

Séquençage N terminal

Analyse de séquence N-terminale (Séquençage d'Edman)

Les protéines destinées à être séquencées doivent se trouver dans des conditions de milieu très restrictives pour que la chimie d'Edman puisse se dérouler sans encombre. Il est essentiel que les modes de préparation du matériel protéique ou peptidique soient connus précisément avant le début de l'analyse.

La technique de microséquencage peut être réalisée à partir soit d'échantillons en solution dans un milieu adéquat, soit d'échantillons fixés sur une membrane de PVDF (polyvinylidène difluorure) de type ProblottT. L'immobilisation sur PVDF peut être obtenue de plusieurs façons, soit à partir de solution, soit par (électro)transfert depuis un gel d'électrophorèse.

Il est fondamental de connaître la quantité de protéine fournie (ou la concentration de la solution) car, sans cette donnée, il n'est pas possible de connaître le rendement initial de clivage, donc de savoir si l'on est en train de séquencer la protéine d'intérêt ou bien une impureté protéique contaminante, lorsque l'échantillon possède une extrémité N-terminale bloquée.

Si le N-terminal est bloqué, son déblocage demande une étude longue et improbable. C'est pourquoi nous ne nous engagerons pas dans cette voie. En revanche, il est possible de pratiquer une endoprotéolyse, de séparer les peptides ainsi obtenus et de les séquencer individuellement pour obtenir des données de séquences internes.

Remarque importante

La fourniture détaillée de toutes les informations que possède le demandeur sur la protéine à séquencer, notamment l'objectif recherché, est indispensable à la bonne mise en oeuvre du séquençage. Ces informations guideront les choix méthodologiques et optimiseront les coûts.

1. Échantillons en solution ou séparés sur gel SDS PAGE

Sur le plan quantitatif, pour une expérience et dans des conditions standards, il faut au moins 1 picomole de protéine séquençable, soit 2 à 5 picomoles déposées (100 à 250 nanogrammes de protéines de 50 kDa) pour une séquence N-terminale d'au moins 10 résidus. Le nombre maximal de résidus déterminables dépend de la pureté de la protéine, de sa quantité, de son hydrophilicité et de l'enchaînement des acides aminés.

L'idéal est que cette quantité de protéine parvienne dissoute dans un tampon approprié (cf infra), à la concentration de 1 picomole par microlitre environ. Avec des quantités de matériel aussi faibles, il y a un risque très important d'adsorption des produits lyophilisés et d'impossibilité de redissolution. Il est nécessaire de disposer de solutions contenues dans des tubes de type Eppendorf.

Par tampon approprié, il faut entendre un tampon volatil, c'est-à-dire, par exemple, l'eau pure, une solution alcoolique, une solution d'acétonitrile, d'acide acétique, voire d'acide trifluoroacétique ou encore d'acétate d'ammonium. Les sels sont absolument exclus. Les tampons tels que Tris-glycine sont définitivement rédhibitoires, car contenant un acide aminé ou des fonctions amines en très grande abondance relative. L'urée, le chlorure de guanidinium et le SDS doivent aussi être évités.

Les meilleures méthodes de préparation d'échantillon sont soit la chromatographie liquide haute performance en phase inverse, soit la reprise d'une protéine lyophilisée dans l'eau pure.

Nous travaillons souvent sur des échantillons protéiques séparés par gel SDS PAGE. Dans ce cas là, un pool de 5 à 6 bandes de gel du même échantillon, colorées au bleu de Coomassie, est nécessaire pour le séquençage.

2. Séquençage à partir d'échantillons fixés sur membrane

Le transfert sur membrane permet de dessaler et de laver très efficacement un échantillon. C'est aussi le moyen de récupérer une protéine à partir d'un gel d'électrophorèse. Enfin, après fixation sur membrane, il est facile de procéder à la protéolyse d'une protéine (trypsinolyse).

Technique Prosorb: permet, sans centrifugation et en un temps court, de débarrasser une protéine d'agents chaotropes, de sels et de SDS, après dilution éventuelle. Il convient d'aboutir à une quantité minimale de protéine de 2 à 5 picomoles.

Électrotransfert : technique électrophorétique qui aboutit au transfert de toutes les protéines d'un gel ni coloré ni fixé sur une membrane ProblottT qui pourra ensuite être colorée (bleu de Coomassie, rouge Ponceau, etc., mais pas de nitrate d'argent) avant découpe des spots d'intérêt. C'est la méthode la plus sensible et la meilleure pour alimenter un séquenceur d'Edman.

Transfert passif : peut être obtenu avec une bande ou un spot électrophorétique coloré au bleu de Coomassie, mais avec un rendement qui entraîne une perte de matériel, donc une baisse de sensibilité. Cette technique demande 72 heures d'incubation.

Pour déterminer la séquence N-terminale d'une protéine contenue dans une bande ou un spot électrophorétique, la méthode de choix est l'électrotransfert d'un gel ni fixé ni coloré, suivi de la coloration de la membrane au bleu de Coomassie.

Si le gel a été initialement coloré au bleu de Coomassie, on peut procéder à un transfert passif du fragment de gel, ou, après broyage du spot, à une récupération de la protéine par HPLC ou encore par la technique Prosorb. En aucun cas on ne peut utiliser un gel coloré au nitrate d'argent.