

Purification de protéines par streptavidine-biotine : et après ?

Yann VERDIER¹ ; Hidehiro FUKUYAMA² ; Segal NDIAYE¹ ; Iman HADDAD¹ ; Jean ROSSIER³ ; Jules HOFFMANN² et Joëlle VINH¹

¹ ESPCI ParisTech – USR 3149 - SMBP: 10 rue Vauquelin 75231 Paris cedex

² Centre National de La Recherche Scientifique - Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, 15 rue René Descartes, 67084Strasbourg

³ ESPCI ParisTech - UMR 7637; 10 rue Vauquelin 75231 Paris cedex

Pour identifier les partenaires d'une protéine-cible, de nombreuses stratégies se basent sur le marquage à la biotine de la protéine d'intérêt, sa mise en présence des candidats partenaires, suivi d'une purification du complexe par affinité streptavidine-biotine. Les protéines sont ensuite éluées et, après digestion enzymatique, peuvent être identifiées par différentes approches protéomiques. L'étape d'éluion est une étape extrêmement sensible de ces stratégies, en raison de la très grande stabilité du complexe biotine-streptavidine ($K_D = 10^{-15}$ M). En effet, une éluion idéale doit permettre de récupérer le maximum de protéines, tout en les conservant dans un milieu et un volume compatibles avec la digestion enzymatique et les analyses protéomiques. Une autre stratégie possible consiste à digérer les protéines avant leur éluion, et à éluer les peptides avant leur analyse par spectrométrie de masse.



But de l'étude

Ce travail vise à tester, sur un échantillon complexe, différents modes opératoires permettant d'identifier les partenaires d'une protéine biotinillée

purifiée sur des billes recouvertes de streptavidine.

De plus, l'intérêt de l'utilisation d'une liste d'exclusion pour identifier des protéines dont les peptides sont moins abondants est évalué.

MATERIEL & METHODES

Matériel biologique

- 2 x 10⁸ cellules de drosophile 1F3 transfectées par la protéine Dredd (protéine impliquée dans la réponse immunitaire anti-bactérienne) marquée en N-terminale par la biotine
- 10 min après un challenge bactérien, lyse des cellules
- purification des complexes par affinité : streptavidine couplée à des billes de sépharose : volume final : 200 μ L, répartis en 4 tubes de 50 μ L.

Eluion des protéines :

Après 2 lavages, les protéines sont éluées de différentes façons :

Désignation	Tampon	Incubation	D'après
Ethanol	30% Ethanol, 1% TFA Vf = 50 μ L	20 min à TA	[1]
Glycine	Glycine 0.1 M pH 2.5 Vf = 50 μ L	5 min à TA Neutralisation tris pH 8.8 1M	[2]
Biotine	30 mM biotine, 2% SDS, 150 mM NaCl, 6M urée, 2 M thiourée. Vf = 50 μ L	15 min à TA puis 15 min à 96 °C	[3]

Digestion sur billes (avant éluion)

Précédée par une réduction/alkylation (DTT 5mM final, 30 min, 56°C / Iodoacétamide 25mM final 20 min au noir)
Incubation *overnight* avec 10 ng de trypsin.
Récupération des peptides et élimination des billes à travers pointes C18 Proxeon (voir photo) dans un Vf 60 μ L

Digestion liquide (après éluion)

Précédée par une réduction/alkylation (DTT 5mM final, 30 min, 56°C / Iodoacétamide 25mM final 20 min au noir)
Incubation *overnight* avec 10 ng de trypsin. Élimination du SDS du protocole « Biotine » par colonnes ZipTip μ PL (millipore).
Tampons échangés contre tampon A

Digestion en gel

Gel 12% acrylamide coloré au bleu de Coomassie. Piste coupée en 6 bandes, réduction/alkylation (DTT 5mM final, 30 min, 56°C / Iodoacétamide 25mM final 20 min au noir).
Incubation *overnight* avec 100 ng de trypsin. Dessalage sur colonnes ZipTip C18 (millipore).

LC MSMS

Les peptides dilués à 1/5 sont séparés sur une colonne de phase inverse capillaire (Pepmap C18, 75 μ m DI, 15 cm de longueur, Dionex) à un débit constant de 220 nL/min., sur un gradient de 90 min. Spectromètre de type FTICR (LTQ-FT, Thermofisher, San Jose, CA USA). Résolution 6000, entre 500 et 2000 Da, suivi de 7 scans MS/MS (LTQ) sur les pics les plus intenses. Exclusion 90 sec des précurseurs fragmentés.

