Master 2-Biotechnologies
Parcours Cytologie Moléculaire Appliquée

UE Immunoinformatique-Immunotechnologies

Les anticorps : un outil pour la biologie moléculaire

Ounissa AÏT AHMED
Institut de Génétique Humaine-UPR 1142 CNRS
Ounissa.Ait-Ahmed@igh.cnrs.fr
www.igh.cnrs.fr

IDENTIFICATION d'UNE SEQUENCE NUCLEIQUE (GENE) A PARTIR D'UN ANTICORPS

ANALYSE DES PROPRIETES D'UNE SEQUENCE PEPTIDIDIQUE (PROTEINE) A PARTIR d'UNE SEQUENCE NUCLEIQUE GRACE A UN ANTICORPS

EXEMPLES

IDENTIFICATION d'UN GENE

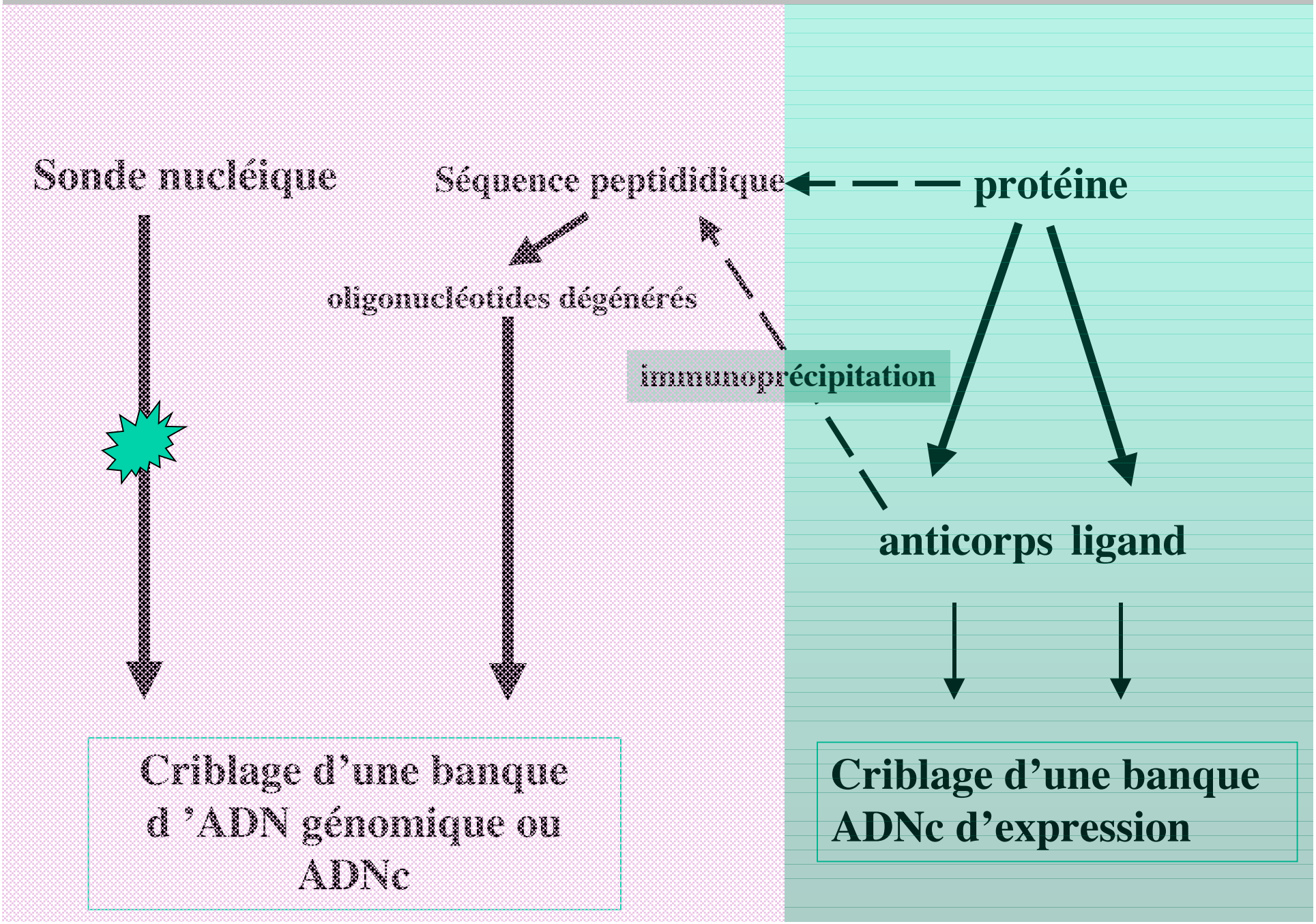
1) Bases de données
2) Méthodes expérimentales

Pourquoi devons-nous encore faire face à cette problématique ?

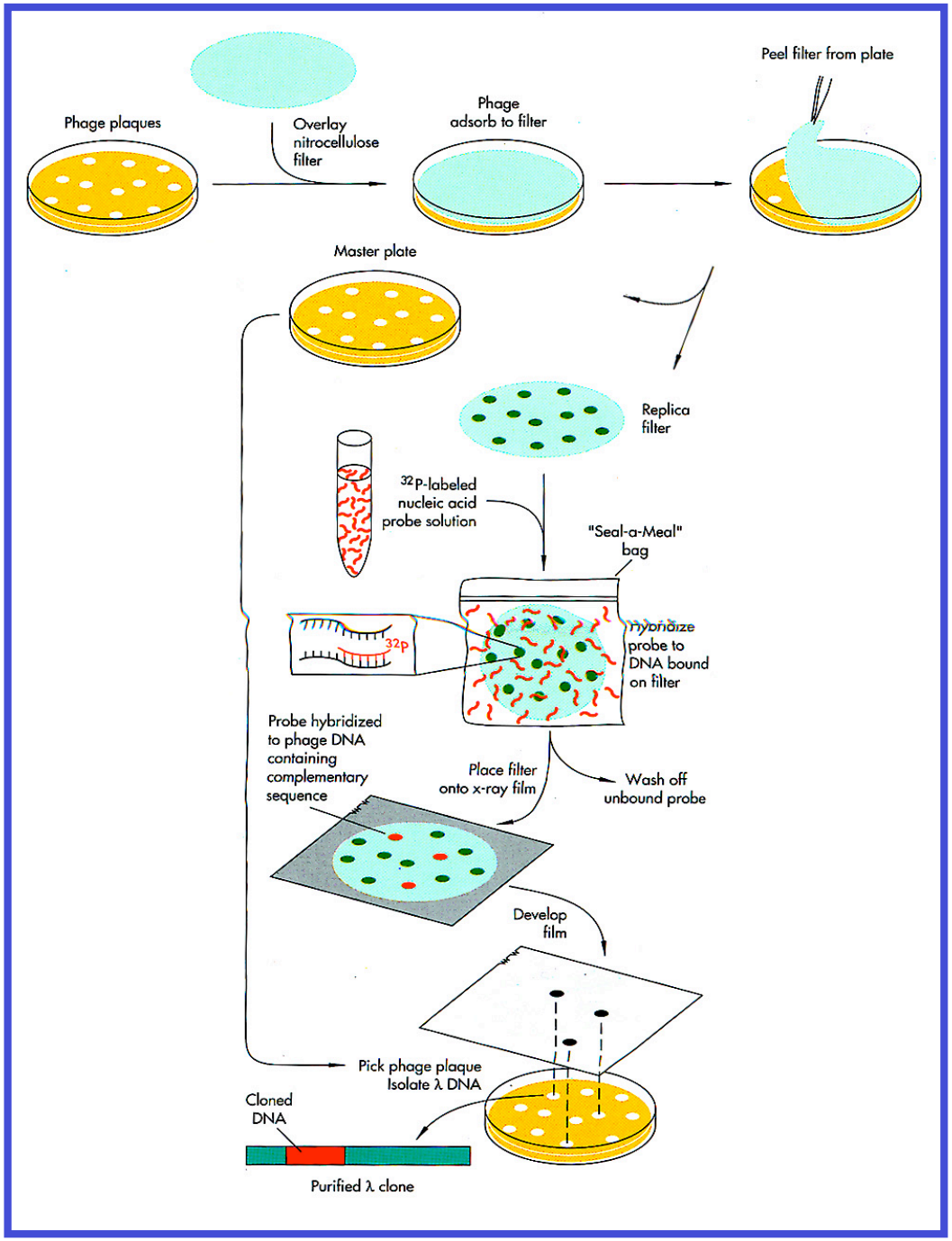
Tous les génomes ne sont pas séquencés.

