

Rapport d'expériences

13 juillet 2004

Série 5

Lame 217b-03 – Différentes concentrations de glycérol - stade aldéhyde - incubation de peptides prérévélés en tampon EIA3.

Malgré l'immobilisation en chambre humide, les spots de la ligne sans glycérol se sont probablement évaporés, dénaturant ainsi les anticorps et empêchant la reconnaissance peptide / anticorps lors de l'incubation avec les cibles. On constate également qu'un pourcentage de 2% de glycérol est suffisant pour obtenir des spots de forme régulière.

La présence de marques autour des spots est certainement due au fait que les cibles ont été préparées en tampon EIA3.

		médiane spots	SD interspots	CV interspot (%)	méd. spots normalisée / bruit fond
Anticorps mAbSP31 1 μ M sans glycérol		929,5	266,0	28,6	1,05
Anticorps mAbSP31 1 μ M, 2% glycérol		14876,5	636,9	4,3	18,42
Anticorps mAbSP31 1 μ M, 4% glycérol		13336,5	778,3	5,8	17,06
Anticorps mAbSP31 1 μ M, 6% glycérol		12521,0	1185,0	9,5	15,91
Anticorps mAbSP31 1 μ M, 8% glycérol		14327,0	209,4	1,5	16,70
Anticorps mAbSP31 1 μ M, 10% glycérol		12998,5	827,7	6,4	14,87
Anticorps I12-73 1 μ M, 10% glycérol		1564,5	120,7	7,7	1,83

Figure 1 – Lame 217b-03 – Différentes concentrations de glycérol – sondes : anticorps mAbSP31, témoin : I12-73 – lame au stade aldéhyde incubée avec des peptides prérévélés (LMN1-biot-strep-Cy3) à 500nM en tampon EIA3, pendant 2h à 37°C.

Série 6

Lame 217b-06 – Essai de différents réducteurs : sans NaBH_4 - stade aldéhyde - incubation de peptides prérévélés en tampon EIA3.

Cette lame sert de témoin, puisque dans le protocole utilisé habituellement, la lame ne subit pas de bain de NaBH_4 . On a toujours les traces autour des spots, dues au tampon EIA3. On observe que l'on a bien la reconnaissance antigène / anticorps sur les deux lignes d'anticorps non biotinylé (mAbSP31).

	médiane spots	SD interspots	CV interspot (%)	méd. spots normalisée / bruit fond
Anticorps mAbSP31 1 μM avec NaCNBH_3 + 10% glycérol	15094,5	1099,2	7,3	7,33
Anticorps mAbSP31 1 μM sans NaCNBH_3 + 10% glycérol	20654,5	4650,7	22,5	11,73
Anticorps mAbSP31- biot 0,8 μM avec NaCNBH_3 + 10% glycérol	40262,0	2767,2	6,9	5,47
Anticorps mAbSP31- biot 0,8 μM sans NaCNBH_3 + 10% glycérol	49098,5	1352,0	2,8	7,88
Anticorps II2-73 1 μM avec NaCNBH_3 + 10% glycérol	2679,5	78,4	2,9	1,43
Anticorps II2-73 1 μM sans NaCNBH_3 + 10% glycérol	1044,0	123,5	11,8	0,90
Peptide LMN1-biot 1 μM avec NaCNBH_3 + 10% glycérol	16855,5	650,1	3,9	9,55
Peptide LMN1-biot 1 μM sans NaCNBH_3 + 10% glycérol	3484,5	281,2	8,1	1,92

