °C.
 - Analyser la production de protéines mutantes ncAA par SDS-PAGE brute.

Purification des protéines mutantes ncAA et évaluation préalable des protéines de type sauvage.

- 4
- Analyser les protéines de type sauvage purifiées par SDS-PAGE.
 - Déterminer le taux de concentration en protéines.
 - Déterminer si la protéine pure est active.
 - Purifier les protéines mutantes ncAA des cellules.

Dosage cinétique préalable des protéines de type sauvage et évaluation préalable des protéines mutantes ncAA purifiées.

- 5
- Commencer les essais de dosage cinétique préalables avec les protéines de type sauvage.
 - Analyser les protéines mutantes ncAA purifiées par SDS-PAGE.
 - Déterminer le taux de concentration en protéine.
 - Déterminer si la protéine pure est active.

- 6 à 9 Continuer à concevoir et appliquer les études sur les protéines pures, notamment en testant les protéines de type sauvage et les protéines mutantes ncAA à l'aide de dosages cinétiques.
Nettoyer le laboratoire et faire les présentations par section du laboratoire.
- 10 . Le travail final et les carnets de notes doivent être rendus le lundi de la semaine des examens finaux à 16 h.
-

3.

3

Objectifs de la semaine 1

- Utiliser les ordinateurs portables pour lire et comprendre l'information de base sur l'expression de protéines contenant des acides aminés non canoniques (ncAA).
- Obtenir de l'information sur les gènes et les sites d'incorporation des ncAA disponibles au cours de ce semestre, et en discuter avec les autres étudiants.
- Déterminer la séquence d'acides aminés des protéines et les sites d'incorporation des ncAA.
- Créer un compte pour utiliser et installer la version éducative gratuite de PyMOL sur <http://pymol.org/edu/>
- Télécharger la structure cristalline des protéines dans la banque de données sur les protéines en ligne (PDB).
- Charger et étudier la structure de la protéine dans PyMOL (pour démarrer, consulter http://www.pymolwiki.org/index.php/Practical_Pymol_for_Beginners ainsi que le didacticiel PyMOL publié dans Canvas).
- Déterminer quels emplacements et quels ncAA seront incorporés/étudiés sur la base des recherches documentaires et de l'image dans PyMOL. Repérer les sites qui ont déjà été mutés. Finaliser la sélection de la protéine à l'étude ce semestre et commencer à élaborer des hypothèses pour les projets à long terme.
- Installer le matériel sur la paillasse du groupe, étalonner et stériliser les pipettes.
- Obtenir des directives sur l'expression des protéines à partir des cellules contenant des plasmides.
- Veiller à ce que les solutions des composants du milieu et l'équipement stérile nécessaires soient préparés et disponibles pour les expressions au cours de la semaine 2 (protéine de type sauvage) et de la semaine 3 (ensemble de protéines de type sauvage et de protéines mutantes ncAA).

4.

4

Concepts de choix et d'expression des mutations

Votre objectif est de concevoir une étude scientifique significative autour de l'un des enzymes qui ont été choisis pour vous : l'anhydrase carbonique II humaine thermostable ou la catalase HP11 d'*E. coli*. Traditionnellement, les biochimistes peuvent remplacer n'importe quel acide aminé d'une protéine par n'importe quel autre acide aminé naturel grâce à des méthodes de mutagenèse standard. Cette méthode est courante pour faciliter la compréhension du fonctionnement d'une protéine (régulation, liaison, etc.) et pour améliorer son utilité pour d'autres applications (stabilité, activité, etc.). Nous allons rompre avec cette tradition et vous permettre de sélectionner de nouvelles structures d'acides aminés (acides aminés non canoniques) pour étudier les protéines d'une manière qui n'était pas possible auparavant. Il serait possible de placer les ncAA n'importe où dans la protéine au moyen de l'expansion du code génétique, mais en raison des contraintes de temps de la mutagenèse, nous sommes obligés de ne sélectionner que certains sites pour que vous puissiez les explorer. La clé de cette activité est de déterminer ce qui est important dans les sites que nous avons sélectionnés pour vous en termes de stabilité, d'activité, de régulation des protéines, etc., puis de choisir parmi les nouvelles capacités chimiques des ncAA pour développer une étude scientifique significative qui n'a jamais été possible auparavant.

En utilisant la liste des sites de mutation et des ncAA disponibles fournie par l'enseignant (annexe 6), choisissez un ou deux sites à explorer par l'incorporation des ncAA. Vous serez en mesure de produire deux nouvelles protéines mutantes à étudier en parallèle de la protéine de type sauvage. Une recherche documentaire sur votre enzyme spécifique peut mettre en évidence des résidus particuliers dans cette enzyme qui sont censés influencer sur la structure ou la fonction de la protéine. Examinez attentivement les propriétés chimiques (c.-à-d. la chaîne latérale de l'acide aminé de type sauvage) qui existent déjà dans les sites et les nouvelles propriétés qui peuvent être introduites par les ncAA. Le site peut-il être un facteur dans la catalyse de l'enzyme? Est-il responsable du maintien des caractéristiques structurelles de la protéine ou participe-t-il à la transmission des changements structurels à différentes zones de la protéine? Il s'agit d'aspects importants à prendre en compte lors de la sélection des sites et des ncAA qui seront étudiés pendant toute la durée du semestre. Votre étude doit s'inscrire dans le contexte de la littérature scientifique.

Pour faciliter la production et la purification des protéines mutantes ncAA choisies, les gènes pertinents

– la variante thermostable de l'anhydrase carbonique II humaine (CA) et la catalase HP11 (HP11) d'*E. coli* – ont été synthétisés commercialement pour optimiser leur utilisation des codons pour l'expression dans *E. coli*. Les deux gènes ont été clonés dans le plasmide d'expression pBad. Le clonage supprime le codon STOP et ajoute une étiquette d'affinité riche en histidine à la terminaison C, ce qui permet de purifier facilement le produit protéique. Un codon STOP (TAG) a ensuite été incorporé à la place d'un codon dans le gène de type sauvage en utilisant des amorces mutées. Ces deux plasmides, l'un contenant le gène de type sauvage et l'autre la mutation TAG, permettront de produire respectivement une version de type sauvage et une version mutante ncAA de la protéine. Chaque groupe effectuera des études comparatives de la structure et de la fonction de l'ensemble des protéines pures, de type sauvage et mutante ncAA. Les séquences génétiques pertinentes pour chaque protéine se trouvent dans les tableaux correspondants de l'annexe 2 et les structures ncAA disponibles se trouvent à l'annexe 3. En utilisant ces séquences génétiques, il est possible de faire une estimation du poids moléculaire et de la séquence du produit protéique à l'aide de la ressource Web fournie. Ces données seront utiles pour les étapes ultérieures du processus de purification.

Réflexions approfondies : Structure des acides aminés

Pensez aux caractéristiques des acides aminés naturels que vous allez remplacer. On classe généralement les acides aminés naturels dans un certain nombre de catégories différentes : hydrophobes, hydrophiles, polaires, non polaires, chargés (négatifs ou positifs), non chargés, acides, basiques, aromatiques, aliphatiques (la liste est encore longue). Les acides aminés non canoniques ou non naturels peuvent être classés dans des catégories encore plus complexes et appartiennent souvent à plusieurs catégories différentes à la fois (par exemple, l'acide 4-bromophénylalanine est un acide aminé aromatique possédant un substitut halogène, ce qui permet des interactions électrostatiques que l'on ne trouve pas dans la nature). Il est important de comparer les caractéristiques de l'acide aminé naturel à celles de l'acide aminé non canonique par lequel vous allez le remplacer. Sont-ils tous les deux hydrophobes? Aromatiques? Chargés? Aromatiques et chargés? Si les caractéristiques sont différentes, comment cela affectera-t-il la structure et/ou la fonction de votre protéine? Si les caractéristiques sont similaires, le ncAA pourra-t-il maintenir la structure et/ou la fonction de votre protéine?

Une autre caractéristique importante de chaque acide aminé qu'il est important de prendre en compte (toujours en lien avec les relations entre structure et fonction) est la liaison hydrogène. Les liaisons hydrogène sont essentielles à la cohésion des protéines et vous devez vous demander quel impact votre nouvel acide aminé aura sur les interactions de liaison hydrogène. Votre acide aminé naturel est-il impliqué dans des liaisons hydrogène? Votre nouvel acide aminé non canonique peut-il participer à ces mêmes liaisons hydrogène? Il est possible qu'il ne puisse pas en former ou qu'il puisse en former de nouvelles. Ce n'est pas parce que deux éléments sont proches l'un de l'autre qu'il y aura forcément une liaison hydrogène! Vous devez tenir compte non seulement de la distance et de la proximité, mais aussi de la géométrie et de l'environnement de la liaison hydrogène (autres liaisons hydrogène, rôle de donateur ou de receveur, etc.) L'hydrophobie joue également un rôle dans ce raisonnement. La création de nouvelles liaisons hydrogène s'est avérée être une stratégie efficace pour améliorer la thermostabilité, comme dans le cas de l'anhydrase carbonique humaine. Et comme nous utilisons des acides aminés non canoniques, encore plus de liaisons sont possibles!

Matériel nécessaire (à obtenir pour la semaine 2)

Équipement

- Fioles stériles avec déflecteurs de 250 ml (1 pour la protéine de type sauvage)
- Embouts de pipette stériles
- Bouteilles et fioles stériles (250 ml)

- Microtubes à centrifugation stériles de 1,7 ml
- Tubes à culture à fond rond stériles de 14 ml pour l'expression du contrôle positif sfGFP

Préparation de cultures (la composition des milieux sera préparée et aliquotée par les assistants d'enseignement)

- H₂O stérile (traitée à l'autoclave dans un volume de 250 ml)
- Aspartate (5 %, pH de 7,5; ajuster le pH avec du NaOH, pour autoclave)
- Glycérol (10 % poids/volume; pour autoclave)
- Mélange de 18 AA (25x) (conservé à 4 °C)
- Sels minéraux 25x (« 25 x M »)
- Arabinose (20 % poids/volume, filtre stérile)
- MgSO₄ (1 M; pour autoclave)
- Glycérol (40 % poids/volume; pour autoclave)
- Solution de réserve de métaux traces (5 000x)
- Ampicilline (réserve 1 000x) (100 mg/ml dans H₂O; filtre stérile) (conservée à -20 °C)
- Tétracycline (réserve 1 000x) (25 mg/ml dans du DMF) (conservée à -20 °C)
- NaOH, 8 M
- Acides aminés non canoniques pertinents (sous forme de poudre)

Ressources et protocoles suggérés

- *Étalonnage des micropipettes* : voir l'annexe 1.
- PyMOL <http://pymol.org/edu/> et didacticiel PyMOL http://www.pymolwiki.org/index.php/Practical_Pymol_for_Beginners
- Banque de données sur les protéines <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>
- *Programme PyMOL sur la structure cristalline* : Dans la banque de données sur les protéines (ou PDB) en ligne, trouvez le fichier des protéines de type sauvage : l'anhydrase carbonique II humaine thermostable ou la catalase HPII d'*E.coli*. <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>
- *Détermination des séquences de protéines et calcul du poids moléculaire des protéines* : <http://db.systemsbio.net:8080/proteomicsToolkit/>
- *Préparation des milieux et expression des protéines* : Les grandes lignes de cette procédure sont présentées à la semaine 2. Pour une discussion plus approfondie sur la production, le contrôle et la purification des protéines mutantes ncAA, voir l'article suivant, disponible sur Canvas :

HAMMILL, J.T., S. MIYAKE-STONER, J.L. HAZEN, J.C. JACKSON, R.A. MEHL. *Preparation of site-*

specifically labeled fluorinated proteins for ^{19}F -NMR structural characterization, 2007, *Nature Protocols*, vol. 2 n° 10, p. 2 601 à 2 607.

5.