Recherches

MASCOT, Banque 17D melanogaster (16535 entrées), 2 MC, précision MS: 10ppm, précision MSMS : 1 Da
Modifications partielles: Carbamidométhylation (C), oxydation (M, H, W), Phosphorylation (Y)
Les protéines identifiées par 1 peptide score >50 ou 2 peptides score >30 sont validées.

RESULTATS

PROTOCOLES D'ELUION

Eluion 30% Ethanol, 1% TFA

- ✓ Efficacité faible (pas de bandes vues sur un gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie)
- ✓ Compatible avec une digestion liquide

Eluion 0.1M Glycine, pH 2.5

- ✓ Efficacité faible (pas de bandes vues sur un gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie)
- ✓ Compatible avec une digestion liquide

Eluion 30 mM biotine, 2% SDS, 6M urée, 2 M urée

- ✓ Eluion efficace (nombreuses bandes vues sur un gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie)
- ✓ Non compatible avec une digestion liquide suivie d'une analyse LC MSMS, en raison du SDS, difficile à éliminer.
- ✓ Compatible avec une purification sur gel SDS-PAGE suivie d'une digestion en gel et analyse par LC MSMS. Dans ce cas, les protéines identifiées sont souvent différentes de celles identifiées après la digestion en gel. Elles sont beaucoup plus proches de celles identifiées par les protocoles de digestion liquide.

DIGESTION SUR BILLES

- ✓ Aussi efficace que le protocole « biotine - gel d'électrophorèse – LC MSMS » en terme de nombre de protéines identifiées, cependant les protéines identifiées sont différentes de celles identifiées après la digestion en gel. Elles sont beaucoup plus proches de celles identifiées par les protocoles de digestion liquide.

- ✓ L'éluion dans un tampon directement compatible avec la LC MSMS est un atout important, permettant un gain de temps appréciable..

LES PEPTIDES DE LA STREPTAVIDINE GÈNENT-ILS L'IDENTIFICATION?

En digérant les protéines fixées sur les billes, on digère également la streptavidine, très abondante.

L'utilisation d'une liste d'exclusion de ces peptides des analyses MSMS (précision 10 ppm sur toute l'analyse) permet d'identifier de nouveaux peptides. Par extension, il est utile d'exclure les peptides des protéines déjà identifiées.

Ces nouveaux peptides permettent d'identifier de nouvelles protéines et d'augmenter la couverture de séquence des protéines déjà identifiées.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

- ✓ Pour cette étude, nous avons utilisé un modèle biologique complexe : les partenaires d'une protéine marquée à la biotine. Des tests biologiques ultérieurs ont montré que les protéines identifiées après la digestion sur billes semblent effectivement impliquées dans le complexe. L'évaluation des protéines identifiées après digestion en gel est en cours.
- ✓ Différents workflows ont été testés. Comme décrit dans la littérature, l'éluion dans un milieu biotine, SDS, urée thiourée s'est révélée très efficace [3], mais en raison du SDS est difficilement compatible avec les méthodes d'analyse *gel-free*. Cette éluion suivie d'une purification sur gel SDS-PAGE est efficace mais très lourde.
- ✓ La digestion trypsique directement sur les billes s'est révélée être une alternative intéressante à ces protocoles d'éluion suivis d'une digestion en milieu liquide. En plus de son efficacité, cette méthode est plus rapide que la plupart des protocoles d'éluion testés. Les peptides provenant de la streptavidine digérée ne gênent pas l'identification des protéines du complexe, d'autant plus qu'ils peuvent être exclus des analyses MS/MS.
- ✓ La digestion en solution présente l'avantage par rapport aux digestions en gel de permettre des études des domaines structurels ou fonctionnels de protéines impliquées dans des complexes protéiques, grâce à des protéolyses ménagées ou protégées [4]. Cet avantage se retrouve pour la digestion sur billes.
- ✓ Une des limites de ce protocole pourrait être liée au fait que l'on travaille sur le volume mort entre les billes, qui est difficilement manipulable. Ceci pourrait poser des problèmes pour la quantification et la comparaison entre échantillons. Nous avons testé ce protocole sur des billes magnétiques, qui nous ont permis d'avoir une plus grande répétabilité dans les volumes élués.
- ✓ Par ailleurs, nous avons testé avec succès ces digestions directes sur d'autres types de billes : billes de sépharose, d'agarose, magnétiques... Dans le cas des immunoprécipitations, ce protocole peut aussi être employé, mais les peptides provenant des anticorps sont plus nombreux et gênent les analyses MS/MS.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Engel L, Becky Godat B, Rod Flemming M, Johnson T. Alternative Elution Conditions for the Mass Spectrometry Analysis of Polyhistidine-Tagged Proteins. *Promega eNotes* 2006. <http://www.promega.com/enotes/applications/ap0070.html>
- [2] BioMag.Streptavidin Magnetic Beads. Fiche technique Bioclon. <http://www.bioclon.com/magnetic-streptavidin-beads.pdf>
- [3] Rybak J, Scheurer SB, Neri D, Elia G. Purification of biotinylated proteins on streptavidin resin: a protocol for quantitative elution. *Proteomics*. 2004 4(8):2296-9.
- [4] Medziradzky K. In-solution digestion of proteins for mass spectrometry. *Methods Enzymol*. 2005 405: 50-65.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier très chaleureusement Karim Majzoud et Jun Matsubayashi (IBMC, Strasbourg) pour leur aide et leur disponibilité.

