

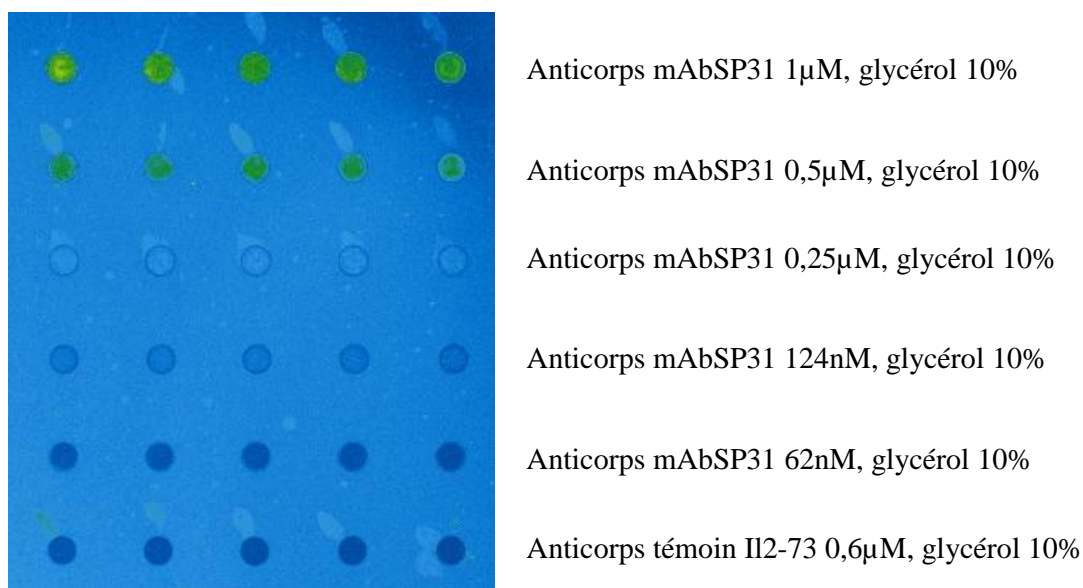
## Rapport d'expériences

*Semaine du 21 au 25 Juin 2004*

### Série 2

#### Lame 207-8 – Différentes concentrations de sondes ; incubation de peptides biotinylés marqués à la TMR.

Le séchage à la soufflette permis de conserver la structure des anticorps, puisqu'on peut observer la fixation de peptides sur certains spots (**Fig. 1**) Cependant, ce séchage n'a pas été suffisant, et une quantité importante de tampon est restée sur la lame, entraînant le glissement progressif de la lamelle utilisée durant l'incubation, et la dilution de la solution d'incubation. On constate toutefois une décroissance de la fluorescence avec la concentration de sondes.

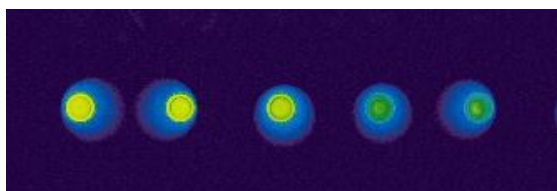


**Figure 1 - Lame 207-8 - Différentes concentrations de sondes (anticorps mAbSP31) incubées avec des peptides biotinylés et marqués à la TMR (LMN1-biot-TMR) à 500nM, pendant 2h à 37°C.**

## Série 3

### Lame 216-01 – Greffage de peptides marqués à la TMR

Le greffage a fonctionné, on observe des spots dont la fluorescence est caractéristique (**Fig. 2**). Le bruit de fond est remarquablement bas. Cependant, un halo entoure les spots, provenant probablement du tampon EIA3.



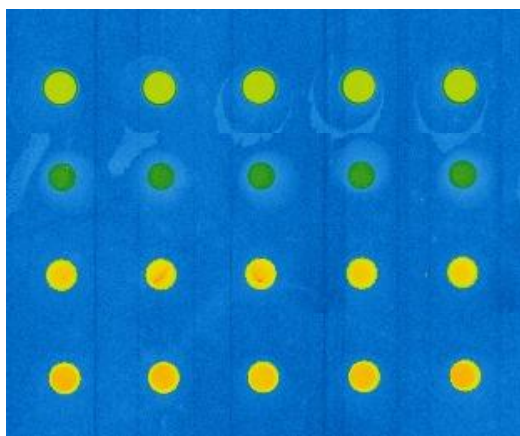
Peptide biotinylé marqué à la TMR 1 $\mu$ M, glycérol 10%

Figure 2 - Lame 216-01 – Greffage de peptides biotinylés et marqués à la TMR.