5

Objectifs de la semaine 2

- Obtenir des cellules d'*E. coli* contenant les plasmides d'expression des enzymes de type sauvage adaptés.
- Préparer le milieu d'auto-induction (laboratoire 1)
- Commencer l'expression de 40 à 48 heures des échantillons de protéines de contrôle de type sauvage et sfGFP.
- Déterminer le type de gel de polyacrylamide à utiliser pour le gel des protéines brutes (SDS-PAGE) en utilisant les données sur la structure anticipée de la protéine et le poids moléculaire (laboratoire 1).
- Préparer les tampons SDS-PAGE.
- Récolter les cellules et préparer les échantillons pour le gel de protéines brutes (laboratoire 2).
- Verser et effectuer le SDS-PAGE sur les échantillons bruts (laboratoire 2).
- Commencer une recherche documentaire sur les procédures de dosage afin de tester la cinétique de l'enzyme. Des ressources seront fournies sur Canvas.
- Analyser la production de protéines par SDS-PAGE
 - Séparer les protéines sur le gel de polyacrylamide
 - Fixer et colorer les protéines sur le gel
 - Réaliser une image numérique du gel
- Lire les procédures de purification des protéines.
- Préparer les tampons de purification.
- Affiner l'hypothèse et finaliser la sélection des mutations et des ncAA pour le projet de fin de semestre.

Avant la fin de journée du jeudi de la semaine 2 :

- **Informez le professeur de la protéine, des mutations et des ncAA qui seront utilisés.**

Réflexions approfondies sur le savoir-être en laboratoire

Maintenant que vous vous lancez dans la composante expérimentale de ce cours, il est important de prendre conscience des règles de savoir-être en laboratoire à adopter. Vous travaillez dans un espace de laboratoire partagé avec de nombreux autres étudiants, dont votre groupe de laboratoire, mais aussi les autres groupes de laboratoire de votre classe ET les groupes de laboratoire des autres sections, dont certains utilisent la même paillasse que vous. Vous devez tenir compte de toutes ces personnes ainsi que des enseignants et des assistants d'enseignement lorsque vous travaillez dans le laboratoire. Cela représente beaucoup de gens!

Voici quelques recommandations :

- **Nettoyez après votre passage.** Nettoyez votre paillasse et toutes les zones communes du laboratoire immédiatement après les avoir utilisées (cela comprend le nettoyage de la zone de pesée, le remplissage des boîtes d'embouts de pipettes, etc.)
 - **Faites preuve de courtoisie et de respect.** Respectez les membres de votre groupe et les autres personnes présentes dans le laboratoire. Respectez les affaires des autres; n'utilisez pas ni n'interférez avec les expériences ou les réactifs de quelqu'un d'autre.
 - **Préparez-vous.** On attend de vous que vos préparations soient faites avant la journée au laboratoire. Élaborez un plan à l'avance pour savoir ce que votre groupe souhaite accomplir en laboratoire et comment vous comptez vous y prendre pour y parvenir. Vous disposez d'un temps limité pour travailler en laboratoire. Le fait d'arriver avec un plan déjà prêt est non seulement respectueux pour les autres membres de votre groupe et les enseignants, mais vous aidera également à travailler de manière efficace.
 - **Utilisez les ressources du laboratoire à bon escient.** Les réactifs et les fournitures sont dispendieux et vos frais de laboratoire ne couvrent qu'une partie des coûts de fonctionnement de ce laboratoire réservé aux projets.
 - **Utilisez des étiquettes.** Toutes vos fournitures doivent être correctement étiquetées avec le nom de votre groupe et leur contenu. Cela permet non seulement d'aider les autres membres du groupe à trouver les réactifs nécessaires, mais aussi d'éviter les risques et les problèmes liés à la manipulation de réactifs inconnus en cas de déversement ou de nettoyage.
 - **Faites preuve de ponctualité.** Tout comme vous arriveriez à l'heure pour un cours magistral, on attend de vous que vous arriviez à l'heure et que vous soyez prêt à travailler dès le début du cours.
 - **Faites preuve de prudence.** Respectez toutes les procédures de sécurité adaptées et posez des questions si vous en avez.
-

6.

6

Concepts d'expression des protéines

Les protéines appropriées seront produites en faisant croître des cultures de cellules d'*E. coli* DH10B, qui contiennent différents plasmides utilisés en fonction de la capacité requise. Pour s'assurer que seules les cellules contenant les plasmides appropriés peuvent croître dans le milieu, elles doivent être cultivées en présence d'antibiotiques. La protéine de type sauvage sera produite à partir d'un plasmide pBad (pBad-gène), et les cellules contenant pBad doivent être cultivées en présence d'ampicilline. La protéine ncAA-mutante sera également produite à partir d'un plasmide pBad, qui contient le même gène mais avec un site TAG à l'un des codons (pBad-TAG-gène). De plus, pour produire des protéines avec des acides aminés non canoniques, il faut également ajouter une machinerie de traduction non naturelle. Cette machinerie non naturelle se trouve sur le plasmide pDule-RS, et les cellules contenant pDule doivent être cultivées en présence de tétracycline. En outre, l'acide aminé non canonique doit être ajouté dans le milieu parce que les cellules d'*E. coli* ne produisent pas naturellement les ncAA. Par conséquent, alors que les cellules productrices de protéines de type sauvage ne doivent être cultivées qu'en présence d'ampicilline pour produire des protéines de type sauvage, les cellules productrices de protéines mutantes ncAA devront être cultivées avec de l'ampicilline, de la tétracycline et l'acide aminé non canonique dans le milieu afin de produire la protéine mutante ncAA.

En tant que contrôle supplémentaire pour la surveillance de la production des protéines, l'expression de contrôles négatifs doit être exécutée pour chaque type de ncAA utilisé. Ces expressions permettent de s'assurer qu'aucun acide aminé naturel n'est utilisé par la synthétase et inséré dans le site TAG. L'expression des contrôles négatifs se fait en l'absence de ncAA dans le milieu; par conséquent, seules des protéines tronquées devraient être produites par ces expressions. En tant que contrôle positif pour votre média, vous exprimerez des cultures de 5 ml de la protéine fluorescente verte superfolder (sfGFP). Ces cellules contiendront uniquement le plasmide pBad-sfGFP (amp seulement) et deviendront vertes si le milieu a été préparé correctement.

Après environ 24 à 48 heures d'expression, les cultures cellulaires de grand volume devraient être saturées avec des cellules qui ont été induites pour surexprimer la protéine d'intérêt. La séparation des cellules du milieu et le stockage des culots cellulaires à -80 °C une fois l'expression terminée permettront de purifier ultérieurement la protéine à partir des cellules.

Remarque : Cette année, nous réalisons séparément l'expression et la purification des protéines de type sauvage et des protéines mutantes ncAA pour vous permettre de passer plus de temps à comprendre votre protéine et à développer une hypothèse expérimentale. Les équipes vont simplement faire pousser des cultures de leur protéine de type sauvage et d'un contrôle sfGFP pendant la semaine 2, puis l'ensemble des protéines de type sauvage et mutantes ncAA pendant la semaine 3. Dimensionner les composants du milieu de manière appropriée.

N'oubliez pas que ces instructions pour les volumes à préparer sont des lignes directrices : assurez-vous de comprendre les principes et de pouvoir ajuster la quantité de milieux que vous préparez et le volume de cultures que vous cultivez de manière adéquate. Ne préparez pas plus de milieux que nécessaire pour l'expression de cette semaine.

Matériel nécessaire

Équipement pour expression en cultures de 50 ml

- Fioles stériles avec déflecteurs de 250 ml (une pour le type sauvage, deux pour les protéines mutantes ncAA)
- Deux tubes à culture stériles pour l'expression du contrôle négatif
- Bouteilles stériles (150 ml, 250 ml, 500 ml)
- Embouts de pipette stériles
- Grande centrifugeuse
- Microcentrifugeuse
- Microtubes à centrifugation stériles de 1,5 ml
- Microtubes à centrifugation de type Oakridge
- Tubes à centrifugation coniques stériles de 50 ml
- Agitateur (température réglée à 37 °C)
- Pincettes pour agitateur (3 petites) pour chaque groupe; les assistants et les enseignants les fourniront

Préparation des cultures :

- Cultures de cellules de départ appropriées cultivées dans des milieux non inductifs (voir l'annexe 4)
- H₂O stérile
- Aspartate (5 %, pH 7,5)
- Glycérol (10 %)
- Mélange de 18 AA (25x) (conservé à 4 °C)
- Sels minéraux (25x)
- Arabinose (20 %) (conservé à 4 °C)
- MgSO₄ (1 M)
- Glucose (40 %)

- Métaux traces (5 000x)
- Ampicilline (réserve 1 000x) (100 mg/ml dans H₂O) (conservée à -20 °C)
- Tétracycline (réserve 1 000x) (25 mg/ml dans du DMF) (conservée à -20 °C)
- NaOH 8 M
- Acides aminés non canoniques d'intérêt

Ressources et protocoles suggérés

- *Préparation des milieux et expression des protéines* : Les grandes lignes de cette procédure sont présentées ci-dessous. Pour une discussion plus approfondie sur la production, le contrôle et la purification des protéines mutantes ncAA, voir l'article suivant :

Hammill, J.T.; Miyake-Stoner, S.; Hazen, J.L.; Jackson, J.C; Mehl, R.A. (2007) Preparation of site-specifically labeled fluorinated proteins for ¹⁹F-NMR structural characterization. *Nature Protocols*, vol. 2 n° 10, p. 2 601 à 2 607.

- Sélection des gels de polyacrylamide : La ressource suivante de Bio-Rad contient des concepts pertinents pour l'électrophorèse des protéines sur gel et peut être trouvée dans la zone de ressources de la littérature sur Canvas :

Réflexions approfondies sur l'exploitation du dogme central

Les détails de base de l'expansion du code génétique sont indiqués dans la partie « Contexte » de ce manuel de laboratoire. Le but de l'expansion du code génétique est d'incorporer un acide aminé non canonique dans un site spécifique dans une protéine de votre choix. Comment ça marche exactement? Comment le code génétique est-il facilité par l'ARNt? Qu'est-ce que l'anticodon sur l'ARNt orthogonal? Où dans la protéine votre acide aminé non canonique est-il incorporé?

L'expansion du code génétique nécessite au moins quatre composants différents. Quelles sont ces composants? Où doivent-ils être? Comment sont fabriqués ces composants? Que se passerait-il si l'un de ces composants manquait? Par exemple, que se passerait-il si l'acide aminé non canonique n'était pas ajouté dans vos milieux? Ou si la synthétase de l'ARNt orthogonal était manquante ou si une synthétase d'ARNt orthogonal incompatible était ajoutée?

Réfléchir à ces questions peut également vous aider à résoudre vos problèmes d'expression si les choses ne semblent pas se passer comme prévu.

Le manuel Bio-Rad Mini Protean Tetra Cell (en particulier la section 4.2) contient des protocoles pour la fabrication de solutions mères pour les gels et tampons pour la SDS-PAGE en Laemmli discontinu).

Réflexions approfondies sur la technique stérile

Le maintien d'une technique stérile est un élément clé du travail avec *E. coli* et la biologie moléculaire en général. Vous voulez que votre *E. coli* puisse pousser, et rien d'autre. Mais les germes sont partout! Et qu'est-ce qui ne voudrait pas pousser dans un bouillon agréable, chaud et aéré riche en nutriments? Afin d'empêcher d'autres choses de croître, nous utilisons la technique stérile (c.-à-d. tuer tout ce que nous ne voulons pas avec la chaleur ou l'éthanol). Pratiquer une bonne technique stérile vous aidera avant tout dans le cadre du laboratoire.

Mais au-delà de ce cours de laboratoire, la technique stérile peut s'avérer utile pour vous. Considérez n'importe quel type de pratique médicale, que vous soyez pré-médecine, pré-dentaire, ou quelqu'un qui visitera probablement un médecin à un moment de sa vie, la technique stérile limite la propagation des agents pathogènes et réduit vos chances de développer une maladie nocive. Réfléchissez soigneusement à la façon d'organiser votre espace de travail et vos outils pour maintenir la stérilité.

7.

7

Méthodes d'expression des protéines

Préparation du milieu d'auto-induction : Le milieu doit être préparé avec les solutions stériles et l'équipement stérile obtenus à la semaine 1.

CONSEIL : Toutes ces étapes doivent être effectuées en utilisant une technique stérile avec une flamme allumée. Les pipettes et la paille doivent être nettoyées avec de l'eau et de l'éthanol avant de commencer. Assurez-vous d'utiliser uniquement des embouts, des fioles, des pipettes, de l'eau et des milieux stériles.