Exemple : gène de la yemanucléine chez la sauterelle

IDENTIFICATION d'UN GENE



Identification d'un gène avec une séquence nucléique



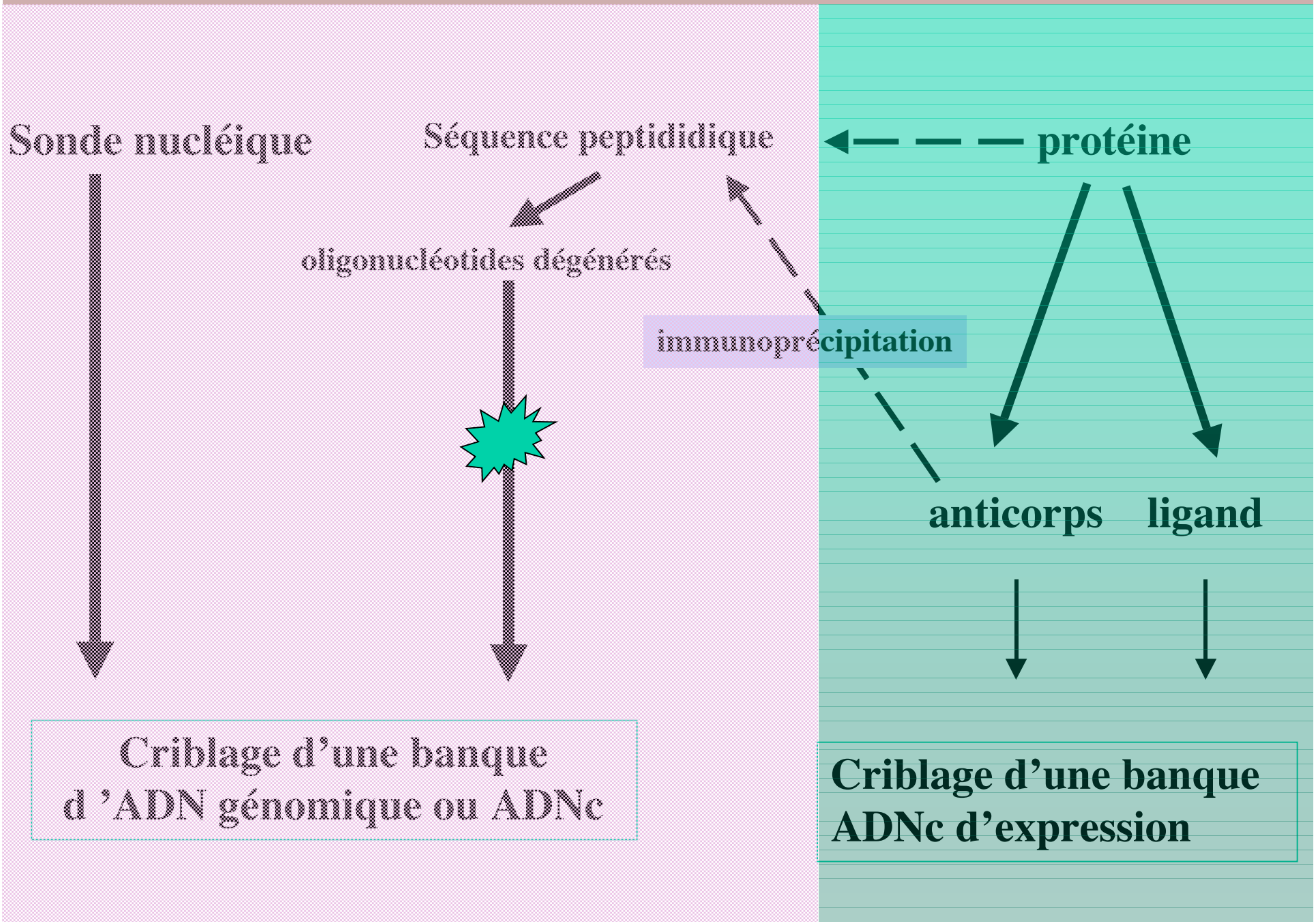
répliques

hybridation

révélation

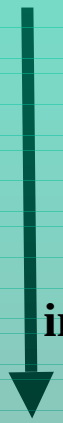
Identification des Clones caractérisation

IDENTIFICATION D'UN GENE



méthode biochimique

protéine



anticorps

immunoprécipitation

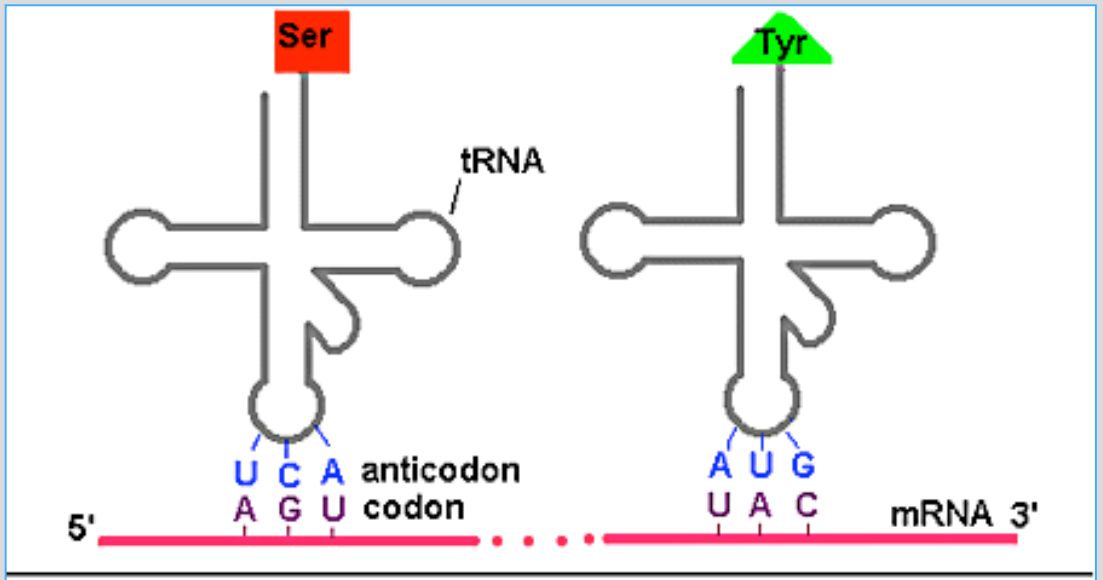
spectro de masse
séquence : base de données
si inconnue, chercher le gène*

inconvénient :
quantité de matériel nécessaire

***méthode de biologie moléculaire**

Le code génétique est :
- **universel**
- **non ambigu**
- **dégénéré (redondant)**

conséquences

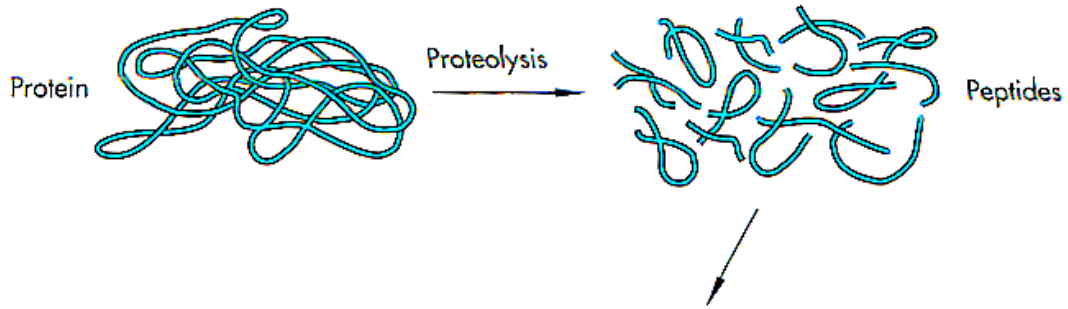


2nd base in codon

1st base in codon	U	C	A	G	3rd base in codon
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	STOP	STOP	A
	Leu	Ser	STOP	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

The Genetic Code

immunoprécipitation



Edman-spectro de masse

Cys-Met-Asp-Glu-Met-Lys-Arg-Asn-Ile — Partial amino acid sequence

TG[T/C]-ATG-GA[C/T]-GA[A/G]-ATG-AA[A/G]-[A/G]G-AA[C/T]-ATT[A/C] — Possible DNA sequence

or CG[A/C][C/G][G/T]

Oligonucléotides dégénérés

Contains 8 different sequences:

TGTATGGATGAAATGAA
TGCATGGATGAAATGAA
TGTATGGACGAAATGAA
TGCATGGACGAAATGAA
TGTATGGATGAGATGAA
TGCATGGACGAGATGAA
TGCATGGATGAGATGAA
TGTATGGACGAGATGAA

Degenerate probe

5′ TG[T/C]ATGGA[T/C]GA[A/G]ATGAA 3′

Unique "Guessmer"

5' TGCATGGACGAGATGAAGCGCAACATC 3'

Hybridation-banque ADNc

5' TGCATGGACGAAATGAA 3'

---ACGTACCTGCTTTACTTCGCGTTATAG---

5' TGCATGGACGA[G]ATGAAGCGCAA[C]ATC 3'