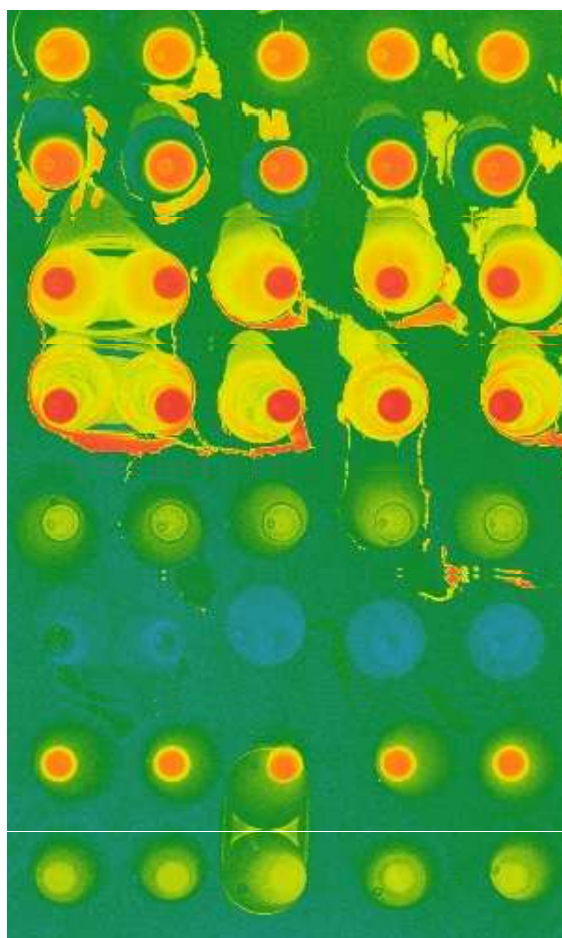


Figure 2 – Lame 217b-06 – Essai de différents réducteurs : lame non traitée au NaBH_4 – sondes : anticorps mAbSP31, témoin : II2-73 – lame au stade aldéhyde incubée avec des peptides prérévélés (LMN1-biot-strep-Cy3) à 500nM en tampon EIA3, pendant 2h à 37°C.

Lame 217b-07 – Essai de différents réducteurs : avec NaBH_4 - stade aldéhyde - incubation de peptides prérévélés en tampon EIA3.

Cette lame a subi un bain de NaBH_4 pendant 1h en boîte de Pétri, sans agitation, à RT, après l'immobilisation. On observe un **bruit de fond très important**. De plus, **on ne peut pas considérer que l'on a une reconnaissance peptide / anticorps**, puisque les lignes 1 et 2 (mAbSP31) sont d'un niveau inférieur aux spots de l'anticorps témoin Il2-73.

On constate que les spots positifs sont ceux correspondants aux substances biotinylées. On peut par suite émettre l'hypothèse que **le NaBH_4 endommage les anticorps en détériorant leurs sites de reconnaissance**, mais que les biotines peuvent encore accrocher la streptavidine liée au fluorophore.