Merci également à Nicolas Sergeant (INSERM, Lille) pour les discussions très utiles que nous avons eues.

Score Mascot (nombre de peptides uniques) des familles de protéines co-purifiées avec Dredd identifiées.

	Eluion Ethanol Digestion liquide	Eluion Glycine Digestion liquide	Eluion Biotine Digestion liquide	Eluion Biotine Digestion en gel	Digestion sur billes
MCCC2_DROME	224 (5)	1118 (9)	98 (2)	669 (5)	386 (6)
Q7K550_DROME	563 (12)	307 (4)			1249 (12)
Q0E9E2_DROME	347 (9)	235 (5)		2893 (30)	1669 (25)
RLA1_DROME	124 (2)	212 (2)			133 (1)
A4V4C4_DROME		164 (3)			
Q9VNA3_DROME		156 (3)			
RLA2_DROME	93 (2)	97 (1)	93 (2)		
NH2L1_DROME		88 (1)			
IF1B_DROME	91 (2)	81 (1)			77 (1)
DYL1_DROME		66 (1)			
Q9VPQ2_DROME		44 (2)			
Q3KN45_DROME	43 (2)			697 (8)	280 (4)
GLN3_DROME	41 (1)				
EF11_DROME		135 (3)		155 (2)	
ACT1_DROME		151 (1)		197 (3)	
TBA1_DROME		621 (7)		98 (1)	
A12BL0_DROME		427 (7)			
Q8I0S9_DROME		334 (3)		235 (3)	
LAM0_DROME		235 (3)			
Q9VAX7_DROME		184 (2)			
KYPK_DROME		168 (2)			
Q9VA69_DROME		158 (2)			
TCPA_DROME		148 (1)			
HSP7A_DROME		126 (2)			
HSP7B_DROME		119 (1)			
CALR_DROME		118 (2)			
Q9VBU7_DROME		104 (1)			
PABP_DROME		87 (1)			
Q7K110_DROME		85 (1)			
ATC1_DROME		79 (2)			
A12Z29_DROME		73 (1)			
RS6A_DROME		68 (1)			
Q8T6I0_DROME		65 (1)			
TCPG_DROME		60 (1)			
UBIQ_DROME		55 (1)			
Q9W228_DROME		53 (1)			
GALE_DROME				235 (2)	
Q9VJD1_DROME				175 (2)	
Q9V9T5_DROME				132 (4)	
IF2A_DROME				115 (1)	
A4V4N1_DROME				89 (1)	
Q9W1B9_DROME				89 (1)	
CATL_DROME				85 (1)	
NCD_DROME				77 (1)	
HTS_DROME				75 (1)	
Q0KID1_DROME				67 (2)	
Q9VN25_DROME				67 (2)	
Q9VXQ2_DROME				67 (1)	
Q7KX3_DROME				59 (1)	
Q8IPB9_DROME				57 (1)	
Q9VBU9_DROME				53 (1)	
Q9VEX6_DROME				50 (2)	
CP190_DROME				50 (1)	