Préparation du milieu d'auto-induction pour l'expression (100 ml). Mettez à l'échelle pour obtenir la quantité dont vous avez besoin pour votre expérience en fonction des quantités suivantes pour 100 ml. Préparez un mélange frais et ne prévoyez pas de stocker le milieu auto-inductif (MAI) en excès.

Aspartate (5 %, pH 7,5)	5 ml
Glycérol (10 %)	5 ml
Sels minéraux 25x	4 ml
Glucose (40 %)	0,125 ml
MgSO ₄ (1 M)	0,2 ml
Arabinose (20 %)	0,25 ml
Métaux traces (5 000x)	20 µl
Mélange de 18 AA (25x) conservé à 4 °C	4 ml

Ajoutez les antibiotiques appropriés (ampicilline à une concentration finale de 100 µg/ml et tétracycline à 25 µg/ml).

Ajoutez de l'eau stérile pour obtenir un volume final de 100 ml.

Volumes et fioles recommandés pour les expressions pendant les semaines 2 et 3:

Protéine de type sauvage 75 ml	Expression en fiole de 250 ml
Protéine ncAA 1 75 ml	Expression en fiole de 250 ml
Protéine ncAA 1 (contrôle négatif -ncAA) 5 ml	Expression en tube à culture
Protéine ncAA 2 75 ml	Expression en fiole de 250 ml

Protéine ncAA 2 (contrôle négatif -ncAA) 5 ml

Expression en tube à culture

Contrôle sfGFP sauvage (-ncAA) 5 ml

Expression en tube à culture

CONSEIL (EXEMPLE POUR 250 ml — METTEZ À L'ÉCHELLE SELON VOS BESOINS): Il est pratique de commencer avec une bouteille de 250 ml d'eau stérile et d'en retirer environ 50 ml en les plaçant dans un autre récipient stérile (pour une utilisation ultérieure). Ensuite, tous les composants du milieu peuvent être ajoutés à 200 ml d'eau stérile et complétés avec de l'eau stérile à un volume final de 250 ml. Ensuite, ajoutez 250 microlitres d'ampicilline à 100 mg/ml au milieu, puis placez 75 ml de celui-ci dans une fiole avec déflecteur de 250 ml pour l'expression des protéines de type sauvage. 175 microlitres de tétracycline à 25 mg/ml peuvent ensuite être ajoutés au milieu restant (175 ml), qui peut ensuite être réparti dans les fioles d'expression. Les ncAA seront ajoutés plus tard.

Chaque section de laboratoire doit utiliser le code couleur de ruban approprié pour étiqueter les fioles afin qu'il soit facile de les récupérer. Rappelez-vous qu'il y a 4 sections et plus de 80 étudiants et, certaines semaines, 80 à 100 fioles en activité.

Ajout de cellules provenant de cultures de départ :

Dans les fioles préparées (75 ml de milieu par fiole), ajoutez des cultures cellulaires saturées en milieu non inductif de la lignée cellulaire appropriée pour commencer les expressions. Diluez les cellules appropriées issues des cultures de départ de la nuit du 1/100^e au 1/200^e dans chaque fiole contenant 75 ml. Incubez ces cultures pendant 0,5 à 1 heure avant d'ajouter les ncAA (cette incubation peut être raccourcie pour certains ncAA).

Préparation et ajout des ncAA (semaine 3) :

La concentration recommandée pour les ncAA est une concentration finale dans le milieu d'expression > 1 mM. Les ncAA peuvent avoir besoin d'aide pour se dissoudre avant de les ajouter au milieu, selon les caractéristiques chimiques du ncAA. Il est recommandé de peser légèrement plus que la quantité appropriée de ncAA directement dans un microtube à centrifugation. Commencez par ajouter 0,5 ml d'eau stérile et mélangez – si le ncAA se dissout, ajoutez-le à la fiole d'expression appropriée. Si *la majeure partie* du ncAA se dissout, essayez d'abord d'ajouter 0,5 ml d'eau stérile. Si très peu de ncAA se dissout après le premier 1 ml, essayez d'ajouter 1 équivalent molaire de NaOH à partir de la solution mère à 8 M (ajoutez 5 µl de NaOH à 8 N à la fois et ne dépassez pas 20 µl au total). Trop de NaOH peut endommager certains des ncAA et causer des problèmes de croissance cellulaire. Une fois que les ncAA sont ajoutés à leurs fioles appropriées, laissez-les incuber tout en les agitant à 250-300 tours/minute à 37 °C jusqu'à 48 heures (cette longue incubation est conçue pour respecter l'horaire de BB 494; les cultures sont généralement cultivées pendant 24 à 40 heures avant la récolte).

Pour obtenir un point de temps zéro d'expression protéique, retirez 250 microlitres des cultures cellulaires de départ d'origine en milieu non inductif et centrifugez entre 3 000 et 5 000 rcf pendant 5 à 10 min. Jetez le surnageant et entreposez le petit culot cellulaire à -20 °C dans votre congélateur (étiquetez bien tous les échantillons afin que vous et vos partenaires puissiez bien les identifier à l'avenir).

Exprimez la protéine pendant 24 à 48 heures. Avant de récolter les cellules par centrifugation, n'oubliez pas de retirer d'abord 250 cellules microlitres pour les derniers points de temps pour un gel brut. Déterminez

également la densité (OD600) des cultures. Divisez chaque échantillon de cellules en aliquotes de 25 à 35 ml dans des tubes coniques pré-pesés. Faites tourner les cellules dans des tubes coniques de 50 ml pendant 10 min entre 5 000 et 8 000 rcf dans la centrifugeuse de la paillasse (pas la Sorvall). Retirez le surnageant en le versant, déterminez la masse de chaque culot cellulaire et conservez les culots cellulaires à -80 °C. Encore une fois, indiquez bien la section, le numéro de groupe, la date et l'échantillon sur les tubes. Conservez les culots cellulaires dans de petits sacs à fermeture à glissière bien étiquetés au stylo directement sur le sac, indiquant votre section de laboratoire, votre numéro de groupe et la date. N'utilisez pas de ruban adhésif pour étiqueter les tubes ni les sacs : il tombera à -80 °C.

Réflexions approfondies sur les souches bactériennes et les plasmides

Nous vous fournissons des cultures de départ cultivées dans des milieux non inductifs avec lesquels inoculer vos plus grandes cultures, mais qu'utilisez-vous exactement? Prenez-vous aveuglément ce que l'assistant ou l'enseignant vous donne en suivant les instructions pour exprimer les protéines dans ce manuel ou savez-vous comment fonctionne le système et ce que contient exactement cette culture de départ?

Si vous ajoutez des antibiotiques à votre milieu, pourquoi? Comment savoir quels sont les bons antibiotiques? Toutes vos expressions n'utilisent pas les mêmes antibiotiques, pourquoi? Comment se transmet la résistance à ces antibiotiques?

Il existe une grande variété de souches bactériennes différentes que nous pourrions utiliser, chacune présentant des caractéristiques uniques optimisées pour des objectifs précis et présentant des avantages et des inconvénients. Certaines sont conçues pour contrôler étroitement l'expression et sont utilisées pour exprimer des protéines qui peuvent être toxiques pour une cellule. D'autres manquent ou contiennent des mutants de certains gènes afin de prévenir la dégradation des protéines, de favoriser la formation de liaisons disulfure ou de limiter la production de certains métabolites. Quelle souche bactérienne utilisez-vous? Quels sont certains de ses avantages et inconvénients? À votre avis, pourquoi a-t-on choisi cette souche pour ces expériences?

En raison des contraintes de temps de ce cours, les bactéries contenant les plasmides appropriés vous ont également été fournies. Ce n'est pas parce que vous n'avez pas réalisé cette partie de l'expérience vous-même que vous devez ignorer comment cette étape a été réalisée. Comment ces plasmides ont-ils été générés? Que contient chacun des plasmides? Comment ces plasmides sont-ils entrés dans la bactérie où votre protéine d'intérêt peut être surexprimée?

À tout le moins, vous voudrez connaître et comprendre : le type d'*E.coli* que vous utilisez, les plasmides que vous utilisez et ce qui est codé sur chacun de ces plasmides.

8.

8

Concepts pour l'électrophorèse SDS-PAGE

Avant d'analyser des échantillons de protéines par électrophorèse sur gel, il est utile de connaître la position prévue des bandes sur le gel en calculant la taille prévue de la protéine. Le chapitre 6 de Voet et Voet décrit les principes de base de SDS-PAGE. Connaître la taille prévue des bandes est également important lors de la sélection de la concentration de polyacrylamide que le gel doit contenir, puisque différents niveaux de polyacrylamide sont plus efficaces pour séparer différents intervalles de tailles de protéines. Les sources *Molecular Cloning* (qui traitent également de la coloration utilisée dans ce processus, Coomassie G-250) et le *manuel Bio-Rad* sont également de bonnes ressources pour les principes de l'électrophorèse sur gel.

Réflexions approfondies sur les contrôles

À quoi sert un contrôle? Généralement, un contrôle peut être utilisé pour vérifier que votre système se comporte comme vous l'attendez. De plus, un contrôle peut être utilisé pour déterminer ce qui se passe lorsque quelque chose ne va pas dans votre expérience, le cas échéant, et le corriger. Dans ce travail pratique, vous serez amené à utiliser des contrôles dans au moins deux contextes : l'expression des protéines (pour l'incorporation de ncAA) et les dosages. Y a-t-il d'autres contrôles que vous devriez intégrer à vos expériences?

Pour l'expression de votre protéine, vous devez mettre en place des contrôles positifs et négatifs. Que sont ces contrôles? Quels résultats espérez-vous observer pour vos contrôles positifs et négatifs? Si vos contrôles s'éloignent de cette attente, qu'est-ce qui l'explique? Avez-vous besoin de contrôles de purification?

Pour votre dosage, un contrôle est un moyen important de vérifier que l'activité observée provient de votre protéine et non d'une autre source. Comment mettre en place ce contrôle? Ce n'est pas grave si une certaine activité est observée lors de votre contrôle (on l'appelle couramment « réaction de base »). Dans un tel cas, comment pourriez-vous utiliser les résultats de ce contrôle?

Matériel nécessaire pour SDS-PAGE

Équipement

- Plaques en verre, support pour coulage, pinces pour coulage et peigne
- Plateaux de gel (avec séparateurs)
- Conseils de chargement du gel
- Bouteilles pour tampon de migration 1x

- Conteneurs de stockage de gel en plastique (un par groupe)
- pH-mètres – stations communes.

SDS-PAGE – voir le guide Bio-Rad SDS-PAGE pour les gels en Laemmli discontinus du système Mini Protean II

- Solution de polyacrylamide à 30 % (**Attention : neurotoxine** – porter des gants, des lunettes, une blouse) (aliquotes fournies)
- TEMED (acheté comme solution)
- Persulfate d'ammonium – 10 % en poids/vol dans l'eau; fraîchement préparé tous les jours (1 ml)
- Tampon de gel de séparation (1,5 M de Tris pH 8,8) (préparez 100 ml)
- Tampon de gel de concentration (0,5 M de Tris pH 6,8) (préparez 100 ml)
- 10 % de solution SDS (préparée pour vous)
- Colorant de charge SDS 2x, pH 6,8 (contient 125 mM de Tris-HCl, 4 % de SDS, 20 % de glycérol, 0,02 % de bleu de bromophénol et 5 % de β mercapto-éthanol) (10 ml)
- Tampon de migration 10x pour SDS-PAGE, pH 8,3 (contient 250 mM de Tris base, 1,92 M de glycine et 1 % de solution SDS dans l'H₂O distillée) (préparez 500 ml)
- Marqueurs de poids moléculaire (Bio-Rad Precision Plus Dual Color; charger 5 à 7,5 μ l dans une piste; conserver l'aliquote à -20 °C)
- Échantillons ponctuels dans le temps (culot cellulaire centrifugé à partir de 250 ml de chaque expression)
- Solutions de coloration/décoloration : seront fournies pour le cours à un poste sous la hotte.
 - Coloration bleu de Coomassie brillant G-250
 - Méthanol 40 %
 - Acide acétique 10 %

9.