### Lame 216-02 – Greffage de complexes immuns

La **Fig. 3** Les complexes immuns peuvent se fixer une fois la reconnaissance peptide / anticorps effectuée, ce qui indique que le site d'accroche et le site de reconnaissance ne sont pas trop proches.

Les spots sont nets et sans traces de glissement, alors que le lavage et la saturation ont été faits en tampon EIA3. C'est probablement le lavage final en tampon phosphate de potassium qui a permis d'obtenir cette propreté, car on observe des traces de marques qui ont été nettoyées.



Complexes immuns (mAbSP31 à 1 $\mu$ M), glycérol 10%

Peptide LMN1-biot-TMR 1 $\mu$ M, glycérol 10%

Peptide LMN1-biot 1 $\mu$ M, glycérol 10%

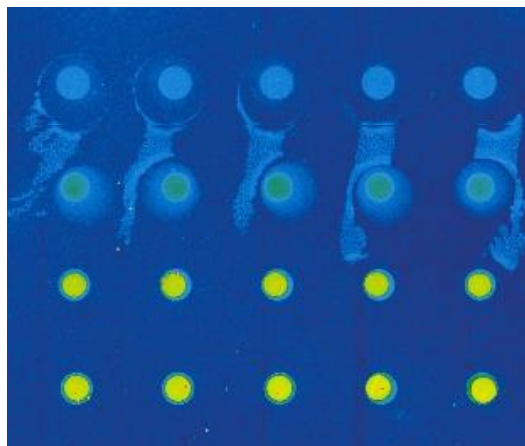
Peptide LMN1-biot 1 $\mu$ M, glycérol 10%

Figure 3 - Lame 216-02 – Révélation à la streptavidine-Cy3, pendant 2h à 37°C.

### Lame 216-03 – Greffage de peptides – Incubation d'anticorps prérévéls

Les deux rangées de peptides montrent une fluorescence caractéristique, qui indique la fixation des anticorps prérévéls à la Cy-3 (**Fig. 4**). **Cependant, rien ne permet de dire que c'est par la reconnaissance antigène / anticorps que cette fixation a eu lieu. Elle peut aussi bien avoir eu lieu par la reconnaissance streptavidine / biotine.**

La forme des spots amène aux mêmes commentaires que pour la lame 216-02.



Complexes immuns (mAbSP31 à 1 $\mu$ M), glycérol 10%

Peptide LMN1-biot-TMR 1 $\mu$ M, glycérol 10%

Peptide LMN1-biot 1 $\mu$ M, glycérol 10%

Peptide LMN1-biot 1 $\mu$ M, glycérol 10%

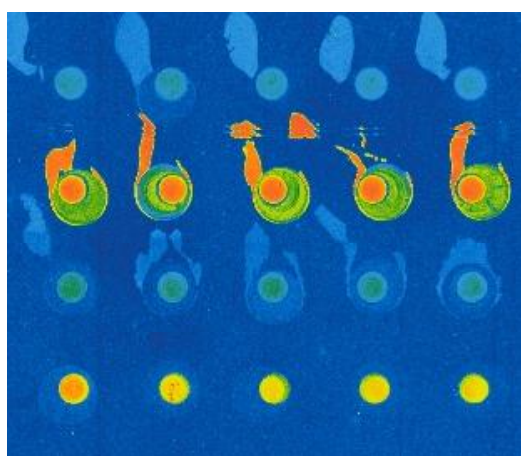
**Figure 4 - Lame 216-03 – Spots de peptides incubés avec des anticorps biotinylés et prérévélés à la streptavidine-Cy3, pendant 2h à 37°C.**

## Série 4

### Lame 216-06 – Greffage au stade aldéhyde ; incubation de substances prérévélées

On observe de grosses traînées autour des spots (**Fig. 4**). La rangée de peptides montre une fluorescence caractéristique de la fixation des anticorps prérévélés. Cependant, la fixation a peut-être eu lieu via la reconnaissance streptavidine / biotine.

