

A PARTIR DE GELS D'ELECTROPHORESE A UNE OU DEUX DIMENSIONS

C. Mikonio, V. Labas, J. Vinh, M. Belghazy, K. Waldron

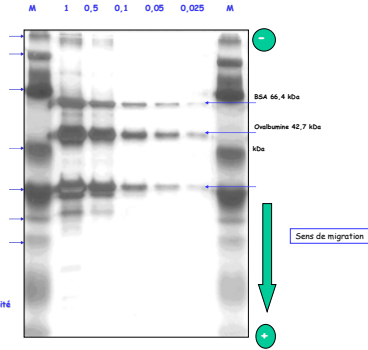
Laboratoire de Neurobiologie et Diversité Cellulaire, CNRS UMR7637, ESPCI, 10 rue Vauquelin, 75231 Paris Cedex 05

Introduction

L'analyse protéomique classique repose sur le couplage de différentes techniques : la séparation des protéines par électrophorèse à une ou deux dimensions (1D, SDS-PAGE ou 2D, IEF/SDS-PAGE), la digestion enzymatique des protéines dans le gel, l'analyse des produits de digestion par spectrométrie de masse suivie de la recherche dans les banques de données non redondantes.

La digestion protéolytique est une étape indispensable dans cette démarche. Cette technique est réalisable manuellement pour un petit nombre d'échantillons (Schevchenko *et al.*). Cependant, les étapes successives de lavages des gels, de réduction/alkylation des protéines et la durée de digestion par l'endoprotéase rendent la manipulation longue et fastidieuse. De plus en plus, des robots sont utilisés pour automatiser cette partie permettant, d'une part de diminuer le temps de manipulation et d'améliorer, d'autre part, la reproductibilité de l'analyse. Le protocole de digestion peut encore être optimisé en temps et en rapport enzyme/substrat. Il a été observé que les pics d'autolyse de la trypsine se retrouvent généralement majoritaires lors de l'analyse de protéines issues de gels colorés au nitrate d'argent. Il est donc important de diminuer la concentration de trypsine afin de.

Dans cette étude, des protéines standards séparées par SDS-PAGE et colorées au bleu de Coomassie, ont été digérées avec différentes durées d'incubation (de 30 min à 16 h) et analysées par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Différentes concentrations en trypsine ont été testées sur deux protéines de référence, présentes en quantités décroissantes dans le gel et colorées au nitrate d'argent



Séparation des protéines par SDS-PAGE

Les protéines standards utilisées pour cette étude sont le sérum albumine bovine, l'anhydrase carbonique bovine, l'ovalbumine de poulet, la myoglobine de cheval et l'hémoglobine humaine. Différentes quantités de protéines sont déposées sur le gel pour réaliser l'électrophorèse: 1/ 0,5/ 0,25/ 0,1/ 0,05 et 0,025 µg. Les échantillons protéiques sont préparés à partir d'une solution mère (1 mg/ml) puis dénaturés 5 min à 100°C en présence d'un tampon de charge (Laemmli *Biorad* v/v 2:1), complété avec du β-mercaptoéthanol. Puis, ils sont séparés par SDS-PAGE 12.5 % à l'aide du système MiniProtein 3 Cell (Biorad). Les protéines, utilisées pour l'optimisation de la concentration de trypsine, sont colorées au nitrate d'argent avec le kit *Silver Staining Protein* (Pharmacia Biosciences), et celles utilisées pour l'optimisation de la durée d'incubation sont colorées au bleu de Coomassie colloïdal (Biofluid, Biorad).

