

## La plateforme "Protéines recombinantes" est un service technique du site Broussais dédié à la purification des protéines recombinantes par chromatographie.

Cette plateforme émergente a vocation à s'inscrire dans un continuum technologique allant de la production de protéines recombinantes en bactéries (*E. coli*) jusqu'à leur caractérisation biochimique et/ou fonctionnelle (tests de luminescence, fluorescence, cellulaires, etc). Dans cette optique, des équipements non inclus dans la plateforme *stricto sensu* seront accessibles aux utilisateurs selon les besoins (voir ci-dessous).

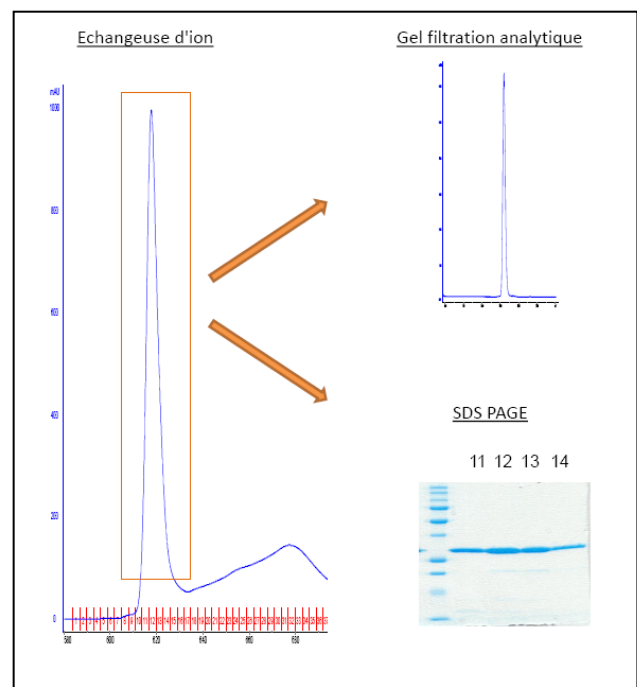
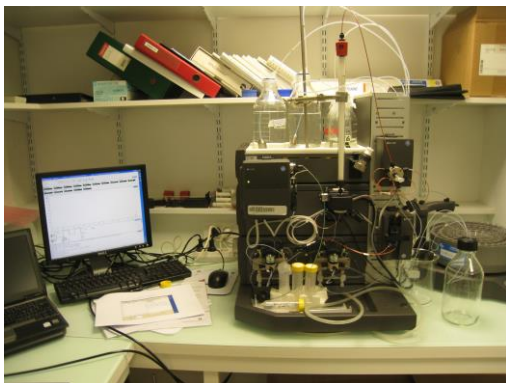
### Equipements et localisation

La plateforme Protéines recombinantes est située au 1<sup>er</sup> sous-sol du bâtiment Leriche à Broussais (L-RB-116, climatisée). Les consommables (ex: colonnes jetables, tampons, boudins à dialyse,...) sont à charge des utilisateurs ; la maintenance des appareils est pour l'instant assurée par la mutualisation de l'INEM.

Les équipements sont les suivants :

- Un système **AKTA-FPLC Purifier** (système de chromatographie à haute pression), équipé de colonnes préparatives (échange d'ions, affinité type "His6") et semi-préparatives/analytiques (tamis), jetables ou non.

En marge de la purification de protéines recombinantes, les équipements de chromatographie peuvent aussi être utilisés pour fractionner des échantillons biologiques (serum, lysat tissulaire, milieux conditionnés de culture, etc).



- Une **Presse de French**, appareil qui permet de lyser les bactéries à haute pression (~1.000 psi).

Cette étape libère une fraction soluble et une fraction insoluble. Les protéines recombinantes sur-exprimées en *E. coli* se retrouvent très souvent dans la partie insoluble (corps d'inclusion), ce qui facilite les étapes de purification ultérieures mais nécessite un protocole adapté de solubilisation/renaturation.