---ACGTACCTGCT[T]TACTTCGCGTT[A]TAG---

Guessmer hybridized with mismatches to cloned gene

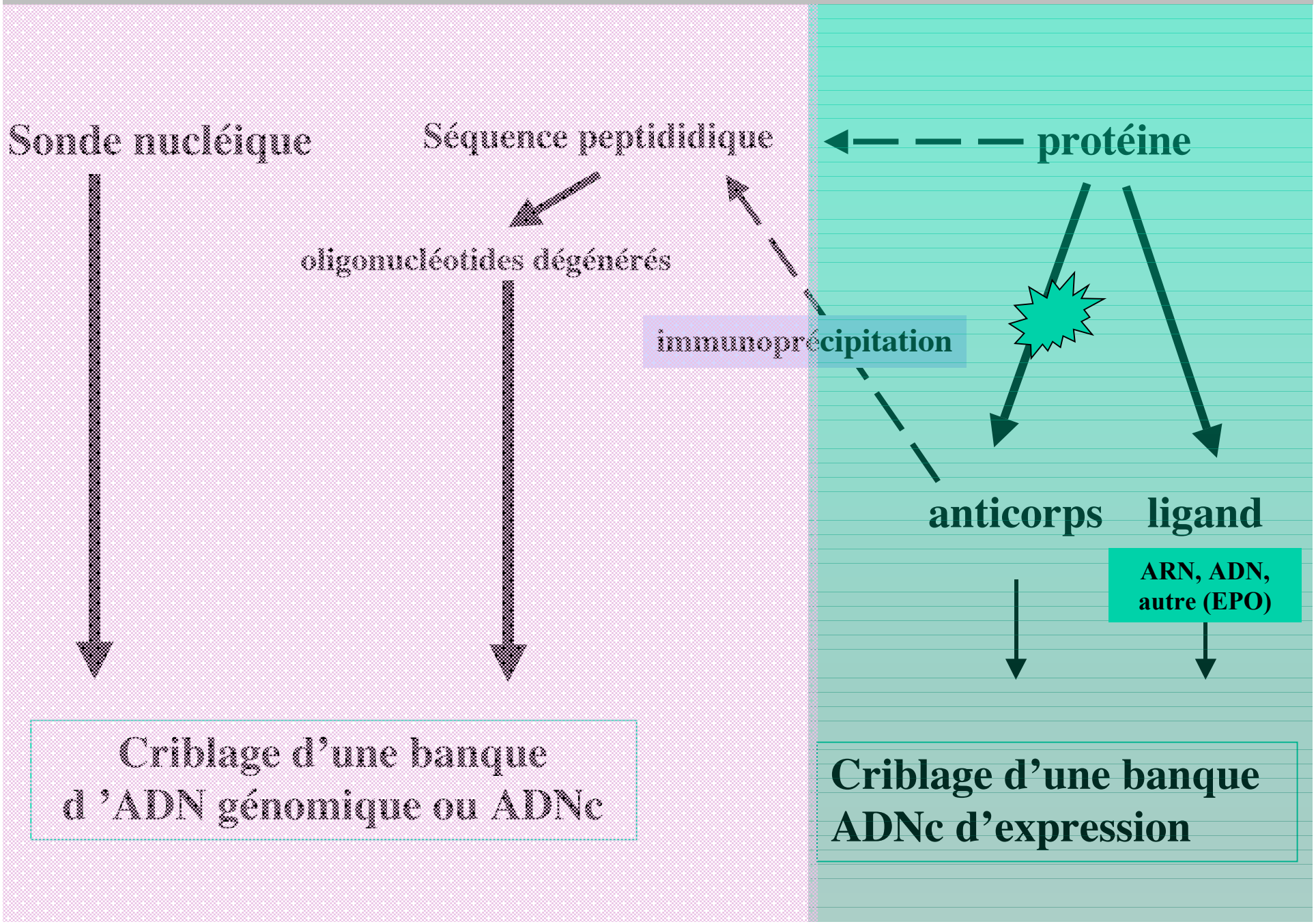
Identification du bon clone

---TGCATGGACGAAATGAAGCGCAATATC---

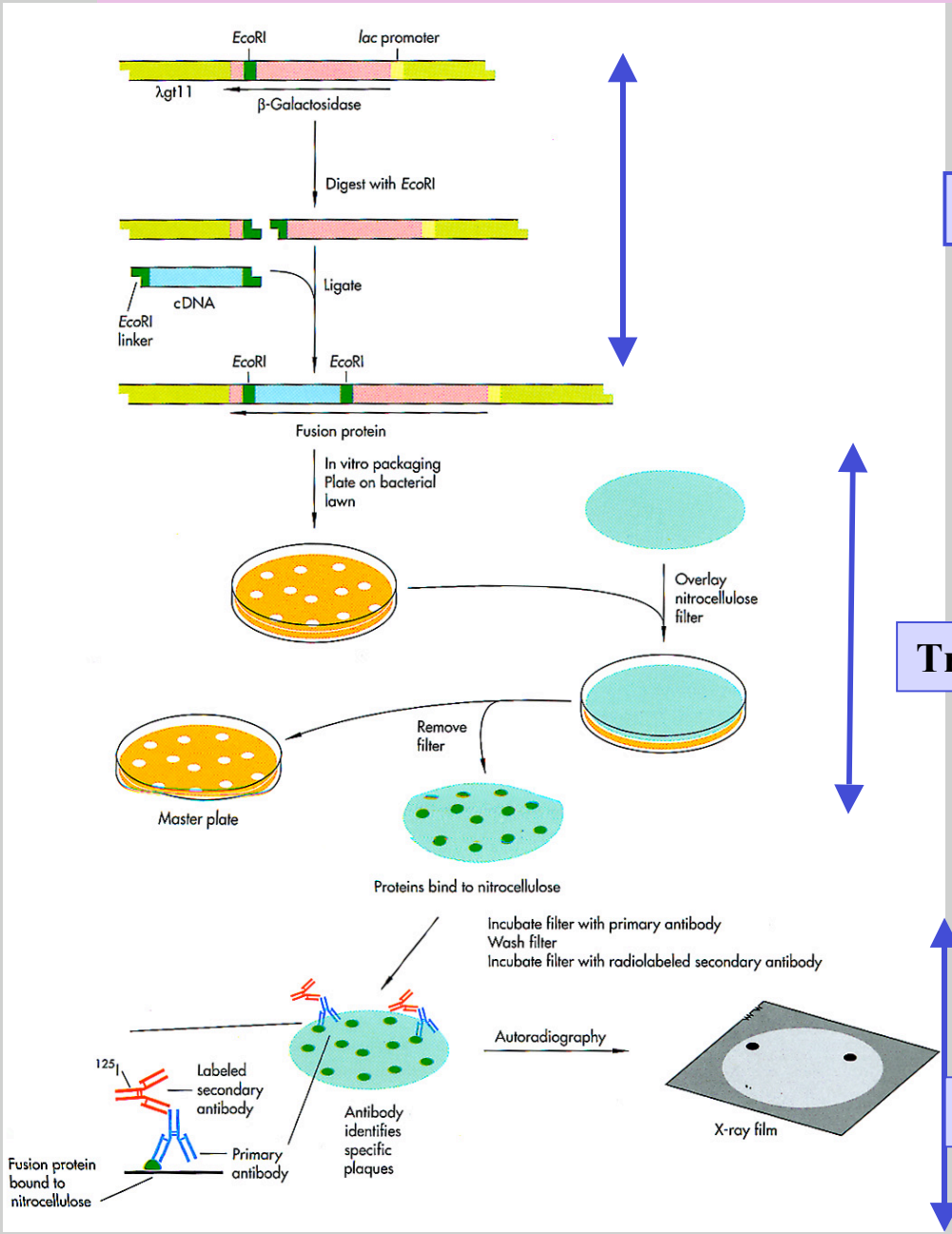
---ACGTACCTGCTTTACTTCGCGTTATAG---

Actual DNA sequence

IDENTIFICATION d'UN GENE



Criblage d'une banque d'expression avec un anticorps ou un ligand



Banque dans vecteur d'expression

Transfert des clones sur membrane

Détection -anticorps primaires, secondaires

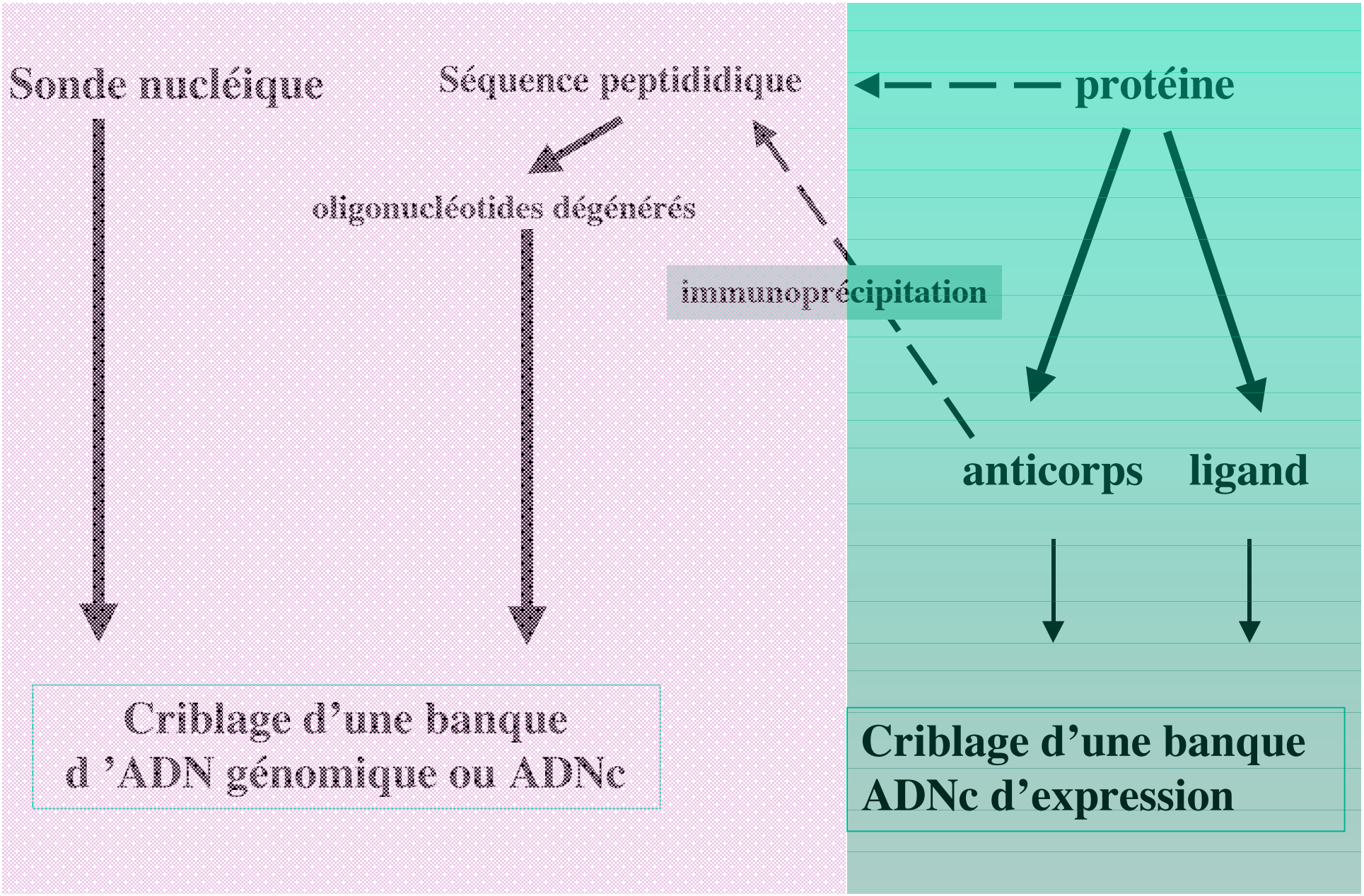
Vecteurs et banques d’expression : propriétés

Anticorps primaires : propriétés

Anticorps secondaires : propriétés

Caractérisation des clones identifiés :
Expression des clones recombinants et western blots
Séquençage de l'ADN

IDENTIFICATION d'UN GENE



Dans cette ère post-génomique, c'est souvent la situation réciproque qui se produit : pléthore de séquences nucléiques. Fonction des protéines codées ?

Nécessité de méthodes efficaces et peu coûteuses pour accéder aux protéines.

EPITOPE TAGGING

Principe

Propriétés d'une étiquette

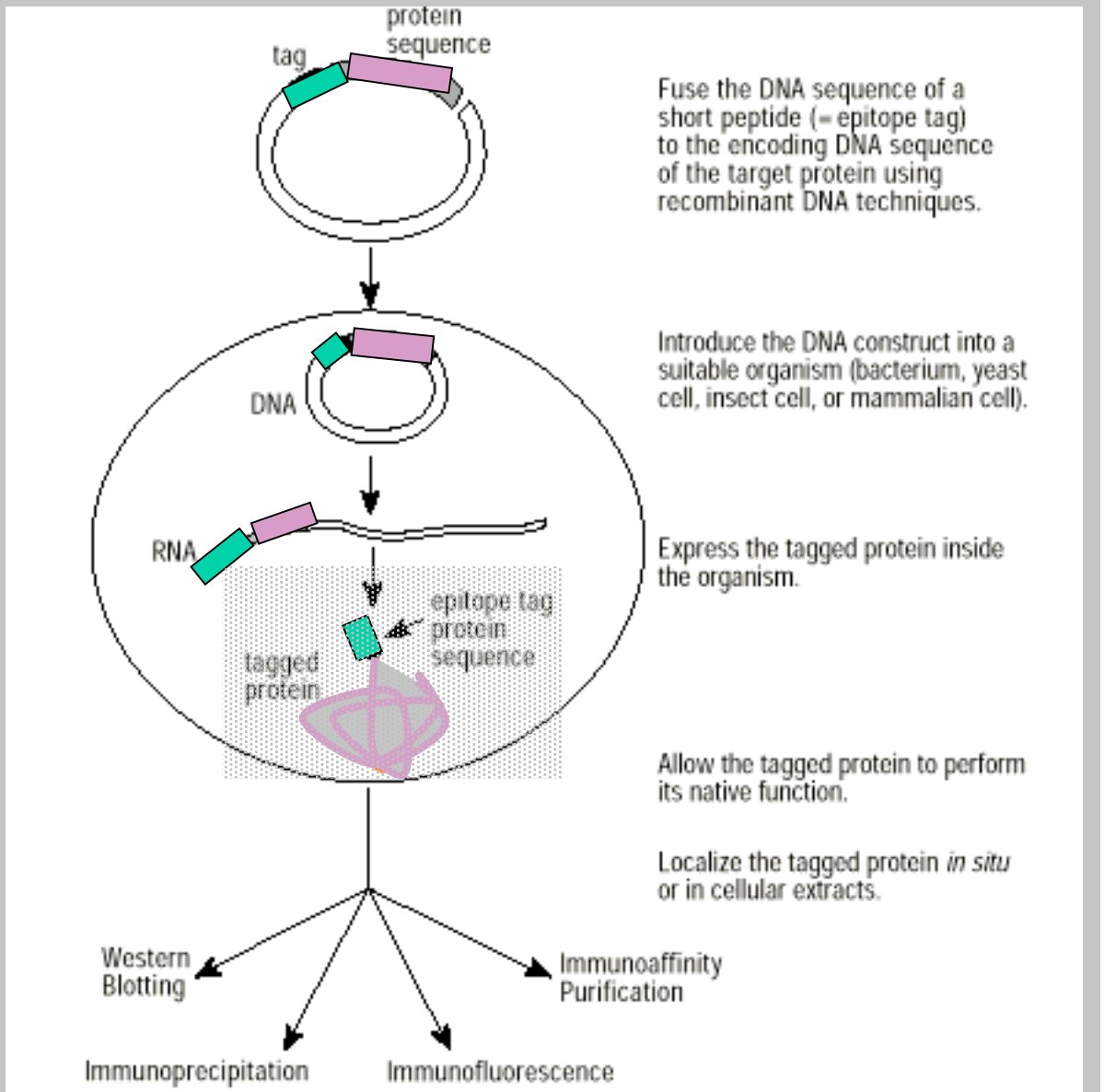


Figure 1B.2: Schematic of epitope tagging technique.

QUELQUES EXEMPLES DE TAGS

- ***HIS :**
  H-H-H-H-H-H

- **FLAG :**
  DYKDDDDK

- **HA :**
  YPYDVPDYA

- **c-myc :**
  EQKLISEEDL

Autres :
***Glutathione transférase (GST)**
Green Fluorescent Protein (GFP)
Beta-Galactosidase

*** Possibilité de purification**

Que peut-on faire avec une protéine taggée ?

Object of research*	How epitope tagging was used
Subcellular localization of tagged proteins	Immunofluorescence analysis of tagged proteins in permeabilized cells