9

Méthodes pour l'électrophorèse SDS-PAGE

Pour préparer les échantillons d'extrait brut pour l'électrophorèse sur gel, prenez d'abord les culots cellulaires de 250 μl qui ont été conservés à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Resuspendez les culots dans 50 μl de H_2O distillée – pipetez de haut en bas et passez au vortex pour remettre en suspension la totalité du culot cellulaire. Ajoutez ensuite 50 μl de colorant SDS 2x. Assurez-vous que le colorant SDS est complètement dissous avant de l'ajouter aux échantillons, car le SDS précipite hors de la solution à basse température. Chauffer les échantillons à $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant environ 5 à 10 minutes, en les passant au vortex au besoin pour assurer une dissolution complète. Centrifuger les échantillons à $>10\ 000$ rcf pendant 5 minutes. Une fois le gel préparé comme indiqué dans le protocole d'instructions, 20 μl du surnageant peuvent être placés dans chaque cavité du gel de polyacrylamide. N'oubliez pas d'ajouter 5 μl de marqueurs de poids moléculaire dans une cavité.

Pour effectuer l'expérience, suivez le protocole d'instructions Bio-Rad Protean II. Une fois que le front de colorant a atteint le fond du gel, coupez la tension et retirez le gel des plaques de verre. Placez le gel dans la solution de coloration bleu de Coomassie brillant G-250 dans un récipient en plastique et agitez pendant plusieurs heures (ou suivez le conseil ci-dessous). La solution de coloration peut ensuite être versée et le décolorant versé sur le gel, en agitant encore par la suite. Le décolorant peut être versé dans le conteneur à déchets prévu à cet effet sous la hotte et remplacé plusieurs fois jusqu'à ce que les bandes soient clairement visibles sur le fond du gel.

- **CONSEIL** : Pour accélérer le processus de coloration, puisque les étapes de coloration fonctionnent par attraction et diffusion électrostatiques, le gel (coloré *ou* décoloré) peut être chauffé au micro-ondes sous la hotte jusqu'à ébullition (environ 20 à 30 secondes) avant d'être placé sur l'agitateur pendant 10 minutes. Assurez-vous de porter des lunettes et des gants de protection! Ne pas laisser décolorer plus d'une nuit.

Matériel nécessaire pour la purification de la protéine de résine TALON

Préparation du tampon de purification et composants

- Tampons d'étalonnage de pH
- 5 N HCl et 8 N NaOH
- Imidazole
- NaCl
- NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , H_3PO_4 , sels de Na_3PO_4

Ressources et protocoles suggérés

- *Utilisation des gels de polyacrylamide* : Les ressources suivantes contiennent des renseignements utiles sur la théorie et la pratique de l'électrophorèse sur gel de protéines. Voir la page 15 pour connaître l'emplacement de ces ressources :

Le manuel Bio-Rad Mini Protean Tetra Cell (en particulier la section 4.2) contient des protocoles pour la fabrication de solutions mères pour les gels et tampons pour la SDS-PAGE en Laemmli discontinu).

Voet et Voet

Sambroo's *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*

- *Préparation du tampon de purification de protéines* : Le manuel des « Résines à affinité métalliques TALON » est publié sur le site du cours Canvas.

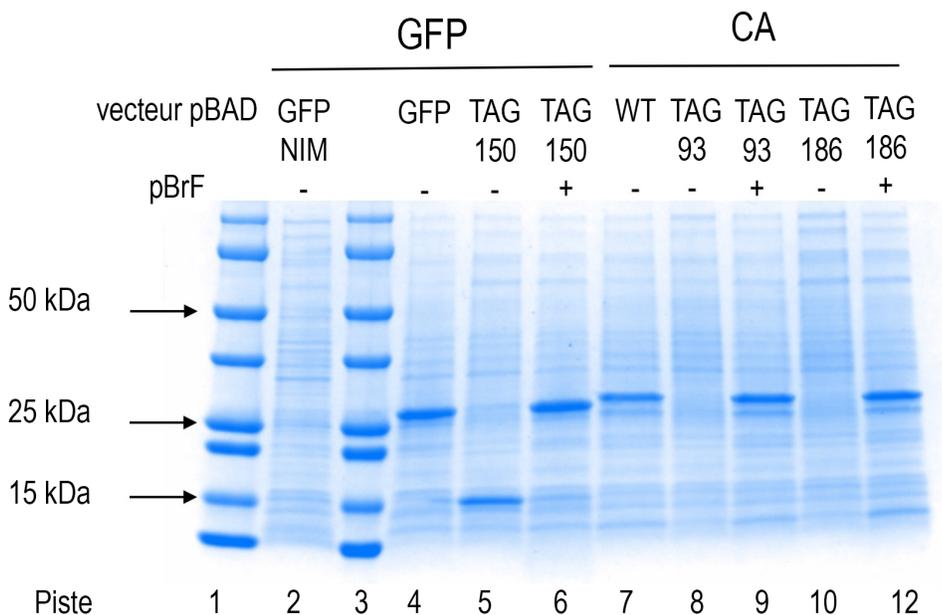


Figure 4. Analyse de la protéine de type sauvage et de la protéine pBrF produite pour la protéine verte fluorescente (GFP) et la protéine CA.

Le poids moléculaire des protéines GFP et CA est respectivement de 27 et 30 kDa.

Des contrôles positifs et négatifs de la production de protéines séparées par SDS-PAGE et colorées par

colorant Coomassie sont présentés. Les pistes 1 et 3 contiennent des marqueurs de précision et des marqueurs précolorés (Bio-Rad). La piste 2 montre l'expression de la protéine à partir du plasmide indiqué pour les cellules cultivées dans un milieu non inductif (NIM). Les pistes 4 à 12 montrent les résultats de l'expression des protéines à partir des plasmides indiqués en absence ou en présence de para-bromophénylalanine (pBrF). Le produit de troncation GFP150 est visible dans la piste 5 à un poids moléculaire estimé à 15 kDa.

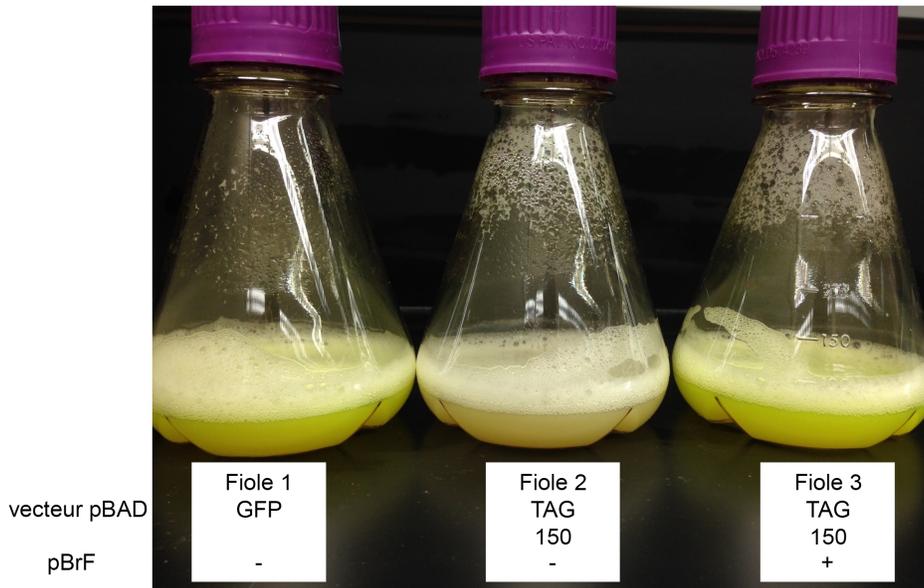


Figure 5. Série de surexpression parallèle pour la protéine de type sauvage et la protéine pBrF produite pour la GFP. Les cellules ont été cultivées pendant 24 heures dans un milieu d'autoinduction. Fiolo 1 : GFP de type sauvage (contrôle positif); fiolo 2 : aucun contrôle pBrF (contrôle négatif); fiolo 3 : protéine GFP contenant du pBrF.

10.

10

Objectifs de la semaine 3

- Exprimer l'ensemble des protéines de type sauvage et des protéines mutantes ncAA.
- Purifier la protéine de type sauvage à partir des cellules récoltées au cours de la semaine 2.
- Préparer les tampons de stockage et de dosage.
- Dessaler l'échantillon de protéine de type sauvage dans le tampon de stockage.
- Analyser la protéine purifiée par SDS-PAGE.
- Déterminer si la protéine est active.
- Poursuivre la recherche documentaire d'un dosage approprié et réalisable pour tester la cinétique enzymatique.
- Obtenir des produits chimiques et des fournitures pour les dosages.

11.

11

Concepts de purification et de dessalage des protéines

La queue polyhistidine permet une purification de la protéine d'intérêt à partir d'autres protéines à l'aide d'une résine d'affinité métallique. Il est important d'utiliser la bonne quantité de résine : une trop grande quantité peut se lier sans discernement à des protéines dépourvues de queue polyhistidine, ce qui donne des protéines impures, tandis qu'une quantité insuffisante entraîne la perte d'une partie de la protéine souhaitée lorsque la résine est surchargée, ce qui réduit le rendement.

Le tampon d'élution utilisé pour éluer la protéine marquée à la polyhistidine au cours de la procédure de purification (contenant du phosphate de sodium, du chlorure de sodium et de l'imidazole) n'est probablement pas un tampon optimal pour vos dosages. Par conséquent, la protéine doit être retirée du tampon d'élution et placée dans un tampon de stockage ou de dosage. Le concept de la méthode de purification utilisée pour dessaler les échantillons de protéines – la chromatographie par filtration sur gel – est important à comprendre. Ses principes sont décrits au chapitre 5 de Mathews, Van Holde, Appling et Athony-Cahill ou au chapitre 6 de Voet et Voet.

Réflexions approfondies sur les tampons

Vous avez passé beaucoup de temps à en apprendre sur les tampons et le pH en classe depuis l'école secondaire. Mais vous souvenez-vous de ce qu'est un tampon et de sa fonction? Si ce n'est pas le cas, peut-être voudrez-vous revoir le tout avant de continuer.

Vous avez déjà utilisé et créé une variété de tampons, mais qu'est-ce qui fait un bon tampon? Par exemple, les tampons pour la purification par SDS-PAGE et par affinité polyhistidine ont prescrit des recettes optimisées pour chaque objectif précis. Maintenant, c'est à vous de sélectionner et de créer vos propres tampons pour vos expériences. À tout le moins, vous devrez sélectionner un tampon adapté au stockage de vos protéines à dessaler. Dans ce cas, qu'est-ce qui constitue un bon tampon? Ça dépend des qualités que vous souhaitez dans votre tampon. Dans ce cas, vous voulez probablement un tampon dans lequel votre protéine est stable. Afin d'éviter de changer à nouveau les tampons, vous souhaitez probablement également un tampon qui n'interférera pas avec le dosage de votre choix. Il peut y avoir des qualités supplémentaires à prendre en compte lors du choix et de la fabrication de votre tampon.

Réflexions approfondies sur la purification des protéines

Les protéines peuvent être purifiées de différentes manières. Dans ce cours, nous utilisons l'une des méthodes les plus simples et les plus courantes pour purifier les protéines exprimées par recombinaison : la purification par affinité avec la polyhistidine. Comment cette méthode fonctionne-t-elle réellement? De quoi dépend-elle pour fonctionner efficacement? Si vous rencontrez des problèmes avec votre système de purification, quel pourrait être le problème et comment le résoudre?

De nombreuses techniques de purification autres que la purification par affinité avec la polyhistidine peuvent être utilisées. Elles s'appuient sur la taille, la charge ou l'affinité d'autres molécules comme technique de purification de substitution ou en complément de la purification par affinité avec la polyhistidine, afin d'obtenir un échantillon plus pur. Quelles sont ces techniques? Quelles sont les conditions requises pour purifier efficacement votre protéine d'intérêt et quels sont les avantages et les inconvénients de leur utilisation?

Matériel nécessaire*Équipement*

- Microfluidiseur (offert pour BB494)
- Sonicateur avec source d'énergie et protection auditive (autre méthode de lyse)
- Tubes à centrifugation haute vitesse Oak Ridge
- Rotor Sorvall SS34
- Colonnes poly-prep – Bio-Rad (réutilisables)
- Colonnes de dessalage PD-10 préemballées de GE Health Care – à réutiliser.

