

UE 11 : TP Biologie cellulaire

Séances 2-3 :

FRACTIONNEMENT CELLULAIRE ET ANALYSE PAR WESTERN-BLOTT DES DIFFERENTES FRACTIONS

Matériel :

Cellules Hela, PBS, trypsine-EDTA, milieu de culture,
Cellule de Malassez,
6 microtubes dont 5 seront numérotés de 1 à 5. Tous les microtubes seront maintenus dans la glace avant utilisation,
Les tampons d'extractions : CEB, MEB, NEB doivent être maintenus dans la glace.
Les tampons PEB et NEB*(NEB + CaCl₂ + MNase) doivent être maintenus à température ambiante.
Papier filtre,
Membrane de nitrocellulose.

Les phases B et C seront réalisées en parallèle

A : Préparation de l'échantillon

- 1- préparer une suspension de cellules Hela (traitement à trypsine-EDTA, cf TP1), et déterminer la concentration cellulaire (cellule de Malassez),
- 2- prélever $2,2 \cdot 10^6$ cellules dans un microtube et centrifuger 3 min à 500g,
- 3- éliminer le surnageant et reprendre le culot dans 1 ml de PBS,
- 4- centrifuger 3 min 500g,
- 5- éliminer le surnageant.

B : Fractionnement sub-cellulaire

- 1- ajouter 200 µl de tampon CEB au culot de cellules, remettre en suspension, incubé 10 min dans la glace en agitant doucement de temps en temps,
- 2- centrifuger 5 min à 500 g et transférer immédiatement **le surnageant** dans le microtube 1 maintenu dans la glace et identifié,
- 3- ajouter au culot 200 µl de tampon MEB maintenu dans la glace, remettre en suspension avant de vortexer à la vitesse maximum puis, incubé 10 min dans la glace,
- 4- centrifuger à 3000g pendant 5 min,
- 5- **prélever le surnageant** et le déposer dans le tube 2,
- 6 - ajouter au culot 100 µl de tampon NEB maintenu dans la glace, remettre le culot en suspension avant de vortexer à la vitesse maximum pendant 15 sec. Incuber dans la glace 30 min en agitant doucement,
- 7- centrifuger à 5000 g pendant 5 min. **Transférer le surnageant** dans le tube 3,

- 8- ajouter au culot 100 µl de tampon NEB*(= NEB + CaCl₂+Micrococcal Nucléase) maintenu à température ambiante, remettre le culot en suspension,
- 9- incuber 15 min à température ambiante (ou **5 min à 37 °C**),
- 10- après incubation, vortexer au maximum pendant 15 sec et centrifuger 5 min à 16 000g,
- 11- **récupérer le surnageant** dans le microtube 4 maintenu dans la glace,
- 12-ajouter au culot 100 µl de tampon PEB, remettre le culot en suspension puis vortexer 15 sec à la vitesse maximum. Incuber 10 min à RT,
- 13-centrifuger 5 min à 16 000g et **récupérer le surnageant** dans le microtube 5 maintenu dans la glace,
- 14- **à partir de chacun de vos microtubes** (numérotés de 1 à 5), préparer un échantillon en prélevant 20 µl , ajouter 20µl de tampon d'échantillon SB2X,
- 15- **incuber 5 min à 95°C** puis déposer sur votre gel d'électrophorèse.

Abréviations :

CEB = tampon d'extraction du cytoplasme

MEB = tampon d'extraction de la membrane plasmique

NEB = tampon d'extraction des protéines nucléaires

PEB = tampon d'extraction des protéines du culot

RT : température ambiante

C : analyse par WB

1. Montage des plaques d'électrophorèse

2. Préparation du gel de séparation à 12 % d'acrylamide :

- 3 ml d'acrylamide
- 2 ml H₂O distillée
- 5ml lower Tris
- 70 µl APS (persulfate d'ammonium)
- 10 µl TEMED

3. déposer entre les plaques de verre, 4,5 ml de la solution d'acrylamide à 12 %

4. déposer un film d'une solution d'isobutanol/eau

5. laisser polymériser

6. Préparation du gel de concentration

- 300 µl d'acrylamide
- 2,7 ml H₂O distillée
- 1 ml upper tris
- 25 µl APS (persulfate d'ammonium)
- 8 µl TEMED

7. mettre le peigne 10 puits

8. laisser polymériser

9. pendant les temps de polymérisation, préparer (par groupe de travail) 4 feuilles de papier filtre de dim 9x6,5cm et 1 membrane de nitrocellulose de même dimension

10. installer les gels dans la cuve d'électrophorèse en présence de tampon d'électrophorèse, Puis déposer les échantillons sans oublier le kit de poids moléculaire.

11. faire migrer

12. Après la migration, démouler les gels, éliminer les gels de concentration, mettre les gels de séparation dans le tampon de transfert

13. monter le sandwich pour le western-blott :

- 2 feuilles de papier filtre
- 1 membrane de nitrocellulose
- Le gel
- 2 feuilles de papier filtre

14. pendant le transfert :

- préparer la solution de saturation :
5 g lait en poudre + 100 ml de tampon PBS + 0,1% tween 20
- préparer les solutions d'anticorps I

15. après transfert, saturer la membrane par incubation dans la solution de saturation pendant 20 min

16. faire 3 lavages avec la solution de PBS tween,

17. incuber 20 min avec la solution d'Ac I,

18. 3 lavages,

19. incubation 20 min avec la solution d'Ac II,

20. 3 lavages,

21. incubation avec le réactif de révélation par chimioluminescence 5 min,

22. lire les résultats !!!!

Compte-rendu

- Présenter les objectifs de la manipulation
- Préparation détaillée des cellules en justifiant chacune des étapes
- Principe du fractionnement cellulaire : expliquer chacune des étapes
- Principe de l'électrophorèse SDS-PAGE et du western-blott
- Analyse critique des résultats de toute la salle !!!