Digestion dans le gel et analyses MALDI-TOF

Les bandes d'intérêt sont découpées et les protéines incluses sont digérées dans le gel par la trypsine (Roche Diagnostics) selon la méthode décrite par Schevchenko *et al.*, 1996. Différentes durées d'incubation (de 30 min à 16 h) ont été testées sur les protéines colorées au bleu de Coomassie à différentes concentrations de trypsine sur les protéines colorées à l'argent. Après digestion, les extraits péptidiques sont dessalés par Zip Tip C18 (Millipore). L'échantillon est déposé sur la cible selon la méthode de la goutte séchée (v/v: 1 : 1) utilisant une solution saturée d'acide 2-5 dihydroxybenzoïque (DHB) en TFA 0,1%. Les cartes peptidiques sont obtenues à l'aide d'un spectromètre de masse MALDI-TOF Voyager DE-STR (Applied Biosystems, Framingham, MA), en mode réflexion positif avec une tension d'accélération de 20 000 V, une extraction retardée de 200 ns et environ 600 impulsions laser sont requises pour une acquisition spectrale. L'analyse et le triement des données sont effectués par le logiciel Data Explorer (Applied Biosystems). Tous les spectres obtenus sont échantillonnés, d'une part en externe (utilisation d'un standard contenant cinq peptides aux masses connues) puis d'autre part, en interne sur les produits d'autodigestion de la trypsine.

Recherche dans les banques de données

Les identifications des protéines ont été obtenues par comparaison des informations de masse à la banque de données protéiques SWISS-PROT, par l'intermédiaire du logiciel ProFound. Les recherches ont été conduites selon les paramètres suivants : taxonomie : *mammalia*, enzyme utilisée : trypsine, 1 *miccleavage* autorisé, modifications : carbamidométhylation (par l'iodoacétamide), oxydation des méthionines, masses monoisotopiques, type de charge : MH⁺, tolérance de masse : 0,1 Da ou 0,2 Da si la calibration interne n'a pas été effectuée.

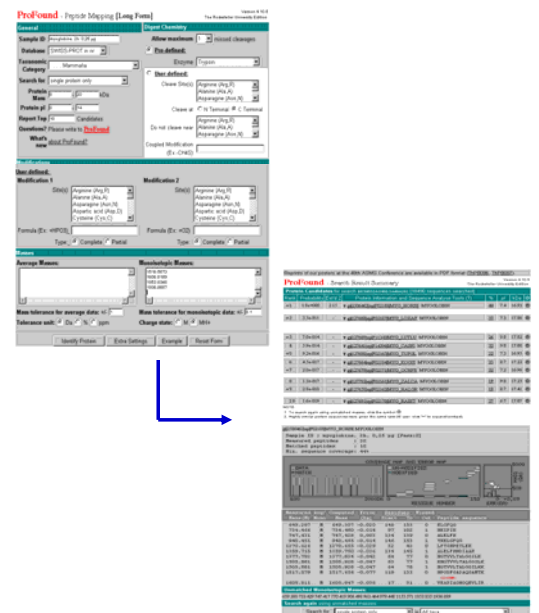


Figure 2 : Exemple d'identification de la myoglobine à 0,25 µg (digérée en 2h) par le logiciel ProFound

Résultats de l'optimisation de la durée d'incubation

Cinq protéines standards séparées par SDS-PAGE, ont été digérées pendant différents temps d'incubation (de 30 min à 16 h). Les résultats montrent qu'une digestion sur 2 h est suffisante pour obtenir une bonne identification de la protéine (% de couverture plus élevé ou équivalent à celui obtenu sur 16 h). L'identification est légèrement améliorée pour des durées d'incubation comprises entre 1 h et 2 h. Ce phénomène s'explique par le fait que les peptides s'adsorbent sur le plastique du tube ou se dégradent pendant la nuit, et la présence d'activité protéolytique non-spécifique provoque la formation de peptides aux masses non détectées et/ou non identifiées par le logiciel de recherche dans les banques.

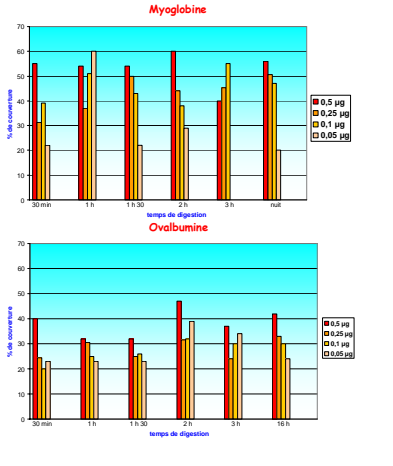


Figure 4 : Etude de l'influence du temps de digestion sur le pourcentage de couverture de séquence de cinq protéines différentes