- Un **lyophilisateur** pour une conservation à long terme des protéines purifiées.

La lyophilisation des échantillons facilite aussi les envois de matériel biologique à des collaborateurs car la plupart des protéines lyophilisées sont stables à température ambiante (donc pas d'envoi sur carboglace, risque de délais de douanes etc).



- Un lecteur Enspire Alpha pour la technologie **AlphaScreen**<sup>®</sup> (Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay) pour la réalisation de divers tests fonctionnels.

<http://www.perkinelmer.com/Catalog/Category/ID/AlphaTech>



**En complément de ces équipements de Plateforme, des équipements appartenant aux équipes sont rendus accessibles aux utilisateurs de la plateforme selon leurs besoins :**

- Un système de **dialyse continue** (réservoir de 80 litres) pour la renaturation des protéines produites sous forme insoluble (corps d'inclusion).

Localisation : Labo V. Goffin , L-319 (4°C)



- Un système de chromatographie **Gradifrac** (système à pression ambiante) essentiellement utilisé pour les tamis moléculaires préparatifs.

Localisation : Labo V. Goffin , L-319 (4°C)

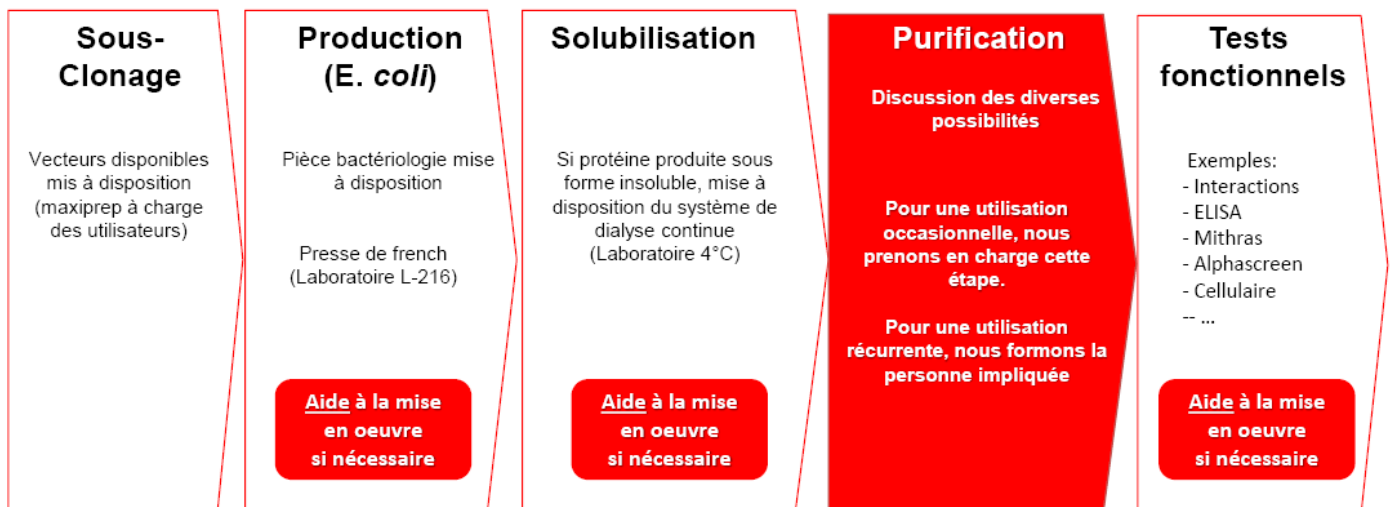


- Un lecteur multi-plaques Mithras LB 940 (luminescence, FRET/BRET, Absorbance...).  
[www.berthold.com/en/bio/multimode\\_microplate\\_reader\\_mithras\\_LB940](http://www.berthold.com/en/bio/multimode_microplate_reader_mithras_LB940)

Localisation : Labo V. Goffin (L-216)