Purification et dessalage des protéines

- Résine d'affinité métallique BD TALON BD (les équipes recevront une aliquote de résine dans un tampon de conservation à long terme. La résine devra être équilibrée).
- Tampons d'équilibrage TALON 5x (250 mM de phosphate de sodium, 1,5 M de NaCl pH 7,0).
Remarque importante : Pour l'utilisation du microfluidiseur, préparez une réserve de 0,5 l à 5x. Si nécessaire, diluez à 1x à chaque purification.
- Tampon d'équilibrage ou de lavage TALON 1x à pH 7,0 (50 mM de phosphate de sodium, 300 mM de NaCl) (également appelé tampon Tractor dans le manuel TALON)
- Tampon d'élution TALON, pH 7,0 (50 mM de phosphate de sodium, 300 mM de NaCl, 250 mM d'imidazole) (préparez 100 ml ou moins)
- Lysozyme de blanc d'œuf de poule T4, si sonication
- Culots cellulaires provenant d'expressions centrifugées
- Réactif Bradford pour le dosage des protéines et protéine standard d'albumine de sérum bovin

Ressources et protocoles suggérés

- *Préparation du tampon de purification de protéines* : Le manuel des résines d'affinité métallique TALON

est accessible sur le site Canvas. Remarque : Le manuel TALON fait référence au tampon Tractor – vous fabriquerez vos propres tampons d'équilibrage, de lavage et d'élution de résine TALON (voir la liste ci-dessus).

- *Dessalage des protéines* : Le manuel d'utilisation des colonnes de dessalement PD-10 peut être téléchargé à partir du site Web du fabricant et est également accessible sur Canvas.

<http://www6.gelifesciences.com>. (lien inactif au 19/5/2021) Sélectionnez un tampon pour le dessalage qui soit compatible avec vos dosages. Assurez-vous de bien comprendre le concept général et l'utilisation des termes « tampon d'équilibrage » et « tampon d'élution ».

Réflexions approfondies sur la stabilité des protéines

La stabilité des protéines est applicable à ce cours de multiples façons. Tout d'abord, vous devez tenir compte de la stabilité de votre protéine dans le temps dans le cadre de vos expériences. Ensuite, la stabilité (dans le temps ou peut-être la thermostabilité) peut être une caractéristique de votre enzyme que vous voudrez évaluer dans le cadre de votre recherche. Les changements de stabilité présentent souvent un intérêt et l'augmentation de la thermostabilité est généralement un résultat souhaité lors de la conception d'une enzyme.

Premièrement, nous nous pencherons sur la stabilité pour ce qui est du maintien de l'intégrité de votre protéine. Vous exprimerez et purifierez votre protéine native dès la troisième semaine du semestre. Pensez-vous que cette protéine purifiée aura la même activité et se comportera de la même manière lors de vos dosages finaux de la semaine 9? Que pouvez-vous faire pour maintenir l'intégrité de vos protéines dans le temps?

Un facteur essentiel à prendre en compte est la manière dont votre protéine est stockée; il est primordial de comprendre et de choisir les conditions dans lesquelles votre protéine peut être conservée sans perte appréciable d'activité pour pouvoir l'évaluer de manière efficace. Afin de maintenir une activité maximale et d'obtenir des résultats cohérents d'une période de laboratoire à l'autre, comment devez-vous stocker vos protéines? À quelle température? Dans un tampon? À quelle concentration? Comment devez-vous manipuler votre protéine lorsque vous l'utilisez?

Si vous observez une perte d'activité avec le temps, qu'est-ce qui pourrait entraîner cette réduction d'activité? Que pourriez-vous faire pour atténuer la perte d'activité? Que pourriez-vous faire pour limiter l'effet de la perte d'activité de votre protéine dans le temps sur vos résultats? Outre la mesure de l'activité réduite, comment pourriez-vous détecter que l'intégrité de votre protéine diminue avec le temps?

Par ailleurs, si vous souhaitez évaluer la stabilité de votre protéine en tant que caractéristique supplémentaire, comment pouvez-vous vous y prendre? Qu'est-ce qu'un dosage approprié et comment pouvez-vous tester votre enzyme?

12.

12

Méthodes de purification et de dessalage des protéines

Une fois les échantillons liés à la résine d'affinité métallique, les procédures de purification et de dessalage sont clairement décrites dans les manuels des fabricants respectifs. Pour préparer les culots cellulaires à se lier à la résine, les cellules seront passées dans le microfluidiseur Mehl Core Lab, puis les cellules lysées seront centrifugées. Une autre solution consiste à soniquer et à centrifuger les cellules conformément à la procédure générale décrite plus loin dans ce manuel. Notez que tout au long du processus de purification, les échantillons doivent être conservés sur de la glace afin d'éviter que les protéines les moins stables ne se déploient.

Parmi les trois types de culots cellulaires conservés à -80°C , purifiez au moins un culot de chaque type. Conservez les culots restants à -80°C . D'autres expressions de protéines peuvent être réalisées ultérieurement si nécessaire. Notez toutefois qu'un préavis d'au moins trois jours est nécessaire pour préparer des cultures de départ non inductives.

13.

13

Méthode de lyse au microfluidiseur

À partir de votre solution de réserve 5x, préparez un tampon d'équilibrage 1x (50 mM de phosphate de sodium pH 7, 300 mM de NaCl) – vous aurez besoin d'environ 1 l au total pour la resuspension des cellules et le lavage du microfluidiseur entre les échantillons.

Placez les culots dans les tubes sur de la glace et resuspendez chacun d'eux complètement (pas de morceaux) dans 10 ml de solution d'équilibrage TALON 1x moins l'imidazole. Resuspendez un culot du type sauvage et un de chacune des deux protéines mutantes ncAA (semaine 3). Emmenez vos cellules resuspendues sur glace, votre flacon de tampon d'équilibrage 1X et vos tubes de centrifugation Oakridge au laboratoire central en ALS 2124. Votre auxiliaire à l'enseignement vous montrera comment utiliser le microfluidiseur. Nous enverrons les groupes un par un. **Pour terminer l'expérience à temps, vous devrez effectuer la microfluidisation pendant la première heure de travaux pratiques. Les groupes ne seront pas autorisés à commencer la microfluidisation après la première heure. Vous devrez également avoir terminé d'éluer la protéine de la résine avant la fin de la période de travaux pratiques. Travaillez de manière efficace!**

Une fois que vous avez récupéré vos cellules lysées, retournez au laboratoire d'enseignement BB et centrifugez vos échantillons dans le rotor Sorvall SS34 à 18 000 tours/minute pendant 20 minutes, à 4 °C. Veillez à bien équilibrer les tubes d'abord.

Préparation de la résine TALON et fixation de l'échantillon :

Pendant que les cellules microfluidisées centrifugent, préparez et lavez la résine d'affinité pour les métaux BD TALON, en suivant le protocole décrit dans le manuel TALON (spécifiquement le protocole concernant la purification du type sauvage à pH 7). Le manuel inclut également la quantité recommandée de volume de lit de résine à utiliser – anticipez qu'il y aura au moins 20 mg de protéine pour 100 ml de culture pour la protéine de type sauvage (la production varie en fonction de la stabilité de chaque protéine et de l'efficacité de la machinerie de traduction, donc chaque site TAG sera différent en fonction de son emplacement et des ncAA incorporés). Une fois que la résine a été lavée et combinée à l'échantillon dans un tube Falcon de 50 ml, liez l'échantillon à la résine pendant au moins 30 minutes (à température ambiante ou plus froide) par agitation. Une fois l'échantillon lié, il peut soit être lavé en lots ou être appliqué à la colonne et lavé abondamment

(2 x 10 ml environ). Le degré de lavage peut être surveillé grâce à une coloration de Bradford Coomassie – si une couleur bleue apparaît lorsque 500 ml de coloration sont combinés avec 20 ml d'éluant, alors il est probable que des protéines sans étiquette poly-histidine soient encore en train d'être lavées de la résine. Lorsqu'aucune couleur bleue n'apparaît, éluez la protéine purifiée avec 1,5 à 2 ml de tampon d'élution. C'est un volume pratique à utiliser pour l'étape suivante, le dessalage.

- **CONSEIL** : Ajouter les 1,5 à 2 ml de tampon d'élution à la résine en plus petites quantités a tendance à améliorer le rendement de protéine purifiée.

Stockez les fractions de protéine éluée à 4 °C (**pas congelées!**) ou sur de la glace jusqu'à ce que vous soyez prêt à passer à l'étape suivante.

Pour dessaler l'échantillon de protéine dans le tampon de stockage, suivez la procédure décrite dans le manuel des colonnes de dessalage PD-10. Prévoyez environ 20 minutes pour laver la colonne de dessalage avec le tampon de stockage. Vous devrez peut-être le faire pendant la séance de laboratoire suivante.

Méthode de destruction des cellules par sonication (méthode de rechange) :

Placez les culots sur de la glace et ajoutez une quantité appropriée de tampon de lavage. Combinez tous les culots du même type protéique (c.-à-d. le type sauvage par opposition aux deux types de culots de protéines mutantes ncAA) dans un seul tube conique de 50 ml.

- **CONSEIL** : Puisque les cellules resuspendues devront au final être centrifugées dans des tubes propres aux grandes vitesses qui contiennent 40 ml, veillez à ce que le volume total utilisé pour la resuspension des culots n'excède pas 40 ml, afin que tous les culots d'un même type puissent être dans le même tube. Utilisez 15 ml de tampon de lyse pour 25 ml de culot de cellule.

Une fois les culots combinés, ajoutez 20 mg de lysozyme (sans excéder une concentration totale en lysozyme de 1 mg/ml) aux cellules resuspendues. Mélangez le lysozyme dans la solution par inversion douce seulement – ne pas secouer, faire mousser (c.-à-d. en y incorporant de l'air) ou réchauffer les échantillons, la protéine pouvant être instable lorsqu'elle est exposée à l'air ou à la chaleur. Toute partie restante de culot peut être resuspendue par une brève sonication.

Pour lyser les cellules de manière plus complète, vous pouvez utiliser la sonication. La sonication rompt les parois des cellules à peu près de la même manière que le fait de se tenir près d'une enceinte à un concert peut rompre les tympanes. Par conséquent, des protections auditives devront être portées pendant toute la durée de ce processus. Utilisez le réglage de puissance le plus élevé pour soniquer l'échantillon sans le faire mousser. Bouger l'extrémité du sonicateur près de la surface de la solution la fera mousser, et lui faire toucher le tube de plastique l'empêchera de lyser correctement les cellules. Ne faites pas de sonication dans un contenant en verre. La sonication de chaque échantillon pendant trois intervalles d'une minute devrait être suffisante. Ne

laissez pas le sonicateur réchauffer l'échantillon à une température supérieure à la température ambiante – si l'échantillon commence à chauffer, arrêter la sonication jusqu'à ce qu'il soit refroidi.

Pour éliminer les débris cellulaires, les échantillons doivent être centrifugés vraiment rapidement dans des tubes conçus pour grandes vitesses munis de bouchons. Après vous être assuré que les tubes soient bien équilibrés dans le rotor (vérifiez avec une balance) et qu'ils ne soient pas fissurés ou que leur structure ne soit pas fragilisée, faites-les tourner aussi vite que la centrifugeuse le permet pendant 30 minutes.

14.

14

Objectifs de la semaine 4

- Déterminer la concentration des échantillons de protéine pure dessalée de type sauvage.
- Déterminer si la protéine de type sauvage est active.
- Effectuer une SDS-PAGE des extraits de protéines mutantes ncAA exprimées lors de la semaine 3.
- Effectuer une SDS-PAGE des protéines de type sauvage purifiées.
- Purifier les protéines mutantes ncAA.
- Élaborer un dosage cinétique et déterminer les constantes catalytiques pour les enzymes de type sauvage et mutantes ncAA (voir ci-dessous les conseils de réalisation d'un dosage).

Matériel nécessaire

Détermination de la concentration en protéine

- Matériel de dosage protéique Coomassie (Bradford), contenant :
 - Réactif de dosage protéique Coomassie
 - Aliquotes étalonnées d'albumine bovine

Déterminer l'activité et les constantes catalytiques de l'anhydrase carbonique et de la catalase

Le matériel variera selon les groupes en fonction de la nature du dosage. Chaque groupe a la responsabilité de veiller à ce que l'équipement et le matériel nécessaires à l'exécution de leur dosage soient disponibles d'une semaine à l'autre.