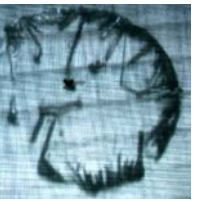


Figure 5 : Dépôt d'un produit de digestion en DHB par la méthode en goutte séchée

Réproductibilité de l'analyse en MALDI-TOF

Pour cela, on étudie la variation du pourcentage de recouvrement de la protéine en réalisant 3 dépôts en DHB d'un même produit de digestion pour les cinq protéines (à 0,25 µg). L'analyse semi-manuelle en MALDI et l'hétérogénéité des dépôts en DHB (concentration des protéines à la base des cristaux) provoque une variation du pourcentage de couverture. Ceci entraîne la nécessité de parcourir le spot avec le laser afin d'obtenir un meilleur signal. Cependant, il existe d'autres matrices qui forment des cristaux plus homogènes.

Conclusion et perspectives

Un protocole de digestion a été mis au point avec une protéolyse limitée à 2 heures. Ainsi, le temps total de manipulation est réduit à une journée, et l'identification de la protéine (colorée au bleu de Coomassie) est améliorée par augmentation du pourcentage de couverture de la séquence. Cependant, il faudrait vérifier que ce protocole de digestion est applicable à un mélange de protéines (exemple : spots issus de gels 2D).

L'autre partie de l'étude a mis en évidence qu'une concentration de trypsine de 6 ng/µl est suffisante pour l'identification de protéines faiblement colorées au nitrate d'argent. Ainsi, on limite les effets de désorption préférentielle de certains peptides, notamment les pics provenant de l'autolyse de la trypsine, et les peptides mineures apparaissent hors du bruit de fond et peuvent être ainsi identifiés. Par la suite, il sera intéressant de diminuer encore la concentration en trypsine afin d'optimiser l'identification des protéines ultramajoritaires.

Dans l'avenir, il faudra vérifier qu'une incubation en 2 h est suffisante pour l'identification de protéines minoritaires colorées au nitrate d'argent

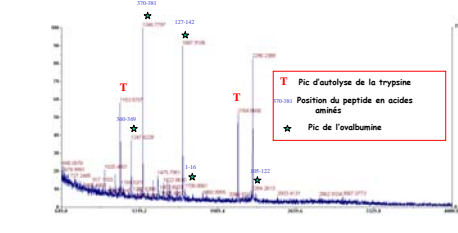
Il est nécessaire de réaliser des statistiques sur la variation du pourcentage de couverture en augmentant le nombre de dépôts en DHB d'un même produit de digestion. De plus, d'autres matrices permettant de réaliser des dépôts plus homogènes, tel que l'acide α-cyano-4-hydroxycinnamique, semblent plus adaptés pour l'automatisation.

Ces modifications de protocoles de digestion sont applicables à l'utilisation de robots afin de diminuer le temps de digestion et l'amélioration des identifications de protéines.

Résultats de l'optimisation de la concentration en trypsine

Dans le cadre de cette étude, deux protéines (sérum albumine bovine et ovalbumine) colorées à l'argent ont été digérées par la trypsine à différentes concentrations (6-8-10 et 12,5 ng/µl). La diminution de la quantité d'enzyme n'altère pas la qualité de l'identification de la protéine. De plus, les pics d'autolyse de la trypsine sont majoritaires dans les conditions standards de digestion (12,5 ng/µl) alors qu'ils sont absents des spectres de masse obtenus avec 6 ng/µl.

0,1 µg d'ovalbumine digérée avec 12,5 ng/µl de trypsine



0,1 µg d'ovalbumine digérée avec 6 ng/µl de trypsine

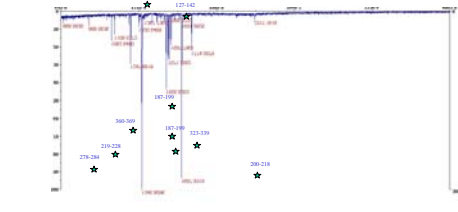


Figure 3 : Etude de l'influence de la concentration en trypsine sur la qualité des spectres de masse