## Résumé des **prestations offertes par la plateforme** dans le continuum technologique



## Procédures

Toute personne intéressée à l'utilisation de la Plateforme prendra contact avec les responsables afin d'exposer son projet scientifique. Les membres de la plateforme sont disponibles pour discuter des protocoles en amont et des résultats en aval (Cf. Fiche de discussion). Les étapes de production (cultures bactériennes, électrophorèses, etc) seront réalisées par les utilisateurs au sein de leur équipe (salle bactériologie de l'INEM disponible). La manipulation des systèmes de purification sera assurée par l'Assistant-ingénieur de la Plateforme, sauf pour des utilisateurs récurrents qui suivront une formation ad hoc s'ils souhaitent devenir autonomes.

Cette plateforme est sous la responsabilité :

- d'un Assistant Ingénieur (mi-temps) : **Florence Boutillon**  
[florence.boutillon@inserm.fr](mailto:florence.boutillon@inserm.fr)  
Tél: 01.72.60.63.67
- d'un Responsable Scientifique : **Vincent Goffin (DR. INSERM)**  
[vincent.goffin@inserm.fr](mailto:vincent.goffin@inserm.fr)  
Tél: 01.72.60.63.68

## Plateforme Protéines Recombinantes

### Fiche de Discussion

- 1- **Votre protéine d'intérêt a-t-elle déjà été produite dans E. coli (publication)?**
  - a. Oui: on regarde ensemble, et on reconduit le même protocole
  - b. Non: voir point 2
- 2- **Le plasmide d'expression existe-t-il?**
  - a. Oui : on tente un essai de production "classique" – voir point 3
  - b. Non:
    - i. Réfléchir ensemble à un plasmide d'expression adéquat (tags, etc)
    - ii. Vous (pas la plateforme) amplifiez le vecteur, sous-clonez, séquencez le vecteur recombinant
- 3- **ESSAIS de production analytique:**
  - a. On discute ensemble du protocole, on vous aide si nécessaire
  - b. D'abord essai en petit volume (10-50 ml)
  - c. Gel SDS PAGE avant/après induction, réducteur/non réducteur (si pertinent)
  - d. Analyse de la production (à faire ensemble)
    - i. Si OK : voir point 4
    - ii. Si pas de production: on réfléchit ...
- 4- **Production d'un premier batch préparatif**
  - a. 500-1000 ml – protocole standard ou adapté selon votre protéine/protocole
    - i. Chez vous ou salle bactério INEM – on vous aide si besoin
    - ii. Vérifier production par SDS PAGE (idem production analytique)
  - b. Si OK, Presse de French (cassage bactéries)
    - i. Par la plateforme (autonomie possible si utilisation récurrente)
    - ii. Séparer fraction soluble/ insoluble
    - iii. Par vous : SDS PAGE pour déterminer si protéine soluble ou insoluble
      1. Si insoluble: voir point 5
      2. Si soluble: voir point 6
- 5- **Si protéine insoluble :**
  - a. Protocole de dénaturation standard (urée/dialyse continue) – on vous montre la première fois
    - i. Si protéine précipite lors de la renaturation: on réfléchit
    - ii. Si protéine reste soluble: passer à la purification par chromatographie (point 6)
- 6- **Purification par Chromatographie**
  - a. Selon les caractéristiques de ce qu'il faut purifier (volume, pH, pl de la protéine, etc), on décide d'un type de colonne (Florence fait la purification, du moins au début):
    - i. Echange d'ion (Q ou S): au dessus (Q) ou en dessous (S) du pl de la protéine d'intérêt
    - ii. Affinité: Tag His 6, ...
    - iii. Tamis (gel filtration): essai analytique sur AKTA, préparatif sur Gradifrac
  - b. Pour chaque purification, vous faites un SDS PAGE des fractions/pics pour localiser la protéine, définir son état de pureté, etc
    - i. Si OK, vous la conservez chez vous (congelée, lyophilisée), puis procédez aux essais fonctionnels
    - ii. Si pas OK: réfléchir au protocole de purification, changer de colonne, etc.