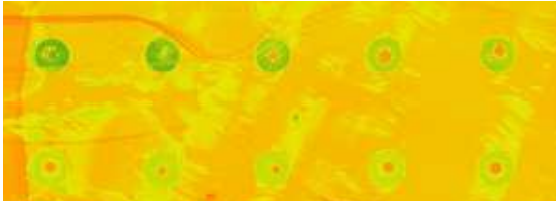


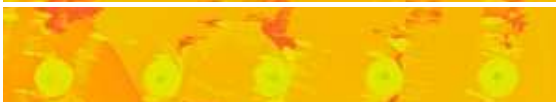



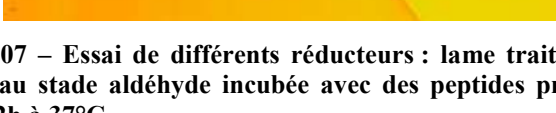
		médiane spots	SD interspots	CV interspot (%)	méd. spots normalisée / bruit fond
Anticorps mAbSP31 1 μM avec NaCNBH_3 + 10% glycérol		10142,0	3023,4	29,8	1,83
Anticorps mAbSP31 1 μM sans NaCNBH_3 + 10% glycérol		8299,5	834,4	10,1	1,30
Anticorps mAbSP31- biot 0,8 μM avec NaCNBH_3 + 10% glycérol		53314,0	425,7	0,8	9,34
Anticorps mAbSP31- biot 0,8 μM sans NaCNBH_3 + 10% glycérol		54533,0	746,7	1,4	6,54
Anticorps Il2-73 1 μM avec NaCNBH_3 + 10% glycérol		16172,5	1194,3	7,4	3,03
Anticorps Il2-73 1 μM sans NaCNBH_3 + 10% glycérol		11914,0	477,2	4,0	2,18
Peptide LMN1-biot 1 μM avec NaCNBH_3 + 10% glycérol		28248,5	370,8	1,3	4,91
Peptide LMN1-biot 1 μM sans NaCNBH_3 + 10% glycérol		12535,0	489,7	3,9	2,17

Figure 3 – Lame 217b-07 – Essai de différents réducteurs : lame traitée au NaBH_4 – sondes : anticorps mAbSP31, témoin : Il2-73 – lame au stade aldéhyde incubée avec des peptides prérévélés (LMN1-biot-strep-Cy3) à 500nM en tampon EIA3, pendant 2h à 37°C.

Lame 217b-08 – Essai de différents réducteurs : avec NaBH_4 - stade aldéhyde - incubation de peptides marqués à la TMR en tampon EIA3.

Cette lame a subi le même traitement que la lame précédente (bain de NaBH_4) pendant 1h en boîte de Pétri, sans agitation, à RT, après l'immobilisation. Pourtant, on observe un **bruit de fond peu important**, contraire à nos observations précédentes, alors que **la reconnaissance antigène / anticorps a eu lieu**, principalement sur les **spots d'anticorps non biotinylés**. Ces résultats sont intrigants.



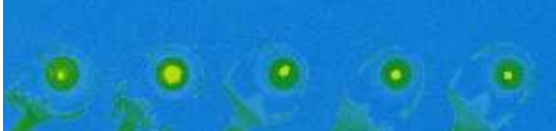
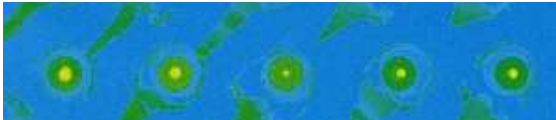




		médiane spots	SD interspots	CV interspot (%)	méd. spots normalisée / bruit fond
Anticorps mAbSP31 1 μM avec NaCNBH_3 + 10% glycérol		2227,0	2599,8	116,7	4,62
Anticorps mAbSP31 1 μM sans NaCNBH_3 + 10% glycérol		1837,5	1211,9	66,0	3,81
Anticorps mAbSP31-biot 0,8 μM avec NaCNBH_3 + 10% glycérol		1813,5	376,1	20,7	3,43
Anticorps mAbSP31-biot 0,8 μM sans NaCNBH_3 + 10% glycérol		1804,0	339,5	18,8	3,20
Anticorps II2-73 1 μM avec NaCNBH_3 + 10% glycérol		582,5	30,5	5,2	1,18
Anticorps II2-73 1 μM sans NaCNBH_3 + 10% glycérol		524,0	34,6	6,6	1,08
Peptide LMN1-biot 1 μM avec NaCNBH_3 + 10% glycérol		857,5	90,4	10,5	1,81
Peptide LMN1-biot 1 μM sans NaCNBH_3 + 10% glycérol		532,0	45,3	8,5	1,15

Figure 4 – Lame 217b-08 – Essai de différents réducteurs : lame traitée au NaBH_4 – sondes : anticorps mAbSP31, témoin : II2-73 – lame au stade aldéhyde incubée avec des peptides TMR (LMN1-biot-TMR) à 500nM en tampon EIA3, pendant 2h à 37°C.

Série 7 (Isabelle)

Lame 217b-11 – Influence de la température d'immobilisation (4°C) - stade aldéhyde - incubation de peptides marqués à la TMR en tampon EIA.