	Ultrastructural analysis of tagged proteins in cells with gold-conjugated tag-specific antibodies and electron microscopy
	Western blot analysis of tagged full-length and truncated proteins in cell membrane subfractions
Determination of protein-protein interactions	Immunoprecipitation of tagged protein from cell extract and gel analysis of precipitate
	Immobilization of tagged protein on Protein A-agarose to study *in vitro* assembly of a multiprotein complex
Functional assay of tagged proteins	Immunoprecipitation of tagged protein from cell extract and activity assay (for example, phosphorylation) of immunoprecipitate
	Western blot detection of tagged protein in cellular extracts under varying conditions (for instance, activation or suppression of a cell function)
Tracking movement of tagged proteins within a cell	Immunoprecipitation of tagged protein from cell extract after pulse-chase labeling of cellular proteins
	Immunofluorescence analysis of tagged proteins in intact cell membranes
	Localization of tagged proteins in cells with gold-conjugated tag-specific antibody and electron microscopy
	Localization of tagged proteins in cells with confocal immunofluorescence microscopy
Characterization of new proteins	Western blot analysis of tagged proteins expressed by transfected cell lines
	Purification of tagged protein from cell extract by affinity chromatography
	Immunoprecipitation of tagged protein from cell extract and gel analysis of subunit structure

*For examples, see references listed under these topics in Section 6C, pages 6.10–6.16, of this manual.