Ressources et protocoles suggérés

- *Concentration en protéine* : Le manuel du dosage Bradford Bio-Rad peut être trouvé en ligne. <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/4110065A.pdf>
- *SDS-PAGE* : Utiliser les ressources de la semaine 3.
- *Dosage de l'enzyme* : Voir les semaines 5 à 9 pour les détails des ressources concernant le dosage.

15.

15

Méthodes pour les courbes étalons de protéines et l'électrophorèse SDS-PAGE

La méthode permettant de générer une courbe étalon et de mesurer les concentrations d'échantillons est décrite clairement dans le manuel de dosage Bradford. Anticipez un intervalle de travail de 100 à 1 500 $\mu\text{g/ml}$ de protéine. Des échantillons d'albumine sérique bovine étalonée seront fournis.

Attention : La solution Bradford Coomassie est un acide très fort (acide phosphorique) – faites preuve d'une grande prudence lorsque vous l'utilisez et, en cas d'exposition, lavez immédiatement à l'eau claire. Recueillez le réactif usagé dans un contenant à déchets approprié dans la hotte de laboratoire.

Lorsque vous préparez et réalisez le gel SDS-PAGE de l'échantillon de protéine purifiée, la seule différence réside dans la préparation de l'échantillon. Environ 5 à 20 μl de l'échantillon de protéine dessalée peut être mélangé à 20 μl de SDS 2x, qui peut alors être chauffé à 100 °C pendant 5 à 10 minutes. Centrifugez brièvement les tubes afin que la totalité de l'échantillon se retrouve dans la partie inférieure du tube. 20 μl de ce mélange peuvent être ajoutés aux puits du gel. Une règle empirique pour les mini gels consiste à ajouter environ 0,5 microgramme de protéine par bande attendue, de manière à ce que le gel ne soit pas surchargé.

Réflexions approfondies sur la concentration de protéines

Il existe de nombreuses manières permettant de mesurer une concentration en protéine, et comme c'est souvent le cas, chacune a ses avantages et ses inconvénients. Comment mesurez-vous la concentration en protéine? Les réactifs pour un dosage Bradford sont fournis, mais vous devez quand même vous demander si c'est la meilleure méthode pour mesurer la concentration de votre protéine. Outre le dosage Bradford, deux des moyens les plus courants pour déterminer une concentration en protéine sont le dosage protéique BCA et l'absorbance à 280 nm en utilisant un Nanodrop ou un Picodrop.

Différentes choses sont à prendre en considération lorsqu'on sélectionne une méthode : la compatibilité avec le type d'échantillon et les composants de la solution tampon (notamment le zinc ajouté), l'intervalle de dosage et le volume d'échantillon requis, la vitesse et la praticabilité par rapport au nombre d'échantillons à tester, la disponibilité d'un spectrophotomètre ou d'un lecteur de microplaques pour mesurer l'absorbance par le dosage, l'utilité pour la mesure du lysat de cellule entière ou la protéine pure, l'uniformité (quelle variation y a-t-il d'une protéine à l'autre?) et si on l'utilise, l'adéquation de l'étalon. Dans le cas qui vous concerne, il faudra également prendre en compte l'effet que l'ajout d'un acide aminé non canonique à votre protéine pourrait avoir sur vos mesures.

Le dosage Bradford se fonde sur la liaison proportionnelle de la coloration Coomassie aux protéines. Dans les limites de l'intervalle linéaire du dosage, plus il y a de protéines, plus la coloration Coomassie se lie, et plus la couleur devient foncée. La coloration Coomassie absorbe à 595 nm, donc en utilisant un étalon de protéine, le plus souvent l'albumine bovine sérique (BSA), vous pouvez générer une courbe étalon et l'utiliser pour mesurer les concentrations en protéine de vos échantillons.

Le dosage protéique BCA est également un dosage colorimétrique utilisé pour quantifier une concentration en protéines. La méthode se base sur la réduction du cuivre et la détection consécutive du cuivre réduit par le BCA (acide bicinchoninique). Ce complexe cuivre/BCA présente une absorption linéaire forte à 562 nm avec des concentrations en protéines croissantes. Comme avec le dosage Bradford, un étalon de protéine, le plus souvent l'albumine bovine sérique, est utilisé pour générer une courbe étalon avec laquelle vous pourrez déterminer les concentrations en protéines de vos échantillons.

Un Nanodrop est un spectrophotomètre de laboratoire courant qui peut être utilisé pour déterminer les concentrations en protéines, en ADN et en ARN. Pour mesurer une concentration en protéines, le Nanodrop utilise l'absorbance à 280 nm, souvent appelée A280, et un coefficient d'extinction pour déterminer la concentration d'un échantillon de protéine pure. Qu'est-ce qu'un coefficient d'extinction? Un coefficient d'extinction est une constante, pour une protéine, qui reflète la quantité de lumière ultraviolette qu'elle va absorber en fonction de sa composition en acides aminés, les acides aminés aromatiques étant les principaux responsables de l'absorption de la lumière ultraviolette. L'avantage du Nanodrop est qu'il ne nécessite que des échantillons de toute petite taille (~1-2 µl) et qu'il est rapide.

16.

16

Objectifs des semaines 5 à 9

- Élaborer un dosage cinétique et déterminer les constantes catalytiques pour les enzymes de type sauvage et mutantes ncAA (voir ci-dessous les conseils de réalisation d'un dosage).
- Modifier le dosage en fonction des besoins pour obtenir des résultats significatifs et reproductibles. Purifier de la protéine supplémentaire si nécessaire.
- Obtenir les paramètres cinétiques pour les enzymes de type sauvage et les enzymes mutantes ncAA, afin que des comparaisons puissent être effectuées, à la fois par rapport aux valeurs de la littérature et par rapport aux enzymes testées dans cette expérience.
- Concevoir et exécuter des dosages individuels pour la structure de la protéine et sa fonction.
 - En vous basant sur la structure connue de l'enzyme, justifier les résultats obtenus et tenter de déterminer la relation structure-fonction de ce site en particulier.
 - Concevoir et effectuer des expériences pour tester vos hypothèses concernant la structure et la fonction.
- Effectuer une analyse par spectrométrie de masse des protéines purifiées pour confirmer la composition attendue (si un créneau de spectrométrie de masse est disponible pour les travaux pratiques).

17.

17

Concepts de dosage des enzymes

En bref, un dosage enzymatique consiste à prendre une enzyme et à la recombinaer avec les matériaux de départ. Il est par conséquent nécessaire d'avoir un moyen de contrôler la disparition des matériaux de départ ou la formation des produits. Si l'enzyme augmente effectivement la vitesse de la réaction, alors la formation de produits sera notablement plus rapide avec l'enzyme que sans l'ajout de l'enzyme. Le catalyseur utilisé ici provenant d'un organisme vivant, il est sensible à la concentration en sel, au pH et aux concentrations des matériaux de départ et des produits. La littérature concernant la protéine peut fournir des données utiles à propos de ces valeurs.

Ne vous inquiétez pas lorsque vous commencez les dosages bruts initiaux – il est fort peu probable que cela semble juste au premier essai. Il existe trop de facteurs qui auront besoin d'être ajustés pour obtenir des données correctes. Lorsque vous commencez, laissez bien au dosage l'occasion de montrer une activité catalytique, sans perdre de temps avec la précision des mesures et l'élaboration de solutions de réserve.

Réflexions approfondies sur la cinétique et les dosages

Vous comparerez au moins la cinétique de votre protéine native à celle des protéines mutantes ncAA au moyen d'un dosage. Mais que signifient en fait ces changements dans les paramètres cinétiques et comment interprétez-vous vos résultats? Interpréter vos résultats d'une manière significative est peut-être l'une des parties les plus difficiles de vos expériences.

Revoyons tout d'abord certaines valeurs cinétiques fondamentales. K_M est la constante de Michaelis et représente la concentration du substrat à $1/2 V_{max}$. V_{max} est la vitesse maximale de l'enzyme. k_{cat} est le nombre de rotations et mesure le nombre de molécules de substrat converties par molécule d'enzyme par seconde. Le rapport k_{cat}/K_M est souvent utilisé comme mesure de l'efficacité catalytique. Comment allez-vous obtenir ces valeurs (et peut-être d'autres) en vous servant de votre dosage cinétique?

Nous supposons généralement que les enzymes suivent la cinétique de Michaelis-Menten, mais est-ce bien le cas pour votre enzyme? Quel est le modèle le plus adapté à la cinétique de votre enzyme et comment a-t-il été modélisé dans la littérature? Pour évaluer la cinétique de vos protéines, à quels moments et pendant combien de temps devez-vous prendre vos mesures? Quels autres facteurs devez-vous prendre en compte afin de réaliser un dosage cinétique précis et constant? Par exemple, quelle influence la température, le pH et la composition du tampon ont-ils sur votre dosage? Quelles variables doivent rester constantes, et quelles variables doivent changer à mesure que vous effectuez votre dosage? (Si votre enzyme suit la cinétique de Michaelis-Menten, la concentration de l'enzyme doit rester constante tandis que la concentration du substrat doit changer).

Une fois que vous avez vos résultats, qu'en faites-vous? Comment pourriez-vous évaluer la précision et la validité de vos mesures? Vos résultats sont-ils cohérents entre eux et ont-ils un sens? Vous pourriez également réussir à trouver dans la littérature les paramètres cinétiques acceptables pour votre protéine native. Qu'est-ce qui vous permet d'établir une comparaison significative entre vos valeurs et celles trouvées dans la littérature? Que signifient les changements des divers paramètres cinétiques?

Matériel nécessaire

- Le matériel variera selon les groupes en fonction de la nature du dosage. Chaque groupe a la responsabilité de veiller à ce que l'équipement et le matériel nécessaires à l'exécution de leur dosage soient disponibles d'une semaine à l'autre.

Ressources et protocoles suggérés

- *Renseignements généraux sur le dosage* : Le chapitre 1 du livre *Enzyme Assays* d'Eisenthal et Danson couvre une grande partie des bases nécessaires pour effectuer des dosages et des mesures cinétiques. Vous en trouverez un exemplaire dans le laboratoire d'enseignement.

18.

18

Méthodes de dosage des enzymes

Bien que les spécificités des dosages varient en fonction de la protéine, il est recommandé de commencer par la solution de protéine de type sauvage la plus concentrée et des réactifs mesurés grossièrement. Il est de la plus grande importance de réaliser des solutions de réserve et de noter l'ordre dans lequel les composants sont mélangés. Il est prudent de conserver des solutions de réserve de chaque composant jusqu'à ce que le comportement de chacun d'entre eux soit connu (Est-il sensible à la température? Précipite-t-il avec le temps? Détruit-il la protéine? Ou ne dure-t-il que le temps d'un cours?). Le mélange des réactifs dans une seule grande solution de réserve au début de la réalisation des dosages sacrifie une grande partie du contrôle que l'on a sur l'expérience.

Voici quelques conseils pour trouver une méthode de dosage reproductible :

- Premièrement, comment se présente la reproductibilité? Est-il possible de répéter le dosage trois fois de suite en trouvant la même vitesse initiale de réaction? Faites le test avec un mélange de dosage grossier.
- Le fait d'ajouter trop d'enzyme peut terminer la réaction avant que le mélange soit complet (c.-à-d. que la ligne de base zéro devrait changer).
- Installer la cuvette de manière incorrecte ou utiliser le mauvais type de cuvette peut être frustrant même pour les plus brillants des groupes.
- Veillez à ce que le pH soit correct et qu'il ne change pas de manière substantielle pendant la réaction.
- Lorsque vous mélangez les composants pour un dosage, essayez de ne pas utiliser de volumes inférieurs à 10 μ l. En cas de besoin, pour atteindre cet objectif, faites une solution de réserve d'enzymes et de substrats plus diluée.
- Certains réactifs se décomposent (au cours d'une période de travaux pratiques) s'ils sont placés dans le tampon de dosage. Faites plutôt une solution de réserve concentrée 100x de ce réactif, et conservez-la dans l'eau ou dans un solvant de stockage sur de la glace.
- Il est possible que l'enzyme ait besoin de se réchauffer à température ambiante avant de travailler correctement.
- Un mélange incorrect peut faire apparaître des données étranges et non linéaires.