La fluorescence de la rangée de spots d'anticorps non biotinylés (Fig 5) incubés avec des peptides prérévélés est **l'unique cas dans lequel on est certain que la fixation a eu lieu par la reconnaissance peptide / anticorps**. Le témoin est clairement négatif.



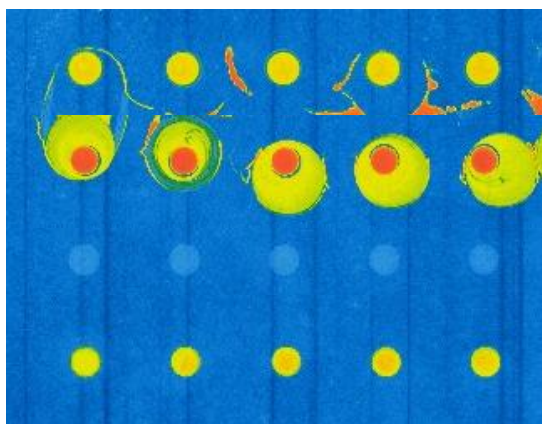
Anticorps mAbSP31 1 $\mu$ M, glycérol 10%

Anticorps mAbSP31-biot 0,8 $\mu$ M, glycérol 10%

Anticorps témoin Il2-73 1 $\mu$ M, glycérol 10%

Peptide LMN1-biot 1 $\mu$ M, glycérol 10%

**Figure 4 - Lame 216-06 – Spots d'anticorps et de peptides sur aldéhyde, incubés avec des anticorps biotinylés (mAbSP31-biot) et prérévélés à la streptavidine-Cy3, pendant 2h à 37°C.**



Anticorps mAbSP31 1 $\mu$ M, glycérol 10%

Anticorps mAbSP31-biot 0,8 $\mu$ M, glycérol 10%

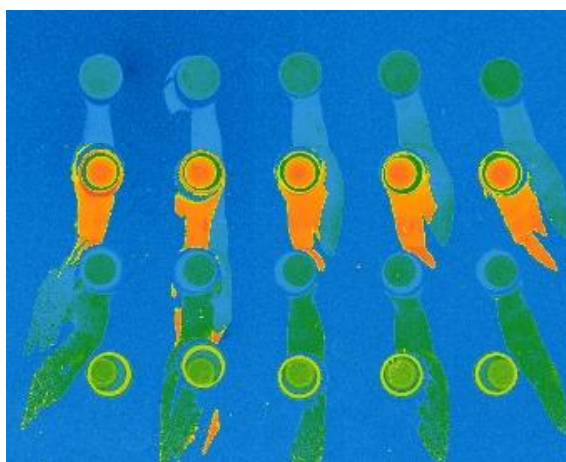
Anticorps témoin Il2-73 1 $\mu$ M, glycérol 10%

Peptide LMN1-biot 1 $\mu$ M, glycérol 10%

**Figure 5 - Lame 216-06 – Spots d’anticorps et de peptides sur aldéhyde, incubés avec des peptides biotinylés (LMN1-biot) et prérévélés à la streptavidine-Cy3, pendant 2h à 37°C.**

### **Lame 216-07 – Greffage au stade diol ; incubation de substances prérévélées**

Les observations sont identiques à celles effectuées pour la lame 216-06 (traitements identiques, surface différente). Les spots ont un diamètre plus important sur la surface diol. Les traînées semblent plus importantes. **On a bien la reconnaissance antigène / anticorps sur le deuxième bloc.**



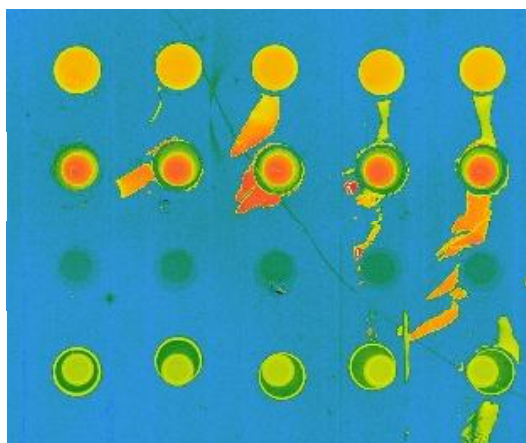
Anticorps mAbSP31 1 $\mu$ M, glycérol 10%