Table 1B.1: Experimental uses for epitope tagging

METHODES PERMETTANT D'INSERER UN « EPITOPE TAG »

- **VECTEUR D 'EXPRESSION CONTENANT UN « TAG »**
- **SEQUENCE « LINKER » OU « ADAPTOR »**
- **PCR**

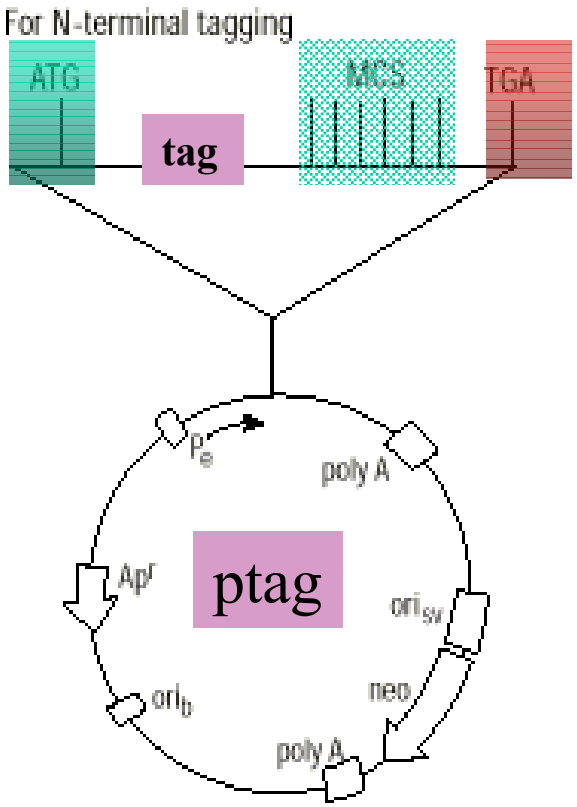
} **clonage dans un vecteur d'expression**

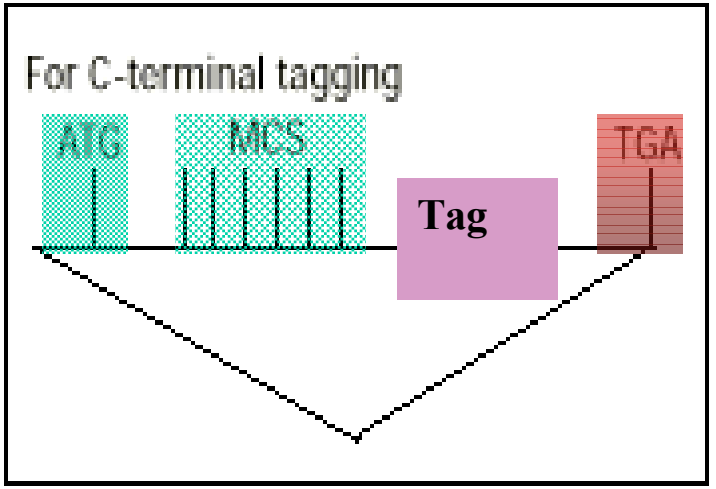
- **VECTEUR D ’EXPRESSION CONTENANT UN « TAG »**

- SEQUENCE « LINKER » OU « ADAPTOR »

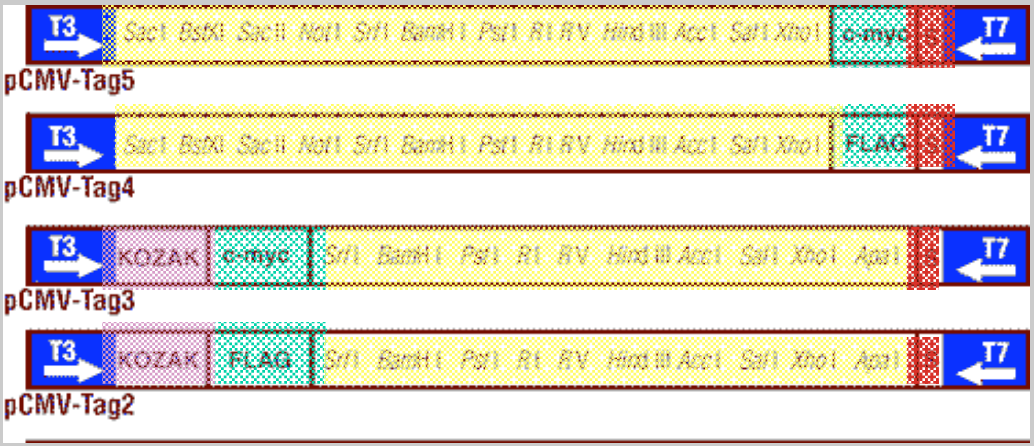
- PCR

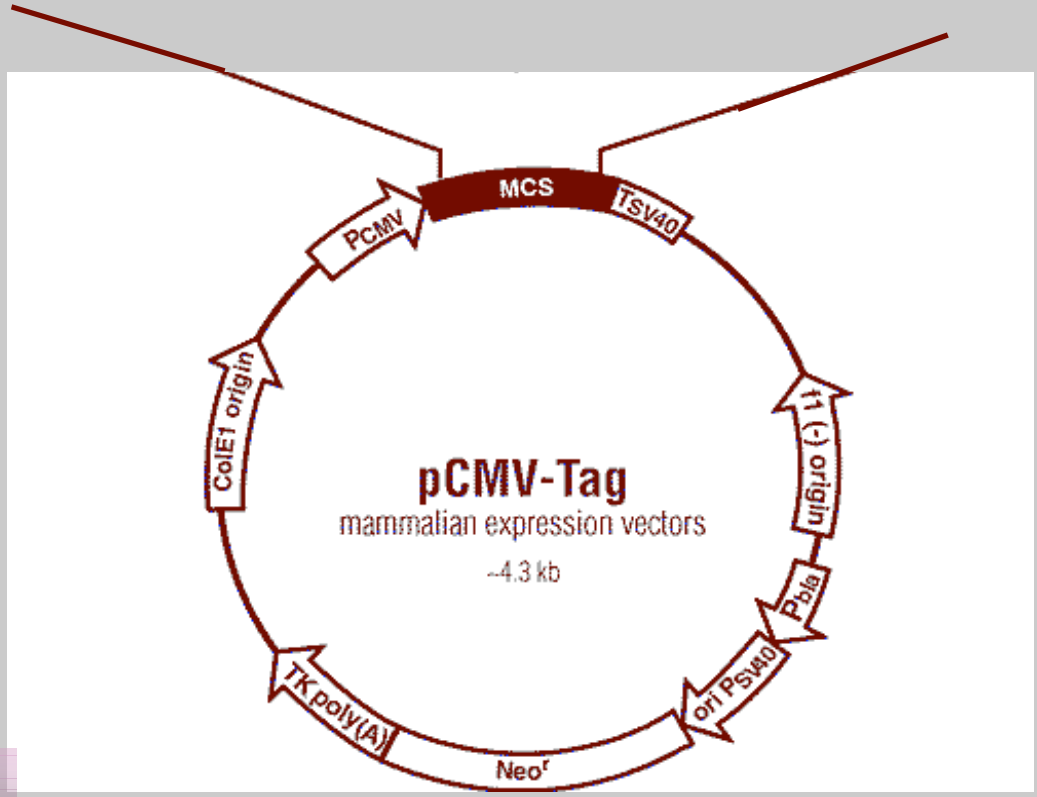
A.





Vecteur d'expression pour cellules de mammifères



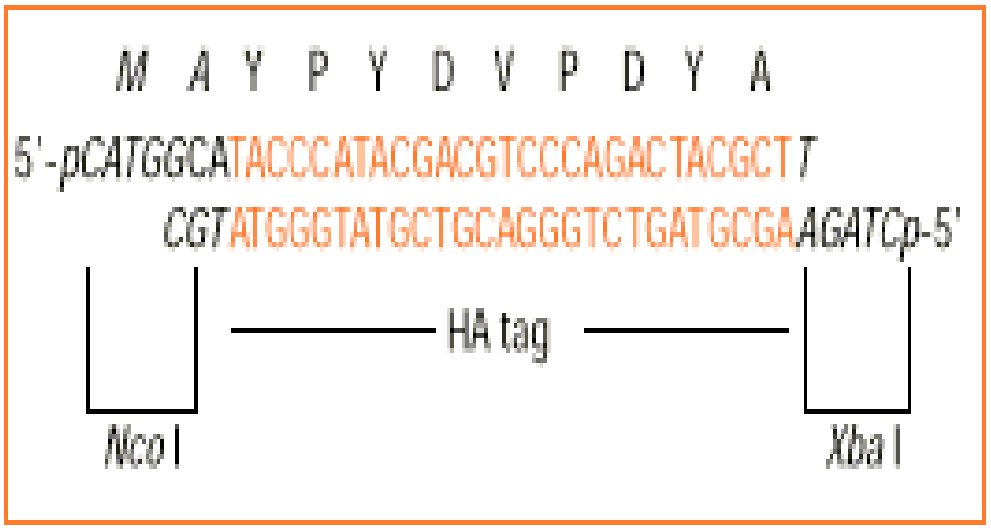


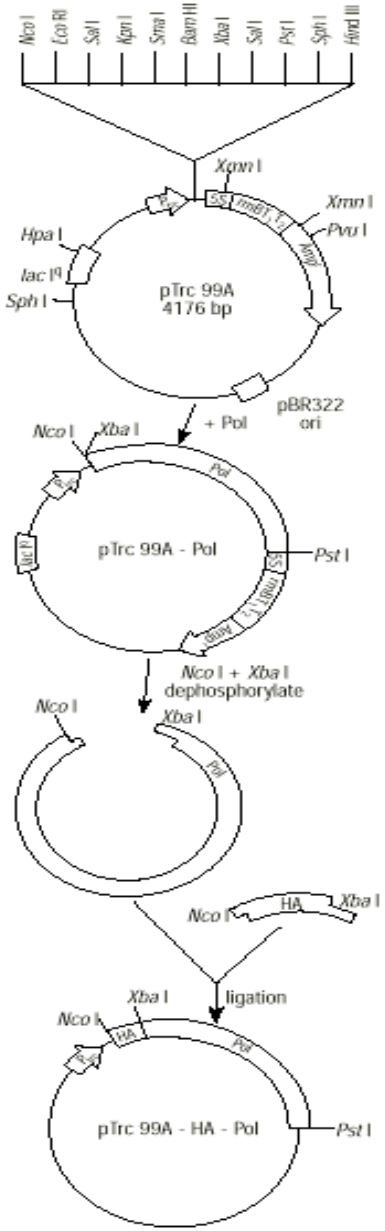
Kozak :5 'CCACCATGG-3 '