- Déterminez la longévité de l'enzyme – meurt-elle rapidement? Aura-t-elle la même activité la semaine prochaine?

Remarque : l'exemple qui suit n'est pas un dosage approprié pour vos enzymes, il s'agit simplement un exemple d'un dosage pouvant être suivi au moyen d'un spectrophotomètre!

Voici un exemple d'une réaction de dosage enzymatique pour 1 ml nécessitant un ion Zn^{2+} . Une solution de réserve concentrée 10x de tous les composants (dissous dans un tampon de dosage) peut être réalisée.

Placez 780 ml de tampon de dosage dans une cuvette (conservé à température ambiante).

Ajoutez 100 ml de solution de $ZnCl_2$ (10x, dans un tampon de dosage) (conservée à la température nécessaire).

Ajoutez 100 ml de solution de substrat (10x, dans un tampon de dosage) (conservée à la température nécessaire).

Mélangez.

Placez la cuvette dans l'instrument et réglez le zéro. Il peut être utile de faire exécuter à l'instrument une collecte de données complète pour voir ce qui se passe. Rien ne devrait se passer, puisque l'enzyme n'a pas encore été ajoutée. Si quelque chose *change*, c'est la réaction de base et il est important de la surveiller.

Ajoutez 20 ml de la solution la plus concentrée d'enzyme de type sauvage (conservée sur de la glace).

Mélangez rapidement par pipetage à l'aide d'une pipette P1000.

Recueillez les données.

Y a-t-il une activité? Oui! Gardez à l'esprit qu'il vous faudra effectuer une réaction de contrôle sans enzyme pour vous assurer que les données semblent différentes.

À présent, modifiez le dosage de manière à ce que toutes les constantes cinétiques nécessaires à la publication puissent être rassemblées et que les enzymes mutantes ncAA puissent être testées. Il peut être utile de peaufiner le dosage avant de prendre les mesures pour de bon; il est bon de décrire certains aspects, tels que le contrôle de la température et la prise de données en triple exemplaire pour les barres d'erreur, avant de prendre une série de mesures pour toutes les enzymes.

Réflexions approfondies sur « Comment écrire un bon article? De quoi ai-je besoin pour être publié? »

D'ici la fin de ce trimestre, avec un peu de chance, vous aurez été exposé à un corpus significatif de littérature concernant la protéine qui vous intéresse. À présent, il vous faut préparer votre recherche dans un manuscrit. Pensez à certains des articles que vous avez lus. Qu'avez-vous apprécié dans ces articles? Qu'est-ce que vous n'avez pas aimé? Peut-être aimez-vous que les auteurs racontent une histoire qui capte votre attention, ou que les données soient présentées de manière claire et concise. Vous pouvez vous servir de votre expérience de lecteur pour guider votre rédaction.

Outre le fait de créer un manuscrit agréable à lire, il est important de prendre en compte l'utilité et la fiabilité de votre travail. Tout comme vous l'avez fait au début de ce trimestre, lorsqu'ils se lancent dans un nouveau projet, lorsqu'ils abordent un nouveau domaine de recherche ou qu'ils étudient une nouvelle technique, les scientifiques ont tendance à examiner la littérature existante pour voir ce qui a été fait et ce qui est déjà connu. À ce titre, il est important que ces articles incluent les renseignements nécessaires pour répéter ces expériences et répliquer les résultats.

Le lecteur voudra également être capable d'évaluer la qualité et le sens de votre travail. Pour un travail comme un dosage cinétique, il est important de réaliser de multiples essais (dans l'idéal, trois) et d'inclure les barres d'erreur. Cela lui permet de décider si vos résultats sont dus au hasard ou s'ils sont constants et significatifs.

ANNEXE 1 : ÉTALONNAGE DES MICROPIPETTES

Avant de commencer un travail de laboratoire, quel qu'il soit, il est important de vérifier la précision des micropipettes qui seront utilisées tout au long du semestre. L'eau est un moyen très simple d'y parvenir, puisqu'elle a une densité de 1 kg/litre. Par conséquent, en enregistrant les poids de différents volumes d'eau, il est facile et rapide d'évaluer la précision de la pipette, compte tenu de la fiabilité de la balance.

Utilisez le protocole ci-dessous pour remplir le tableau suivant pour chaque pipette :

Micropipette n° _____ **Volume maximum de la micropipette : _____ ml**

Paramètre de volume : _____ ml (max) Paramètre de volume : _____ ml (1/4 max)

Masse d'H₂O distillée (mg) Masse d'H₂O distillée (mg)

_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____

1. À l'aide d'une balance capable de lire en milligrammes ou une unité inférieure, effectuez la tare d'une nacelle de pesée sur le plateau de la balance.
2. Réglez la micropipette à sa capacité maximale et transférez avec soin ce volume d'eau distillée dans la nacelle de pesée.
3. Répétez l'opération quatre fois en enregistrant chaque fois dans le tableau ci-dessous le poids de l'eau distillée transférée.
4. Réglez la micropipette pour transférer 20 à 25 % de son volume maximum et répétez l'étape 3.
5. Calculez la moyenne (x-barre) et l'écart-type (s) pour chaque ensemble de mesures, en utilisant la touche appropriée sur une calculatrice.
6. Étalonnez les trois micropipettes et remplissez un tableau pour chacune d'elle comme indiqué ci-dessus.
7. À l'aide des paramètres qui ont été calculés, évaluez la précision des micropipettes.

ANNEXE 2 : SÉQUENCES GÉNÉTIQUES

Des versions **électroniques** de ces séquences sont disponibles sur Canvas.

**Gène de la
variante
thermostable
de l'anhydrase
carbonique II
humaine**

CA Gène avec sites
TAG
disponibles (en
gras et soulignés
– Phe20, Phe93,
Trp97, Lys126,
Glu186, et
Glu233), 6his-
tag (en
minuscules), et
mutations
thermostables
(en minuscules)

ATGGCGCATCATTGGGGTTACGGTAAACACAACGGTCCGGAGCATTGGCAC-AAAGAT**TTT**

**Mutations
visant à
augmenter la
thermostabilité**

A65T, L100H, K153N, L223S, L239P, A247T

**Gène de la
catalase
HPII
d'*E. coli***

Gène avec
6his-tag et
sites tags
disponibles
(en gras et
soulignés –
Phe206,
Glu283,
Lys348,
His392,
Tyr415, et
Asp568) et
6his-tag
avec
séquence de
liaison (en
minuscules)

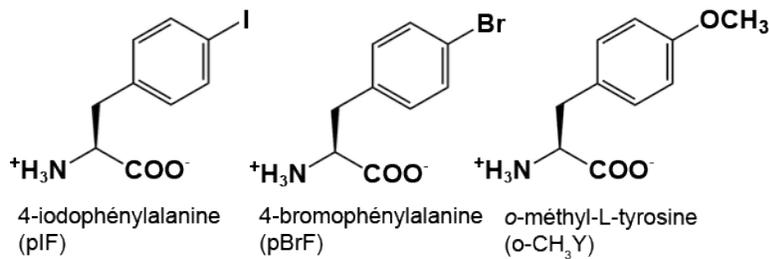
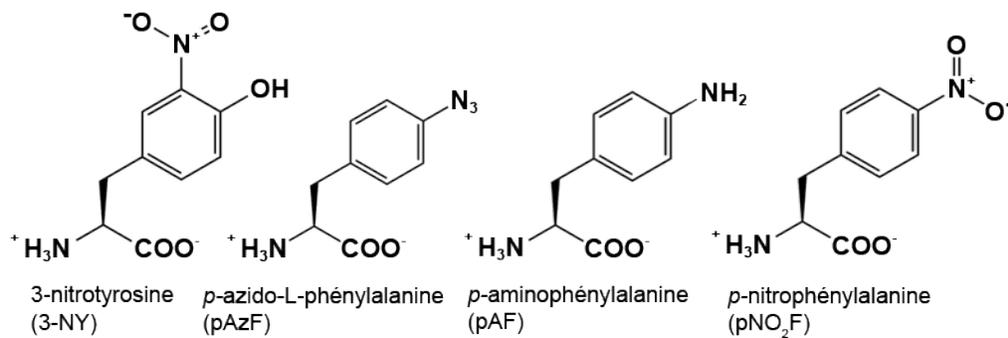
HPII

atggggggttctcatcatcatcatcatcatcatggtagctgactggtggacagcaaatgggtcggga-

tctgtacgacgatgacgataaggatcgatgggatccgagctcgagTCGCAACATAACGAAAAG-AACCCACATCAGCACCA

ANNEXE 3 : STRUCTURES DES ACIDES AMINÉS NON CANONIQUES DISPONIBLES

(Remarque : toutes les structures ne sont pas disponibles pour chaque site de chaque enzyme)



ANNEXE 4 : MILIEUX NON INDUCTIFS OU À AUTO-INDUCTION

Milieu non inductif pour cultures de départ

Lors de l'inoculation du milieu à auto-induction par les cellules, il est possible d'utiliser des cultures de départ saturées dans un milieu riche (c.-à-d. des cellules saturées dans un bouillon 2XYT). Cependant, il est également possible d'utiliser des cultures de départ saturées cultivées dans un milieu non inductif, qui sont stables pendant une période beaucoup plus longue lorsqu'elles sont conservées à 4 °C (jusqu'à une semaine, voire au-delà). Pour fabriquer 1 litre de milieu non inductif, suivez les instructions ci-dessous.

Milieu non inductif pour cultures de départ (1 l)

Aspartate (5 %, pH 7,5) 50 ml

Sels minéraux (25 x) 40 ml

Glucose (40 %) 12,5 ml

MgSO₄ (1 M) 2 ml

Métaux traces (5 000 x) 200 ml

Mélange de 18 AA (25 x) (à 4°C) 40 ml (pour une croissance plus rapide de la culture de départ)

Ajoutez les antibiotiques appropriés (ampicilline à une concentration finale de 100 mg/ml et tétracycline à 25 mg/ml).

Ajoutez de l'eau stérile pour obtenir un volume final de 1 l.

Environ 4 à 5 ml de milieu non inductif suffit pour un milieu de départ d'une culture cellulaire spécifique. Inoculez ce volume de milieu de départ non inductif avec 40 à 50 ml de 2XYT saturé ou autre culture de départ en milieu saturé.

Milieu à auto-induction pour les expressions

Pour fabriquer 100 ml de milieu à auto-induction (AIM), suivez les instructions ci-dessous.

Ajustez la quantité à fabriquer nécessaire à votre expérience en fonction des quantités suivantes pour 100 ml. Préparez un mélange frais et ne prévoyez pas de stocker le milieu à auto-induction en excès.

Aspartate (5 %, pH 7,5) 5 ml

Glycérol (10 %) 5 ml

Sels minéraux (25x)	4 ml
Glucose (40 %)	0,125 ml
MgSO ₄ (1 M)	0,2 ml
Arabinose (20 %)	0,25 ml
Métaux traces (5 000x)	20 ml
Mélange de 18 AA (25x) conservé à 4 °C	4 ml

Ajoutez les antibiotiques appropriés (ampicilline à une concentration finale de 100 mg/ml et tétracycline à 25 mg/ml).

Ajoutez de l'eau stérile pour obtenir un volume final de 100 ml.

