

Partie 1: Immunoprécipitation



Protocole

1. Préparation des tubes

1.1 Dilution de la solution mère d'anticorps

- 1.1.1 Prélever 100 μ L de la solution mère d'anticorps contenue dans le tube jaune (AB) et le mettre dans le tube rouge.
- 1.1.2 Prélever ensuite 900 μ L de la solution de NaCl et l'introduire dans le tube rouge. (Solution AB étudiée).
- 1.1.3 Mélanger la solution AB étudiée en aspirant et refoulant la solution plusieurs fois.

1.2 Dilution de la solution mère d'antigène

- 1.2.1 Prélever 40 μ L de la solution du tube violet (solution mère AG) dans le tube bleu.
- 1.2.2 Prélever ensuite 960 μ L de solution de NaCl et le mettre dans le tube bleu (solution AG étudiée).
- 1.2.3 Mélanger la solution d'AG étudiée en aspirant et refoulant la solution plusieurs fois.

Arrêtez-vous à la première butée de la pipette autrement des bulles d'air pourraient se former.

2. Préparation de la série de dilutions

- 2.1 Mettre dans chaque cupule (1 à 7) 100 μ L de solution de NaCl
- 2.2 Prélever 200 μ L de solution d'antigène contenue dans le tube bleu et l'introduire dans la cupule 8.
- 2.3 Prélever 100 μ L de la solution d'antigène de la cupule 8 et la mettre dans la cupule 7.
- 2.4 Mélanger le contenu de la cupule 7 en aspirant et refoulant plusieurs fois.
- 2.5 Prélever 100 μ L de la solution d'antigène de la cupule 7 et la mettre dans la cupule 6.
- 2.6 Mélanger le contenu de la cupule 6 en aspirant et refoulant la solution plusieurs fois. Procéder de la même façon jusqu'à la cupule 1.
- 2.7 Enlever 100 μ L de la cupule 1.



- 2.8 Mettre dans chaque cupule 100 μ L de solution d'anticorps (AB) contenue dans le tube rouge.
- 2.9 Incuber 5 minutes à température ambiante.

Quelle est maintenant la concentration d'antigène dans chaque cupule ?

Partie 2: Analyse des anticorps

Protocole

1. Préparation des échantillons pour le gel de polyacrylamide d'électrophorèse (SDS-PAGE)

Préparer les tubes selon le mode opératoire suivant.

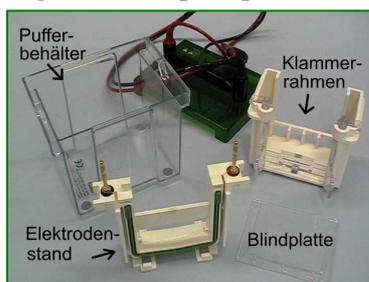
Tube	LÄ (µl)	H ₂ O (µl)	AB/AG (µl)	AB (µl)	AG (µl)	DTT (µl)	Heat block (95°C for 5 min.)
1	25	15	10	-	-	-	-
2	25	15	10	-	-	-	+
3	25	5	10	-	-	10	+
4	25	15	-	10	-	-	-
5	25	15	-	10	-	-	+
6	25	5	-	10	-	10	+
7	25	15	-	-	10	-	-
8	25	15	-	-	10	-	+
9	25	5	-	-	10	10	+

2. Préparation des plaques de gel

- Ouvrir l'emballage du gel PAGE en coupant le long de la ligne noire et prendre la plaque de gel.
- Couper avec un scalpel (ou avec une lame de rasoir) la bande de la plaque de gel le long de la ligne marquée et retirer la bande inférieure.

3. Préparation de la cuve d'électrophorèse

- Mettre la plaque de gel avec la plus petite plaque de verre dans le compartiment intérieur.
- Placer le compartiment intérieur dans la structure d'attache puis fermer les attaches.
- Placer la structure d'attache avec le compartiment intérieur dans la cuve tampon.



4. Remplissage de la cuve avec du tampon

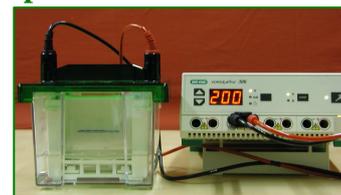
- Remplir le compartiment intérieur avec le tampon TGS jusqu'au bord.
- Remplir le compartiment extérieur avec 800 mL de tampon TGS.
- Retirer le peigne.

5. Remplissage des puits de gel

- Remplir les puits du gel:
- 20 µl à partir des tubes 1-9.
 - 5 µl marqueurs protéiques Kaléidoscope(KS)

6. Exécution de l'électrophorèse

- Fermer la cuve et commencer l'électrophorèse à **150V**.
- Arrêter l'électrophorèse quand la coloration atteint l'extrémité la plus basse du gel.



7. Démoulage du gel

- Retirer la structure d'attache et remettre le tampon dans le récipient du tampon. (**Le tampon est à nouveau utilisable !**)
- Retirer le gel.

8. Coloration des protéines

- Ouvrir les plaques de verre et mettre le gel dans le bac de coloration.
- Avant la coloration du gel le plonger dans l'eau pendant 2 minutes puis le retirer.
- Le colorer en ajoutant 100 mL de Bleu de Coomassie pendant 30 minutes au maximum.
- Remettre le Bleu de Coomassie dans la bouteille de stockage et ajouter 100 mL d'eau tiède.
- Mettre le gel dans l'agitateur.

9. Analyse

- Tracer la droite d'étalonnage à l'aide des marqueurs protéiques Kaléidoscope.
- Déterminer la masse moléculaire correspondant aux bandes de chaque ligne.

Tableau: Masse moléculaire des marqueurs protéiques Kaléidoscope

Myosine	Bleu	200 kDa	
β-galactosidase	Magenta	133 kDa	
Albumine bovine	Vert	83 kDa	
Anhydrase carbonique	Violet	39 kDa	
Inhibiteur trypsique de graine de soja	Orange	31 kDa	
Lysozyme	Rouge	17 kDa	
Aprotinine	Bleu	7 kDa	