

## Protocole Western-Blot (LDS/BCA)

### Etape 1 : Préparation des échantillons

#### **Important : toujours travailler dans la glace**

- Récupérer les cellules dans des falcons 15ml
- Centrifuger à 4°C, 5min à 1200rpm
- Aspirer le surnageant
- Laver dans 1ml de PBS froid, transférer les cellules dans un eppendorff 1,5ml
- Centrifuger à 4°C, 5min à 1200rpm
- Aspirer le surnageant. *A ce stade les échantillons peuvent être gardés à -20°C.*
- Ajouter le tampon de lyse : LDS Sample Buffer 1X (sans réducteur). 30-40µl de tampon pour 1ml de cellules dans les conditions initiales

*A ce stade les échantillons peuvent être gardés à -20°C ou soniqués.*

### Etape 2: Sonication des échantillons

- Faire 3-4 pulses de 5-10s, puissance 50-60 (à évaluer selon la viscosité).

Mettre 15 sec dans la glace entre chaque pulse. Nettoyer la sonde à l'éthanol entre chaque échantillon.

*A ce stade les échantillons peuvent être gardés à -20°C ou dosés.*

### Etape 3: Dosage des échantillons par la méthode du BCA

- 1- Préparation de la gamme (BSA)

A partir de la solution 2 mg/mL du kit faire la série de dilutions au ½ suivante :

µg/µL	2000	1000	500	250	125	75
H2O (µL)	0	100	100	100	100	100
Protéine (conc. précédente)	200 (stock)	100 (2000)	100 (1000)	100 (500)	100 (250)	100 (125)

- Dans une plaque 96 puits fond plat, déposer en duplicate ou triplicate :

Gamme :

- 10 µL de la concentration souhaitée

Echantillons :

- 2µl d'échantillon protéique
- 8µl d'eau milliQ
- 196µl de réactif A + 4µl de réactif B (préparer avant un mix et déposer 200µl par puits)

#### **Important : ne pas oublier des puits « blancs » avec :**

- 2µl de LDS Sample Buffer 1X
- 8µl d'eau milliQ
- 196µl de réactif A + 4µl de réactif B

Incuber à 37°C pendant 30min puis mesure de la DO à 570nm.

Note : Si on veut déposer une quantité déterminée de protéines : rajouter une gamme BSA.

Si on fait un simple produit en croix : ex :

	DO 1	DO 2	Moyenne DO	DO - blanc	Volume échantillon	Volume bleu 1X
Echantillon 1	0.385	0.387	0.386	0.225	10	5

Echantillon 2	0.310	0.312	0.311	0.150	15	0
Blanc	0.160	0.162	0.161	0		

#### **Etape 4: Dépôt des échantillons**

Préparation des échantillons, par puits:

- 15µl d'échantillon protéique
- 1,6µl de Sample Reducing Agent 10X

Faire bouillir les échantillons 3min à 95°C, puis centrifuger.

Préparation des tampons de migration :

- MES : séparation des petites protéines (taille inf à 50kDa)
- MOPS : séparation des grosses protéines (taille sup à 50kDa)

Préparer 400ml de tampon de migration par cuve soit : 20ml de tampon MES ou MOPS 20X puis qsp 400ml d'eau milliQ.

Déposer 2,5µl de marqueur de poids moléculaire et 15µl d'échantillon. (Perte d'environ 1-1.5µl après avoir bouilli les échantillons).

Note : S'il reste un dernier puits vide, on peut rajouter 1-2µl d'un échantillon quelconque : cela permet une meilleure migration du dernier échantillon du gel.

Rajouter au milieu de la cuve, entre les deux gels, 500µl d'antioxydant.

#### **Etape 5: Migration**

Mettre en voltage constant, 160V, 60-80min selon les protéines

#### **Etape 6: Transfert**

Tampon de transfert 1L par cuve (2 gels):

- 100ml de TG 10X
- 200ml d'éthanol absolu
- Qsp 1L eau milliQ

Montage transfert (dans l'ordre):

- Mettre vers soi le « côté noir » de la cassette de transfert, puis ajouter côté noir dans l'ordre :
- Eponge de transfert (noire)
- 2 papiers whatman (taille 9cm x 7cm)
- Gel
- Membrane de nitrocellulose (taille 8cm x 6cm)
- 2 papiers whatman (taille 9cm x 7cm)
- Eponge de transfert (noire)
- Refermer la cassette

**Bien enlever les bulles lors du montage !**

(Ne pas oublier d'ajouter un pain de glace dans la cuve)

**Note : Attention au sens et respecter le code couleur ! les protéines migrent du pôle moins (noir) vers le pôle plus (rouge) !**

Transfert : 60 min (protéines taille inf à 100kDa) ou 70 min (protéines sup à 100kDa), 100V, voltage constant

#### **Etape 7: Saturation de la membrane**

Avant cette étape on peut vérifier le bon transfert des protéines en faisant une coloration au rouge ponceau.

Après le transfert, faire 2 lavages rapides avec du TBST.

Saturation : 1h à RT avec agitation, dans du TBST (TBS 0.1% Tween-20) 5% BSA (ou 5% lait), 5ml par boîte (on peut mettre 2-3 membranes par boîte)

Note : La majorité des anticorps peuvent être utilisés en lait ou BSA avec des résultats équivalents. Pour les anticorps totaux, le lait permet souvent de réduire le signal non spécifique. Pour les anticorps anti-phospho, toujours utiliser de la BSA : le lait contient des phosphatases.

#### **Etape 8: Incubation avec l'anticorps primaire**

Incuber sur la nuit, à 4°C avec agitation, dans 5ml de TBST 5% BSA (ou lait) par boîte. Par défaut, mettre l'anticorps primaire au 1/1000<sup>ème</sup> (ajuster par la suite selon le résultat).

Faire 3 lavages de 5min avec du TBST.

#### **Etape 9: Incubation avec l'anticorps secondaire**

Incuber 45min, à RT avec agitation, dans 5ml de TBST 5% BSA (ou lait) par boîte. Par défaut, mettre l'anticorps secondaire au 1/5000<sup>ème</sup>.

Faire 3 lavages de 10min avec du TBST.

#### **Etape 10 : Incubation avec le révélateur**

Préparer le révélateur ECL (West-Pico) : 2ml par gel (ou membrane). Pour cela mélanger 1ml de buffer A avec 1ml de buffer B. Attention : bien changer de cône de pipette en prélevant pour ne pas mélanger les buffers entre eux !

Recouvrir les membranes à révéler 5min avec l'ECL.

A la fin des 5min, éponger rapidement la membrane avec du papier absorbant, puis la glisser entre deux feuilles plastiques transparentes.

#### **Etape 11 : Révélation avec l'imageur PXi**

Révéler en mode « série », choisir 16 images espacées de 15s permet de révéler correctement la majorité des western-blot. Toujours vérifier que « add content to previous image » est bien coché.

Choisir de révéler en binning 2x2 : ceci permet de diminuer d'un facteur 4 la taille des images avec une perte de qualité invisible à l'œil, et qui est celle demandée par les journaux scientifiques. De plus, cela permet d'avoir une intensité de signal 4X supérieure par rapport à l'option « no binning » et donc de révéler plus facilement les signaux faibles.