- VECTEUR D ’EXPRESSION CONTENANT UN « TAG »

- SEQUENCE « LINKER » OU « ADAPTOR »

- PCR



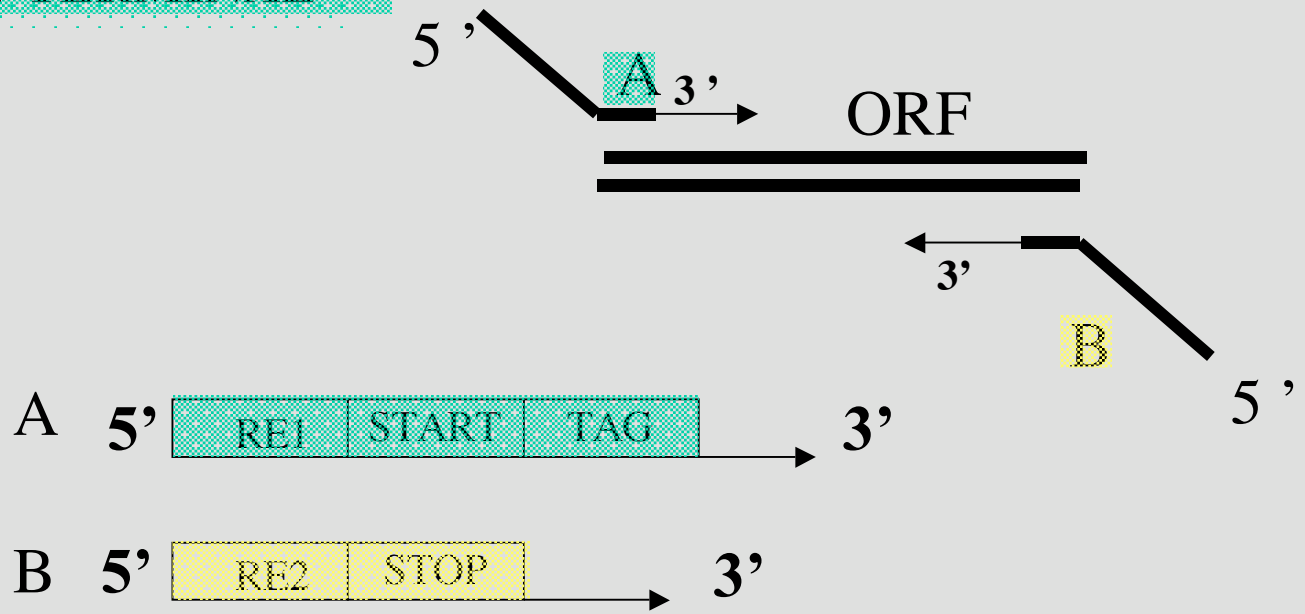


- VECTEUR D ’EXPRESSION CONTENANT UN « TAG »

- SEQUENCE « LINKER » OU « ADAPTOR »

- PCR

INSERTION D’UN TAG HA EN N-TERMINAL



5 ’-CCGGATCC *ATG* TAC CCA TAC GAC GTC CCA GAC TAC GCT (N)x- 3 ’

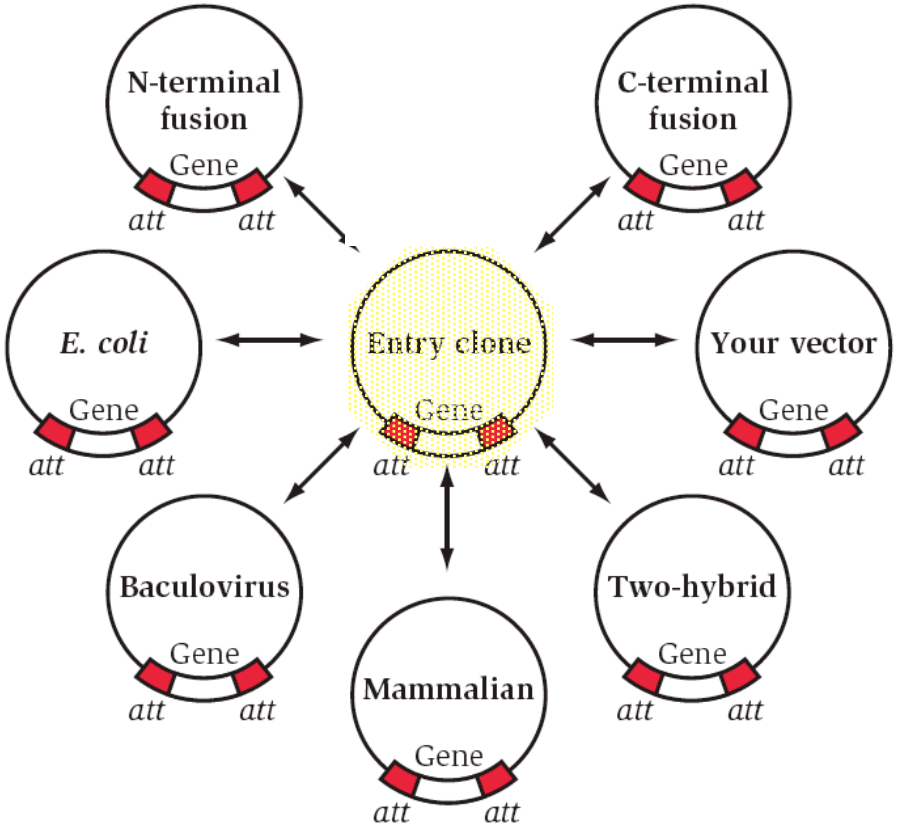
tenir compte de l ’utilisation préférentielle des codons selon les espèces, séquence d’initiation de la traduction.

Universalité du code et biais d'usage des codons

Amino acid	Number of possible codons	Codon(s) preferred[a] in				
		Mammals	Dicotyledon plants	Yeast	Gram Positive Bacteria	Gram Negative Bacteria
Alanine	4	GCC	GCU	GCU	GCG	GCA
Arginine	6	AGG, AGA (s)[f]	AGA	AGA	CGC, CGU	AGA
Asparagine	2	AAC	AAC	AAU	AAC	AAU
Aspartic acid	2	GAC	GAU	GAU	GAU	GAU
Cysteine	2	UGC	UGC (s)	UGU	UGC	UGC (s)
Glutamic acid	2	GAG	GAA (s)	GAA	GAA	GAA
Glutamine	2	CAG	CAA	CAA	CAG	CAA
Glycine	4	GGC	GGA, GGU	GGU	GGC	GGA (s)
Histidine	2	CAC	CAU	CAU	CAC, CAU	CAU
Isoleucine	3	AUC	AUU	AUU	AUC	AUU
Leucine	6	CUG	UUG, CUU	UUG	CUG	UUA
Lysine	2	AAG	AAG	AAA (s)	AAA	AAA
Methionine	1	AUG	AUG	AUG	AUG	AUG
Phenylalanine	2	UUC	UUC	UUU	UUC	UUU
Proline	4	CCC	CCA	CCA	CCG	CCU (s)
Serine	6	AGC	UCU	UCU	AGC	UCU, UCA
Threonine	4	ACC	ACU	ACU	ACC	ACA
Tryptophan	1	UGG	UGG	UGG	UGG	UGG
Tyrosine	2	UAC	UAC	UAC	UAU (s)	UAU
Valine	4	GUG	GUU	GUU	GUG	GUU
Stop codon	3	UGA	UGA	UAA	UAA	UAA