Anticorps mAbSP31-biot 0,8 $\mu$ M, glycérol 10%

Anticorps témoin Il2-73 1 $\mu$ M, glycérol 10%

Peptide LMN1-biot 1 $\mu$ M, glycérol 10%

**Figure 6 - Lame 216-07 – Spots d’anticorps et de peptides sur diol, incubés avec des anticorps biotinylés (mAbSP31-biot) et prérévélés à la streptavidine-Cy3, pendant 2h à 37°C.**



Anticorps mAbSP31 1 $\mu$ M, glycérol 10%

Anticorps mAbSP31-biot 0,8 $\mu$ M, glycérol 10%

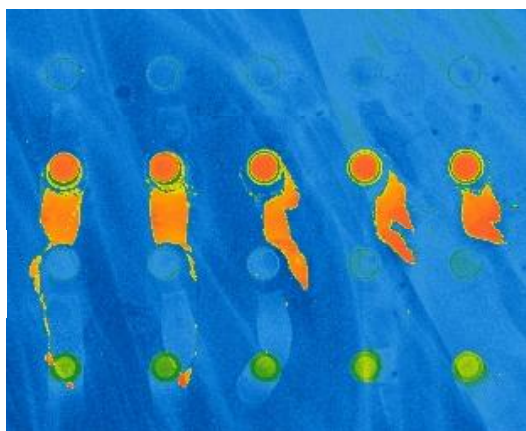
Anticorps témoin Il2-73 1 $\mu$ M, glycérol 10%

Peptide LMN1-biot 1 $\mu$ M, glycérol 10%

**Figure 7 - Lame 216-07 – Spots d'anticorps et de peptides sur diol, incubés avec des peptides biotinylés (LMN1-biot) et prérévélés à la streptavidine-Cy3, pendant 2h à 37°C.**

### **Lame 216-31 – Greffage au stade époxyde ; incubation de substances prérévélées**

Les observations sont identiques à celles effectuées pour la lame 216-06 (traitements identiques, surface différente). Les spots négatifs sont davantage noyés dans le bruit de fond. Il y a toujours d'importantes traînées. **On a bien la reconnaissance antigène / anticorps sur le deuxième bloc.**



Anticorps mAbSP31 1 $\mu$ M, glycérol 10%

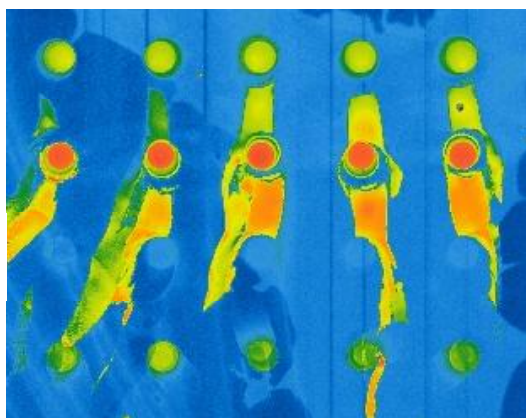
Anticorps mAbSP31-biot 0,8 $\mu$ M, glycérol 10%

Anticorps témoin Il2-73 1 $\mu$ M, glycérol 10%

Peptide LMN1-biot 1 $\mu$ M, glycérol 10%

**Figure 8 - Lame 216-07 – Spots d'anticorps et de peptides sur époxyde, incubés avec des anticorps biotinylés (mAbSP31-biot) et prérévélés à la streptavidine-Cy3, pendant 2h à 37°C.**





Anticorps mAbSP31 1 $\mu$ M, glycérol 10%

Anticorps mAbSP31-biot 0,8 $\mu$ M, glycérol 10%

Anticorps témoin Il2-73 1 $\mu$ M, glycérol 10%

Peptide LMN1-biot 1 $\mu$ M, glycérol 10%

**Figure 9 -** Lame 216-07 – Spots d’anticorps et de peptides sur époxyde, incubés avec des peptides biotinylés (LMN1-biot) et prérévéls à la streptavidine-Cy3, pendant 2h à 37°C.

## **Conclusions**

On a maintenant la reconnaissance peptide / anticorps. Cependant, dans plusieurs cas, le signal obtenu peut provenir d’une reconnaissance streptavidine / biotine. Il est donc nécessaire d’utiliser des substances non biotinylées et / ou marquées avec d’autres substances (ex : Alexa 532).