

Extraction de protéines

1. Equipements utilisés

L'extraction des protéines urinaires est effectuée à partir d'échantillons urinaires par une technique manuelle consistant en une précipitation par l'acide trichloracétique.

2. Personnel

Les extractions de protéines urinaires sont effectuées par les techniciens de laboratoire de la Plateforme de Ressources Biologiques qui sont formés et habilités à fréquence régulière spécifiquement sur cette technique.

3. Matrices prises en charge

Les techniciens peuvent traiter jusqu'à 6 échantillons d'urine simultanément.

Matrice	Urines	
Support du prélèvement	Tube Falcon, congélation immédiate à -80°C*	
Quantité d'échantillon	50 mL*	
Nature	Congelé (-80°C)*	
Produit dérivé	Protéines du culot	Protéines du surnageant
Volume d'élution	200 µL*	Culot sec*
Tampon d'élution	Tampon T-PER (Tissue Protein Extraction Reagent) anti-protéase, anti-phosphatase*	(Culot sec)
Délai technique interne	1 heure	4 heures

*validation fournisseur + validation en interne, **validation fournisseur uniquement

Points de vigilance :

- Il peut apparaître un précipité lors de la décongélation des urines. Les urines doivent alors être bien homogénéisées afin de remettre en suspension le précipité.

4. Contrôles qualité disponibles sur les échantillons de protéines obtenus

La qualité des protéines obtenues doit être adéquate pour l'application prévue en aval. C'est pourquoi la Plateforme de Ressources Biologiques accorde une grande importance aux contrôles qualité réalisés sur les échantillons de protéines extraits. Les différents contrôles qualité décrits ci-dessous sont disponibles et peuvent être réalisés sur demande.

- Dosage protéique

La Plateforme de Ressources Biologiques utilise la méthode BCA (BiCinchoninic acid Assay), un dosage colorimétrique des protéines basé sur l'acide bicinchonique. La méthode repose sur la réduction de l'ion Cu^{2+} en ion Cu^+ en présence de protéines en milieu alcalin. L'acide bicinchoninique, réactif très spécifique de l'ion Cu^{2+} , forme alors un complexe pourpre ayant une absorbance optique maximale à 562 nm. Cette absorbance est proportionnelle à la concentration de protéines.

Les techniques d'extraction proposées par la Plateforme de Ressources Biologiques sont optimisées pour permettre d'obtenir la concentration la plus élevée possible de manière à avoir suffisamment de matériel pour toutes les applications prévues en aval.

- Migration des protéines sur gel

Il est également primordial d'évaluer l'intégrité et la qualité des protéines urinaires obtenues par migration sur gel de polyacrylamide et par une technique de transfert de protéines ou *western blot*.

Une simple migration sur gel de polyacrylamide à 7,5% permet dans un premier temps d'estimer le poids moléculaire et la dégradation des protéines urinaires obtenues. La présence de bandes au niveau du poids moléculaire de l'albumine humaine (65 kDa) permet de s'assurer de l'efficacité du protocole d'extraction.

Par la suite, la qualité des protéines urinaires obtenues a été étudiée en *western blot*. Les protéines sont tout d'abord séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide selon leur taille. Elles sont ensuite transférées depuis le gel sur une membrane où elles sont exposées à des anticorps spécifiques de protéines spécifiquement urinaires, telles que l'uromoduline ou la TSG101.

- Rendement d'extraction

Le rendement d'extraction correspond au rapport entre la quantité de protéines extraite en µg et le volume de la matrice initiale utilisé en mL. Le rendement d'extraction moyen doit être calculé pour pouvoir comparer entre elles différentes techniques d'extraction de protéines. Cette donnée est essentielle car elle permet de s'assurer que la quantité de protéines obtenue est suffisante pour les applications en aval.

La Plateforme de Ressources Biologiques a soigneusement validé les différentes techniques d'extraction proposées pour pouvoir garantir un rendement d'extraction compatible avec les applications en aval souhaitées par les chercheurs.

5. Performances attendues

Le tableau ci-dessous résume les performances des différentes techniques d'extraction de protéines mises en œuvre par la Plateforme de Ressources Biologiques.

	Concentration protéique	Rendement d'extraction
Protéines du culot	> 300 µg/mL	271 µg de protéines / mL d'urine
Protéines du surnageant	> 300 µg/mL	14 µg de protéines / mL d'urine

6. Conclusion

La Plateforme de Ressources Biologiques s'assure que la qualité des protéines urinaires obtenues avec les techniques d'extraction mises au point sont compatibles avec les applications prévue en aval.

L'ensemble des résultats générés lors de la mise au point et de la validation des techniques d'extraction de protéines urinaires mises en œuvre à la Plateforme de Ressources

Biologiques fait l'objet d'un rapport détaillé. La mise en œuvre de la technique d'extraction de protéines est ensuite clairement décrite sous forme d'un mode opératoire standardisé.

Mise à jour : septembre 2015