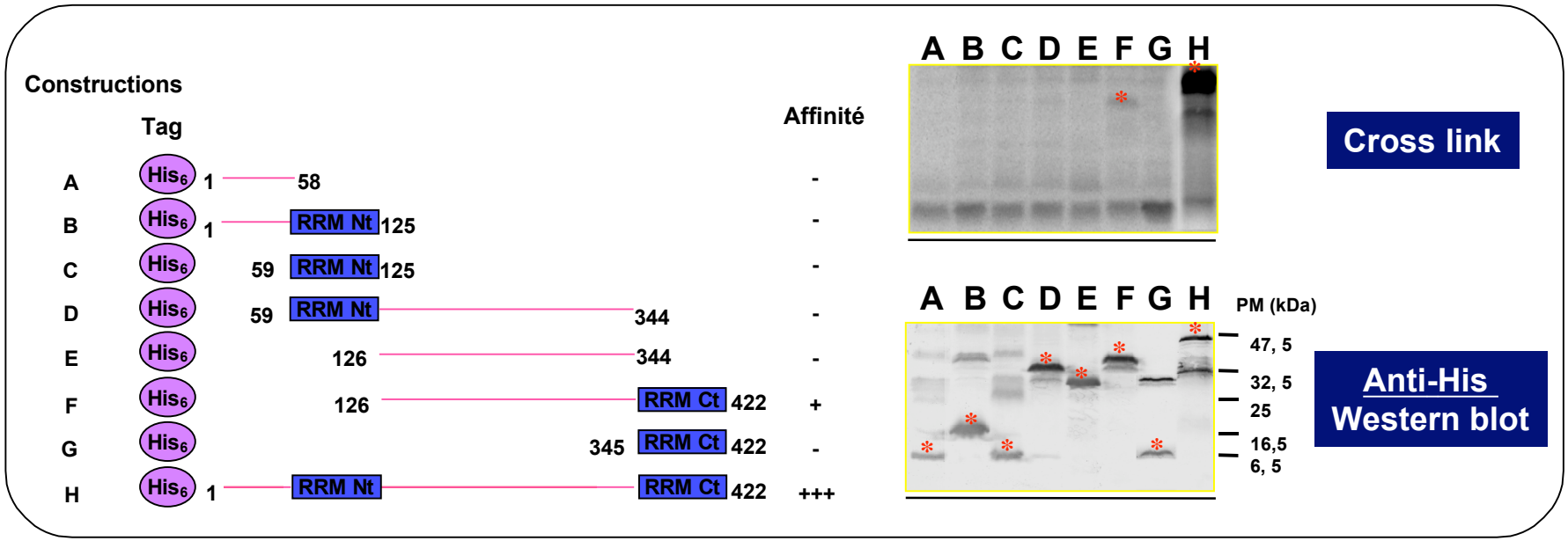
Les nouveaux vecteurs d'expression :

des systèmes polyvalents exemple : le système « gateway »



After cloning the gene of interest into the entry vector, you can transfer the gene of interest simultaneously into multiple destination vectors.

Rechercher des informations sur le web : invitrogen



Delaunay et al, NAR 2004

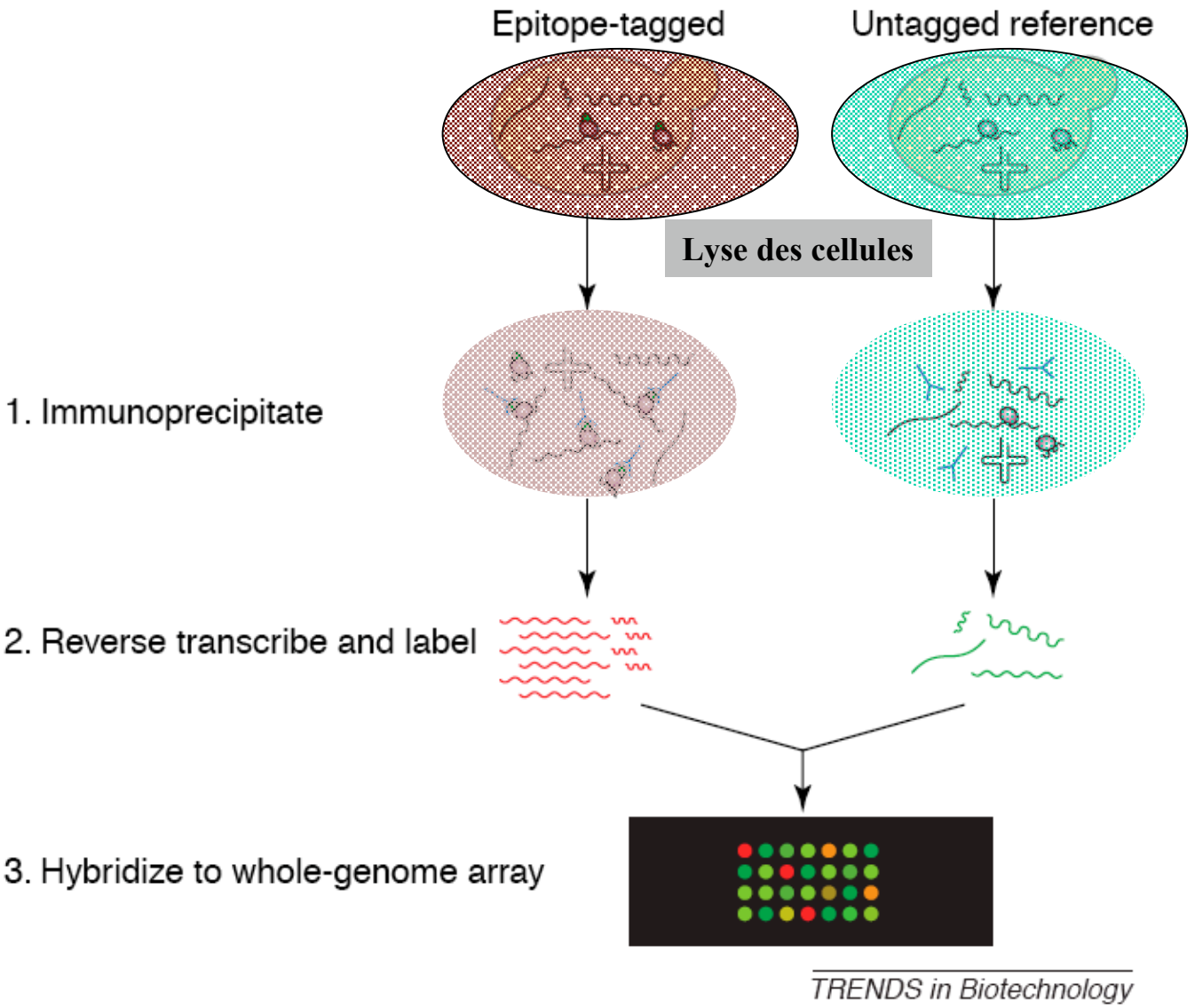
J'ai enlevé l'autre exemple car non publié.

Exemples : tirés de nos travaux

Génomique Fonctionnelle

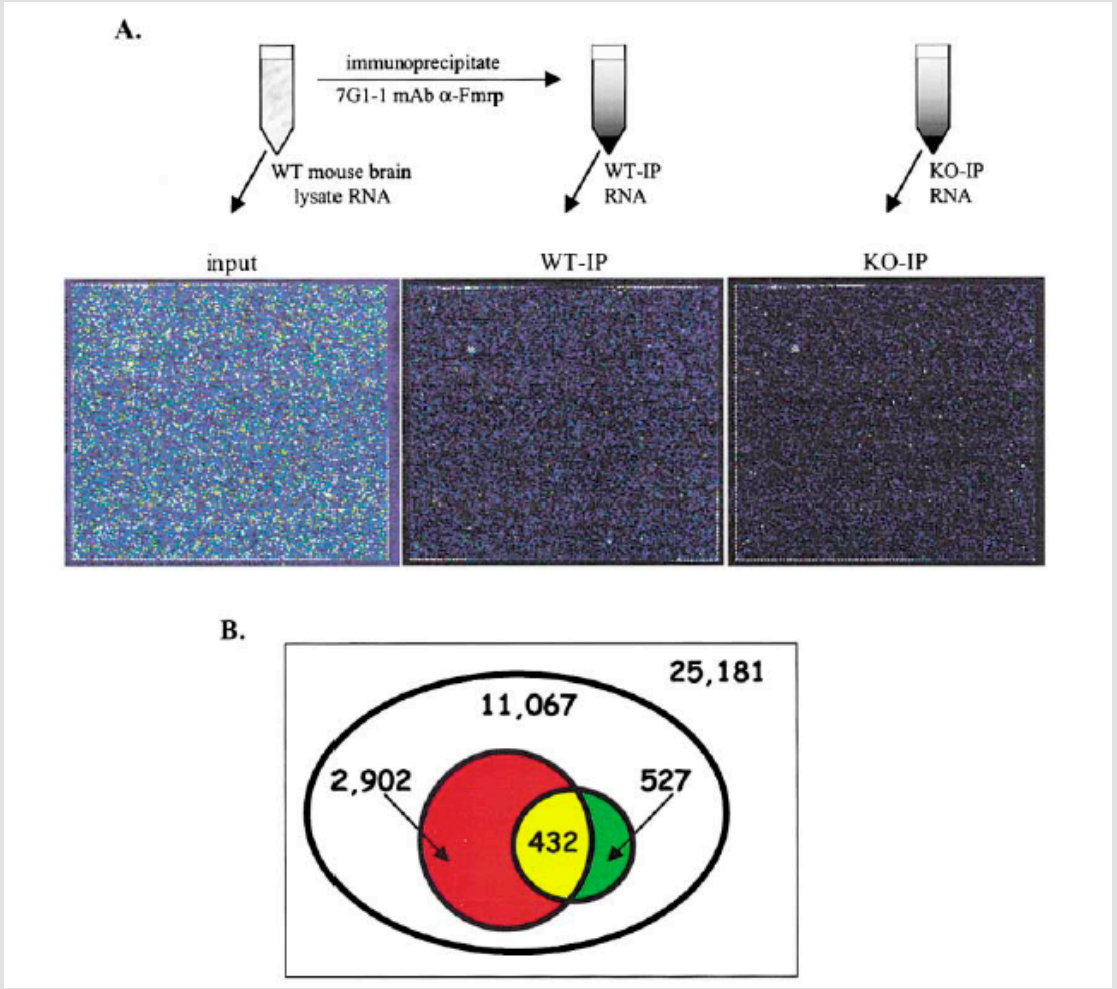
Anticorps et analyses « fonctionnelles » à haut débit

Utilisation d'un anticorps pour identifier les cibles d'une protéine de liaison à l'ARN qui porte une étiquette.