ANNEXE 5 : LISTE DE RÉFÉRENCE POUR LE MATÉRIEL

Équipement général de laboratoire

- Agitateur pour les gels (sur la paillasse latérale)
- Ordinateurs (1 par groupe) – apportez un ordinateur portable
- Spectrophotomètre UV-Visible (dans la pièce voisine)
- Vernier Lab Quest 2 et assortiment de sondes (capteur de pH, capteur de pression des gaz, capteur d'oxygène dissous)
- Tampon isolant à 100 °C (dans la hotte de laboratoire)
- Agitateur-mélangeur vortex
- Bonbonne contenant de l'eau Millipore
- Contenant pour objets contaminés pour élimination des déchets de niveau de biosécurité 1
- pH-mètre, étalons, 5 N HCl, 8 N NaOH
- Centrifugeuses (une grande et une petite)
- Balance
- Spatules

Équipement à usage minimal

- Microfluidiseur – Laboratoire central Mehl Demandez de l'aide à l'assistant d'enseignement.
- Tubes pour centrifugeuse haute vitesse (40 ml, réutilisables) (appelés tubes Oak Ridge)
- Plateaux de gel SDS-PAGE, plaques en verre et peignes
- Contenant de stockage en plastique (pour les gels)
- Fioles avec déflecteurs de 250 ml équipées de capuchons à membrane violets
- Bouteilles 1 l et 500 ml, bouteilles et fioles 150 ml
- Fioles Erlenmeyer
- Tubes à culture en verre stérile

- Agitateur
- Pincés pour agitateur

Groupe

- Eau stérile
- Bouts de pipette : 100-1 000 ml, 1-200 ml,
- Support pour tubes à essai Falcon
- 2 boîtes de groupe (une pour conserver à 4 °C et une pour le congélateur à -20 °C)
- Microtubes à centrifugation (1,7 ml et 0,65 ml) en cuves
- Support pour microtubes à centrifugation
- Pipette automatique et chargeur
- Ruban d'étiquetage et marqueur
- Seau à glace (sous la table)
- Ciseaux
- Pissette d'eau Millipore
- Pissette d'éthanol à 95 %
- Récipient d'élimination des déchets
- Récipient d'élimination des liquides
- Ensemble de trois micropipettes (20, 200, 1 000 µl)
- Support pour pipette
- Bec Bunsen et tubulure
- Briquet de bec Bunsen

Tiroirs, étagères et placards communs ou paillasse de fournitures

- Tubes coniques de 50 ml avec couvercle (stériles et non stériles)
- Tubes coniques de 15 ml avec couvercle (stériles et non stériles)
- Pipettes sérologiques de 25 ml
- Pipettes sérologiques de 10 ml
- Pipettes sérologiques de 5 ml
- Support en mousse de polystyrène
- Lames de rasoir
- Tubes Eppendorf stériles en cuves de verre
- Essuie-tout
- Gants
- Ruban de marquage

Produits chimiques (Spécialités, il est possible de substituer les fournisseurs)

- Composants de milieux à auto-induction (adapté de *Nature Protocols*)
- Bouillon 2x YT (Fisher, BP2467-2)
- Dodécyl sulfate de sodium (Fisher, BP166-100)
- Sel de sodium de bleu de bromophénol (Sigma, B-5525)
- β mercapto-éthanol (Sigma, M7154)
- Coloration bleu de Coomassie brillant G (Sigma, B0770)
- Réactif de dosage protéique Coomassie Bradford (Bio-Rad Quick Start)
- Lysozyme (Fisher, BP535-10)
- Solutions tampons pour pH-mètre (Thomas Scientific, numéros 4120G52, 4120G60, et 4120G68 pour les pH 4, 7, and 10, respectivement)
- Acides aminés non canoniques

Produits chimiques préparés

- Solution d'acrylamide à 30 % pour SDS-PAGE (Bio-Rad, préparée)
- Tampon de migration 10x pour SDS-PAGE, pH 8,3 (préparez 500 ml)
 - 250 mM de Tris base
 - 92 M de glycine
 - 1 % de solution SDS
- Colorant de charge SDS 2x pour SDS-PAGE, pH 6,8 (préparez 10 ml)
 - 125 mM de Tris HCl
 - 4 % de solution SDS
 - 20 % de glycérol
 - 0,02 % de bleu de bromophénol
 - 5 % de β mercapto-éthanol
- Solution de coloration pour les gels protéiques (les assistants d'enseignement les prépareront)
 - 250 ml de méthanol
 - 200 ml d'H₂O
 - 50 ml d'acide acétique glacial
 - Coloration bleu de Coomassie brillant G
- Solution de décoloration pour les gels protéiques (les assistants d'enseignement les prépareront)
 - 250 ml de méthanol
 - 200 ml d'H₂O
 - 50 ml d'acide acétique glacial

- 5 M de solution de réserve de NaCl
- 1 M chacune de solution de réserve de phosphate de sodium monobasique et de phosphate de sodium dibasique, ou préparez une solution de réserve de phosphate au pH souhaité.
- Solution d'équilibrage 5x pour purification des protéines, pH 7,0
 - 250 mM de phosphate de sodium pH 7 (se reporter au tableau de mélange des solutions de phosphate de sodium pour obtenir 0,1 M pH 7 ou utilisez une solution de réserve préparée au pH souhaité)
 - 5 M de NaCl
- Solution d'équilibrage/de lavage 1x pour purification des protéines, pH 7,0
 - 50 mM de phosphate de sodium
 - 300 mM de NaCl
- Tampon d'élution 1x pour purification des protéines, pH 7,0
 - 50 mM de phosphate de sodium
 - 300 mM de NaCl
 - 250 mM d'imidazole

ANNEXE 6 : LISTE DES SITES, DES ACIDES AMINÉS NON CANONIQUES ET DES PLASMIDES DISPONIBLES

Plasmides d'expression disponibles	Protéine encodée	Résistance aux antibiotiques	Identifiant Addgene
pBad CA natif	CA thermostable de type sauvage	ampicilline	105665
pBad CA TAG20	CA thermostable TAG20	ampicilline	105666
pBad CA TAG93	CA thermostable TAG93	ampicilline	105667
pBad CA TAG97	CA thermostable TAG97	ampicilline	105668
pBad CA TAG126	CA thermostable TAG126	ampicilline	105836
pBad CA TAG186	CA thermostable TAG186	ampicilline	105837
pBad CA TAG233	CA thermostable TAG233	ampicilline	105838
pBad HP11 natif	Catalase HP11 de type sauvage	ampicilline	105839
pBad HP11 TAG206	Catalase HP11 TAG206	ampicilline	105846
pBad HP11 TAG392	Catalase HP11 TAG392	ampicilline	105848
pBad HP11 TAG415	Catalase HP11 TAG415	ampicilline	105847
pBad HP11 TAG568	Catalase HP11 TAG568	ampicilline	105845
pBad HP11 TAG283	Catalase HP11 TAG283	ampicilline	105843
pBad HP11 TAG348	Catalase HP11 TAG348	ampicilline	105844
pBad sfGFP	sfGFP	ampicilline	85482
pBad sfGFP TAG150	sfGFP TAG150	ampicilline	85483

CA : anhydrase carbonique II humaine thermostable

HPII : catalase HPII d'*E. coli*

sfGFP: superfolder green fluorescent protein (protéine fluorescente verte superfolder)

Enzyme	Site d'insertion de TAG	ncAA pour incorporation
	F20	3-NY, pAzF, p-NO2F, pBrF, pAF, pIF, O-CH3Y
	F93	3-NY, pAzF, p-NO2F, pBrF, pAF, pIF, O-CH3Y
CA	W97	3-NY, pAzF, p-NO2F, pBrF, pAF, pIF, O-CH3Y
Humaine thermostable	K126	3-NY, pAzF, p-NO2F, pBrF, pAF, pIF, O-CH3Y
	E186	3-NY, pAzF, p-NO2F, pBrF, pAF, pIF, O-CH3Y
	E233	3-NY, pAzF, p-NO2F, pBrF, pAF, pIF, O-CH3Y
	F206	3-NY, pAzF, p-NO2F, pBrF, pAF, pIF, O-CH3Y
	E283	3-NY, pAzF, p-NO2F, pBrF, pAF, pIF, O-CH3Y
HPII	K348	3-NY, pAzF, p-NO2F, pBrF, pAF, pIF, O-CH3Y
<i>E. coli</i>	H392	3-NY, pAzF, p-NO2F, pBrF, pAF, pIF, O-CH3Y
	Y415	3-NY, pAzF, p-NO2F, pBrF, pAF, pIF, O-CH3Y
	D568	3-NY, pAzF, p-NO2F, pBrF, pAF, pIF, O-CH3Y

Plasmide GCE	Machinerie moléculaire	ncAA compatibles pour incorporation	Résistance aux antibiotiques	Identifiant Addgene
pDule-para-aminoPhe	pAF	pAF	tétracycline	85502
pDule-3-nitrotyrosine	NitroY	3-NY	tétracycline	85498
pDule-pCNF	pCNF	pAzF, p-NO2F, pBrF, pIF, O-CH3Y	tétracycline	85494

Abréviations des ncAA :

- 3-NY : 3-nitrotyrosine
- pAzF: *para*-azidophénylalanine
- p-NO2F: *para*-nitrophénylalanine
- pBrF: *para*-bromophénylalanine
- pAF: *para*-aminophénylalanine
- pIF: *para*-iodophénylalanine
- O-CH3Y : *O*-méthyltyrosine (synonyme : 4-méthoxy-phénylalanine)

LICENCE CREATIVE COMMONS

Cet ouvrage est protégé par Ryan Mehl, Kari van Zee & Kelsey Keen par une licence internationale Attribution – Pas d'utilisation commerciale 4.0 de Creative Commons (CC BY-NC)

Vous êtes libre de :

Partager – copier et redistribuer le matériel par le moyen ou dans le format de votre choix

Adapter – remixer, transformer et bâtir à partir du matériel

Le donneur de licence ne peut révoquer ces libertés tant que vous respectez les conditions de la licence.

Selon les modalités suivantes :

Attribution – Vous devez accorder le crédit approprié, fournir un lien vers la licence et indiquer si des changements ont été effectués. Vous pouvez le faire de toute manière qui vous paraît raisonnable, mais sans qu'elle suggère que le donneur de licence vous approuve ou approuve votre utilisation.

Non commercial – Vous ne pouvez pas utiliser le matériel à des fins commerciales.

Pas de restrictions supplémentaires – Vous ne pouvez pas appliquer de conditions juridiques ou de mesures technologiques qui empêchent légalement d'autres personnes de faire ce qui est permis par la licence.

RECOMMANDATIONS POUR LES CITATIONS

Selon les normes de l'**APA** :

Source provenant d'un site Web :

- (Nom complet, première initiale du prénom). (Date de publication). Titre de la source. Tiré de <https://www.someaddress.com/full/url/>

Source provenant d'un document imprimé :

- (Nom complet, première initiale du prénom). (Date de publication). Titre de la source. Titre du contenant (entité la plus grande à laquelle appartient la source, c.-à-d., un chapitre dans un livre), numéro du volume, numéros des pages.

Exemples

Si tiré d'une page Web :

- *Berndt, T. J. (2002). Friendship quality and social development.* Tiré de insérer le lien.

Si tiré d'un livre :

- *Berndt, T. J. (2002). Friendship quality and social development. Current Directions in Psychological Science, 11, 7-10.*

Selon les normes de la **MLA** :

Auteur (nom, prénom). Titre de la source. Titre du contenant (entité la plus grande à laquelle appartient

la source, c.-à-d., un chapitre dans un livre), autres contributeurs, version, numéro, maison d'édition, date de publication, emplacement (numéros des pages).

Exemples

- Bagchi, Alaknanda. « Conflicting Nationalisms: The Voice of the Subaltern in Mahasweta Devi's Bashai Tudu. » *Tulsa Studies in Women's Literature*, vol. 15, n^o 1, 1996, p. 41-50.
- Said, Edward W. *Culture and Imperialism*. Knopf, 1994.

Selon les normes de **Chicago** :

Source provenant d'un site Web :

- Nom, prénom. « Titre de la page Web. » Nom du site Web. Organisme d'édition, date de publication ou de révision si disponible. Date d'accès si aucune autre date n'est disponible. URL.

Source provenant d'un document imprimé :

- Nom, Prénom. *Titre du livre*. Lieu de publication : Maison d'édition, année de publication.

Exemples

- Davidson, Donald, *Essays on Actions and Events*. Oxford : Clarendon, 2001.
<https://bibliotecamathom.files.wordpress.com/2012/10/essays-on-actions-and-events.pdf>.
- Kerouac, Jack. *The Dharma Bums*. New York : Viking Press, 1958.

VERSIONNAGE

Cette page indique les modifications apportées à cette publication. Chaque série de modifications est indiquée par une augmentation de 0,01 du numéro de version. Les fichiers exportés, disponibles sur la page d'accueil, reflètent la version la plus récente.

Si vous découvrez une erreur dans ce texte, veuillez remplir le formulaire sur bit.ly/33cz3Q1.

Version	Date	Modification effectuée	Emplacement dans le texte
1.0	AAAA/ MM/JJ		
1.01	2020/10/20	Liens vers les ressources externes mis à jour	Tous