

CONSEILS POUR REALISER DES COLORATIONS COMPATIBLES AVEC LA SPECTROMETRIE DE MASSE

Cette fiche donne des conseils pour réaliser une coloration des gels d'électrophorèse à une ou deux dimensions, avec les deux agents de révélation les plus couramment utilisés : le bleu de coomassie colloïdal et le nitrate d'argent. Veuillez nous consulter pour les autres méthodes de coloration (Sypro, DIGE, ...).

Remarque : L'étape de coloration du gel représente également une source potentielle de contamination par les kératines. Il faut donc prendre les mêmes précautions que pour la réalisation des gels.

Coloration au bleu de coomassie colloïdal

La coloration au bleu de coomassie colloïdal est réversible [1].

Cette coloration est éliminée par des lavages successifs avec des solvants organiques après la découpe des spots ou des bandes, avant l'étape de digestion enzymatique (décoloration et digestion enzymatique sont robotisées).

La coloration au bleu de coomassie colloïdal n'affecte pas les liaisons covalentes des protéines. Elle est donc totalement « compatible masse ».

Fixation (cette étape évite la diffusion des protéines dans le gel) :

- 40% d'éthanol absolu (pour précipiter les protéines).
- 3% d'acide phosphorique (pour éliminer les tampons et le SDS du gel).
- Incuber le gel 2h au minimum.
- Laver 3 fois pendant 10min avec H₂O.

Préparation de la solution stock de coloration (100 ml pour un grand gel 20 cm x 20 cm) :

- Préparer une solution contenant 20 ml H₂O, 10 ml d'acide phosphorique et 10 g de sulfate d'ammonium. Mélanger jusqu'à dissolution complète.
- Ajouter 0.12 g de Bleu Brillant G250. Mélanger jusqu'à dissolution complète.
- Compléter avec de l'eau jusqu'à 80 ml.
- Ajouter lentement 20 ml de méthanol.

La solution est stable, à l'abri de la lumière, pendant 6 mois à température ambiante.

Révélation du gel

- Agiter pendant un jour au minimum à température ambiante (pour développer au maximum la coloration).

Lorsque l'image obtenue est satisfaisante (spots ou bandes colorées sur un fond blanc), la solution de révélation est remplacée par de l'eau et réaliser plusieurs lavage, jusqu'à élimination de la couleur bleue dans l'eau.

[1] Candiano *et al.* (2004). Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 25 (9), 1327-1333.

Coloration au nitrate d'argent

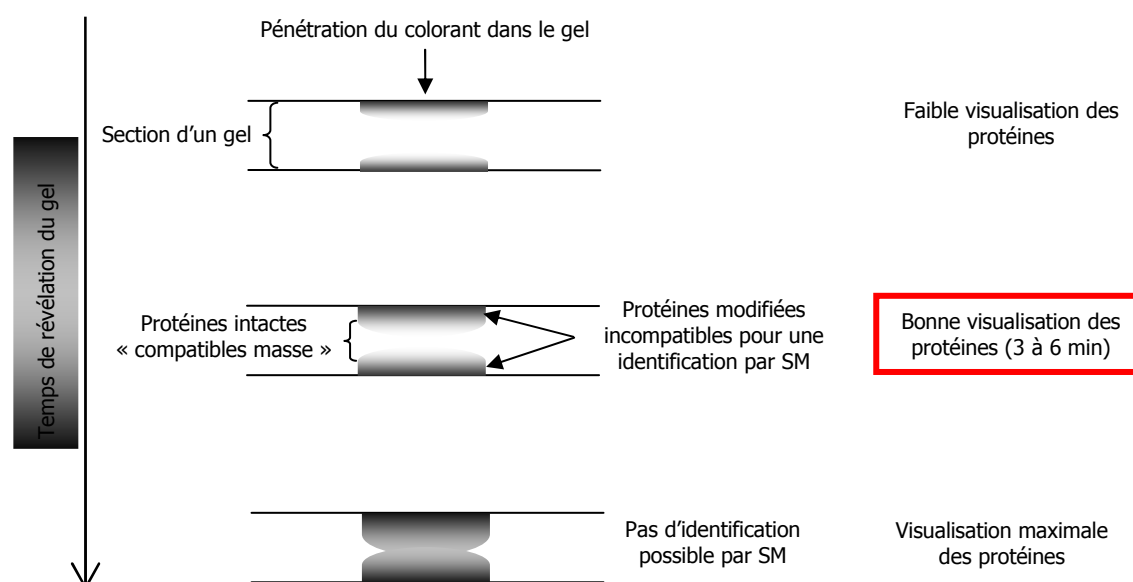
La coloration au nitrate d'argent est normalement irréversible.

L'action du nitrate d'argent sur les molécules de protéines modifie de façon covalente celles-ci qui ne peuvent alors plus être identifiées par la stratégie d'analyse protéomique.

La coloration au nitrate d'argent est plus sensible que la coloration au bleu de coomassie, mais présente l'inconvénient de ne pas révéler toutes les protéines avec le même facteur de réponse, contrairement au bleu de coomassie.

Pour qu'une révélation au nitrate d'argent soit compatible avec une analyse par spectrométrie de masse, il faut limiter le temps d'action du nitrate d'argent. Un compromis est nécessaire pour révéler suffisamment de molécules de protéines (et obtenir un ombrage par l'argent suffisant) tout en conservant assez de molécules de protéines intactes pour l'analyse protéomique.

Le temps d'action du nitrate d'argent doit être contrôlé et limité pour que l'analyse par spectrométrie de masse reste possible. Pour toutes les recettes proposées, le schéma ci-dessous résume les conditions d'une révélation optimale.



Plusieurs recettes pour la révélation au nitrate d'argent peuvent être utilisées. Par rapport aux modes de révélation classiques, «non compatible masse», elles se différencient principalement par l'absence de glutaraldéhyde qui réticulerait de façon irréversible les protéines [2].

Plusieurs préparations ont été améliorées par rapport à celle de et sont maintenant commercialement disponibles :

- Sigma : Proteo silver Plus (Protsil-1 ou Protsil-2)
- Bio Rad : Dodeca Silver Stain Kit (Catalog # 161-0480)

De plus, il est préférable de réaliser la décoloration du gel le même jour que la coloration [3], par une réduction de l'argent avec du thiosulfate de sodium et du ferricyanure de potassium [4].

[2] Shevchenko *et al.* (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins from silverstained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68, 850-858.

[3] Richert *et al.* (2004). About the mechanism of interference of silver staining with peptide mass spectrometry. *Proteomics* 4(4):909-916.

[4] Gharahdaghi *et al.*(1999). Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: A method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. *Electrophoresis* 20(3):601-605.