Cette lame sert de témoin. Les sondes ont été immobilisées à 4°C en chambre humide pendant une nuit. **Les spots sont homogènes et les traces ont disparu** (utilisation de tampon EIA au lieu de EIA3 pour les cibles). Le niveau du bruit de fond est acceptable. Le pourcentage de glycérol (2%) est suffisant.

La ligne n°3 (solution d'anticorps mAbSP31 préparée pour une séance de spotting le 07/06/04 et conservée depuis à 4°C) permet de se rendre compte que **les anticorps ne se sont pas conservés** dans cette solution, ou bien que les sites de reconnaissance ont été détériorés.

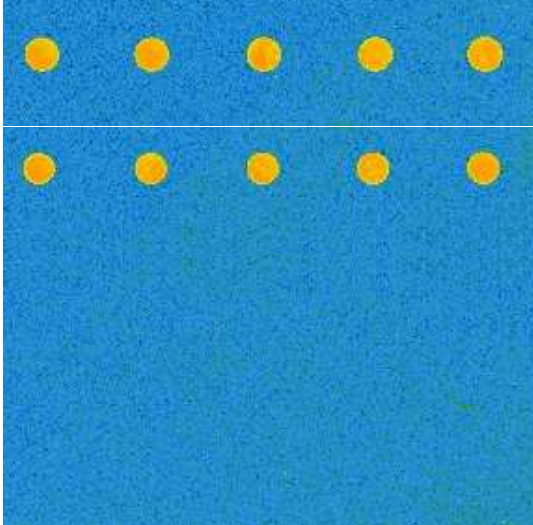
		médiane spots	SD interspots	CV interspot (%)	méd. spots normalisée / bruit fond
Anticorps mAbSP31 1 µM + 2% glycérol		11767,0	700,3	6,0	13,85
Anticorps mAbSP31 1 µM + 2% glycérol		14051,5	863,8	6,1	17,18
Anticorps mAbSP31 1 µM + 10% glycérol (solution du 07/06/04)		884,5	110,2	12,5	1,02
Anticorps Il2-73 1 µM + 2% glycérol		887,5	132,8	15,0	1,03

Figure 5 – Lame 217b-11 – Différentes concentrations de cibles – Influence de la température d'immobilisation (4°C) – sondes : anticorps mAbSP31, témoin : Il2-73 – lame au stade aldéhyde incubée avec des peptides pré-révélés TMR (LMN1-biot-TMR) à 20nM en tampon EIA, pendant 2h à 37°C.

Lame 217b-12 – Influence de la température d'immobilisation (RT) - stade aldéhyde - incubation de peptides marqués à la TMR en tampon EIA.

Les sondes ont été immobilisées à RT en chambre humide pendant une nuit. On observe que l'intensité des spots est légèrement inférieure à celle observée pour les sondes immobilisées à 4°C.

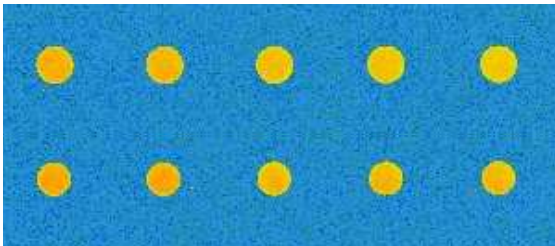
		médiane spots	SD interspots	CV interspot (%)	méd. spots normalisée / bruit fond
Anticorps mAbSP31 1 μ M + 2% glycérol		8326,5	885,1	10,6	12,34
Anticorps mAbSP31 1 μ M + 2% glycérol		9694,0	578,0	6,0	14,27

Figure 6 – Lame 217b-11 – Différentes concentrations de cibles – Influence de la température d'immobilisation (RT) – sondes : anticorps mAbSP31 – lame au stade aldéhyde incubée avec des peptides pré-révélés TMR (LMN1-biot-TMR) à 20nM en tampon EIA, pendant 2h à 37°C.