Cell, Vol. 107, 477–487, November 16, 2001, Copyright ©2001 by Cell Press

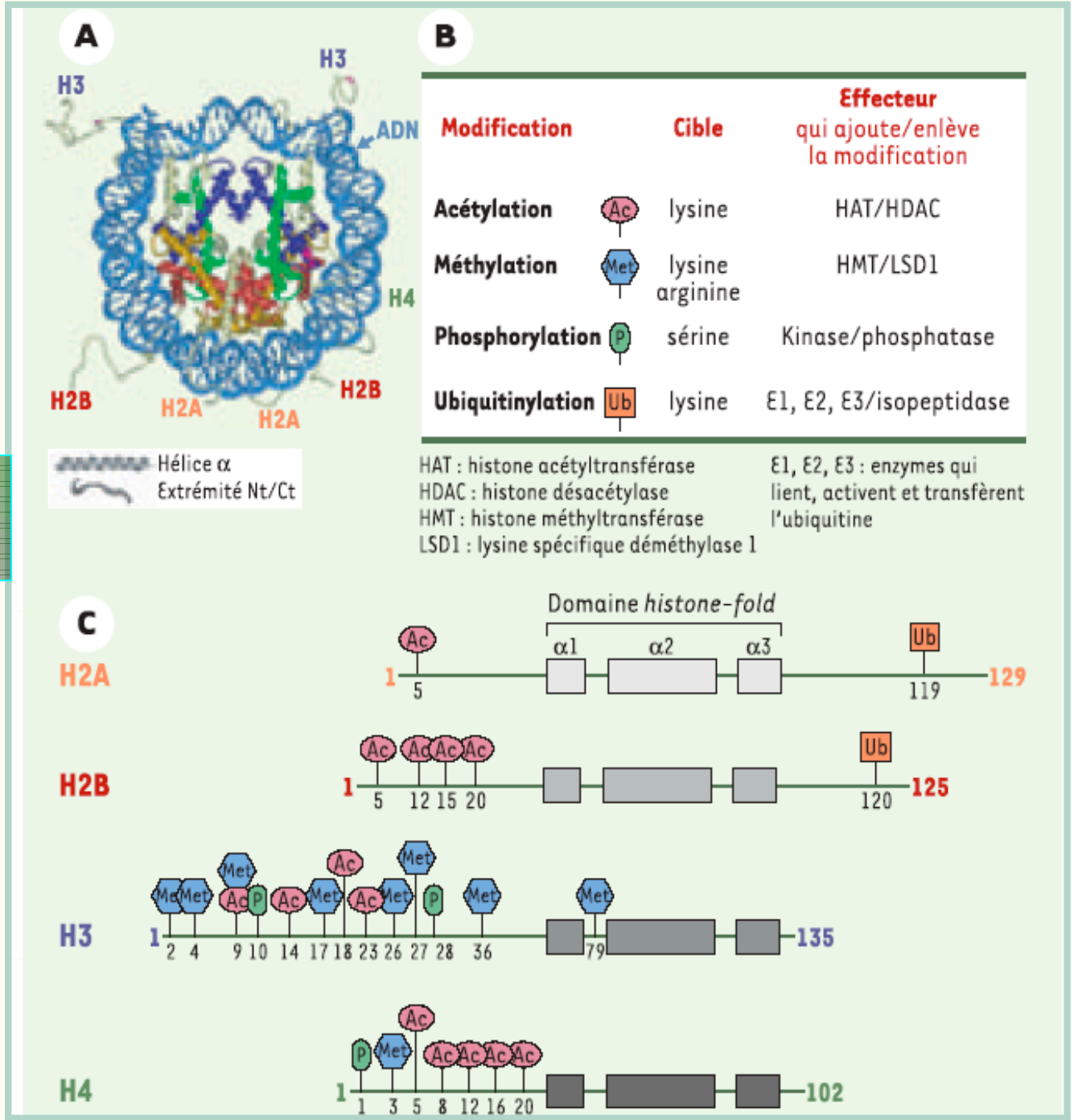
Microarray Identification of FMRP-Associated Brain mRNAs and Altered mRNA Translational Profiles in Fragile X Syndrome

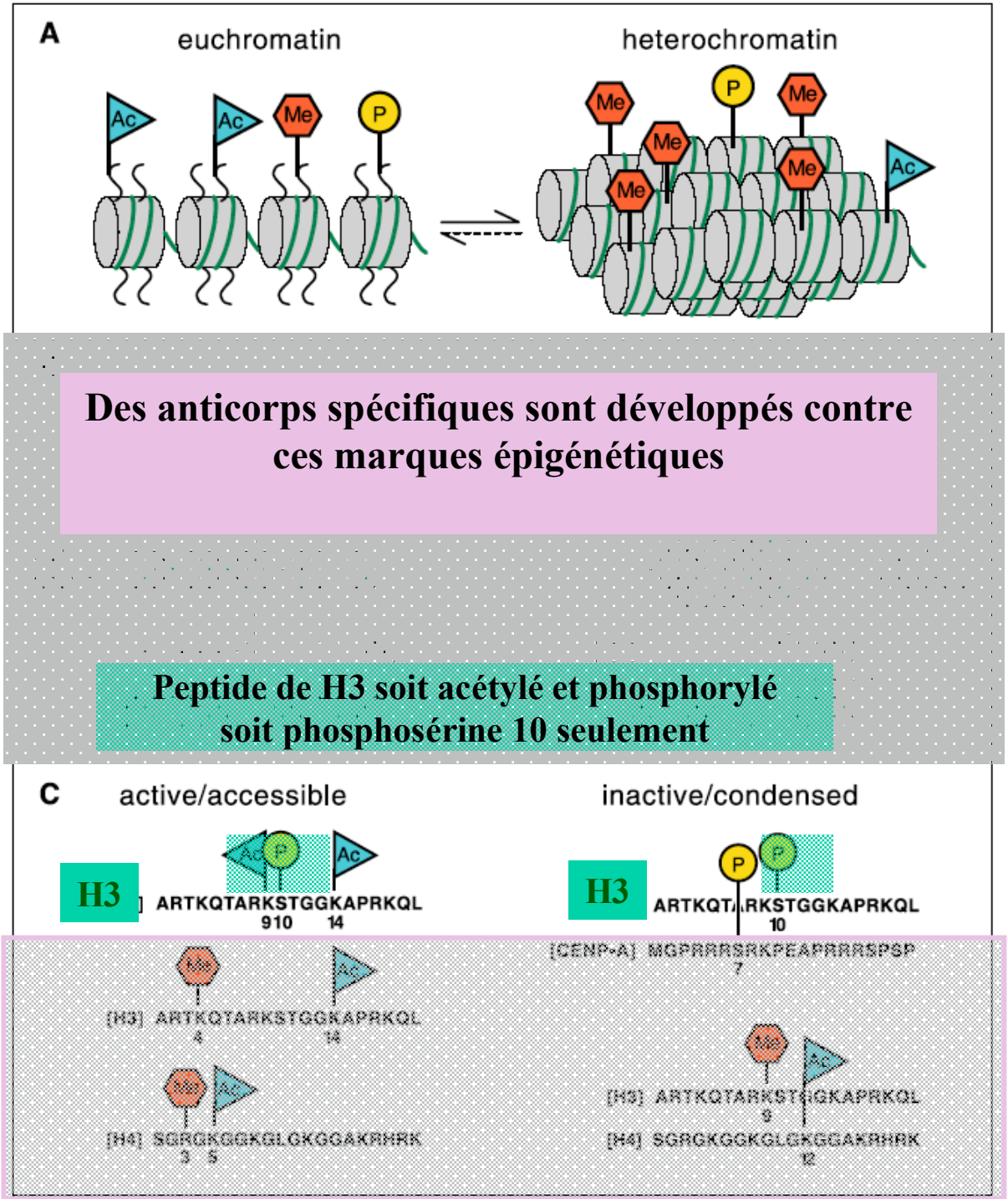


Code des histones

La combinat

La combinatoire des modifications des histones dans le génome définit un état précis de la cellule




A
euchromatin
heterochromatin
Ac
Ac
Me
P
Me
Me
P
Me
Me
Me
Ac
Des anticorps spécifiques sont développés contre ces marques épigénétiques
Peptide de H3 soit acétylé et phosphorylé soit phosphosérine 10 seulement
C
active/accessible
inactive/condensed
H3
ARTKQTARKSTGGKAPRKQL
9 10 14
H3
ARTKQTARKSTGGKAPRKQL
10
[CENP-A] MGPRRRSRKPEAPRRRSPSP
7
[H3] ARTKQTARKSTGGKAPRKQL
4 14
[H4] SGRGKGGKGLGKGGAKRHRK
3 5
[H3] ARTKQTARKSTGGKAPRKQL
9
[H4] SGRGKGGKGLGKGGAKRHRK
12

Exemple : Sérine 10 phosphorylée dans l'histone H3,Lysine 9 non modifiée dans chromosomes condensés

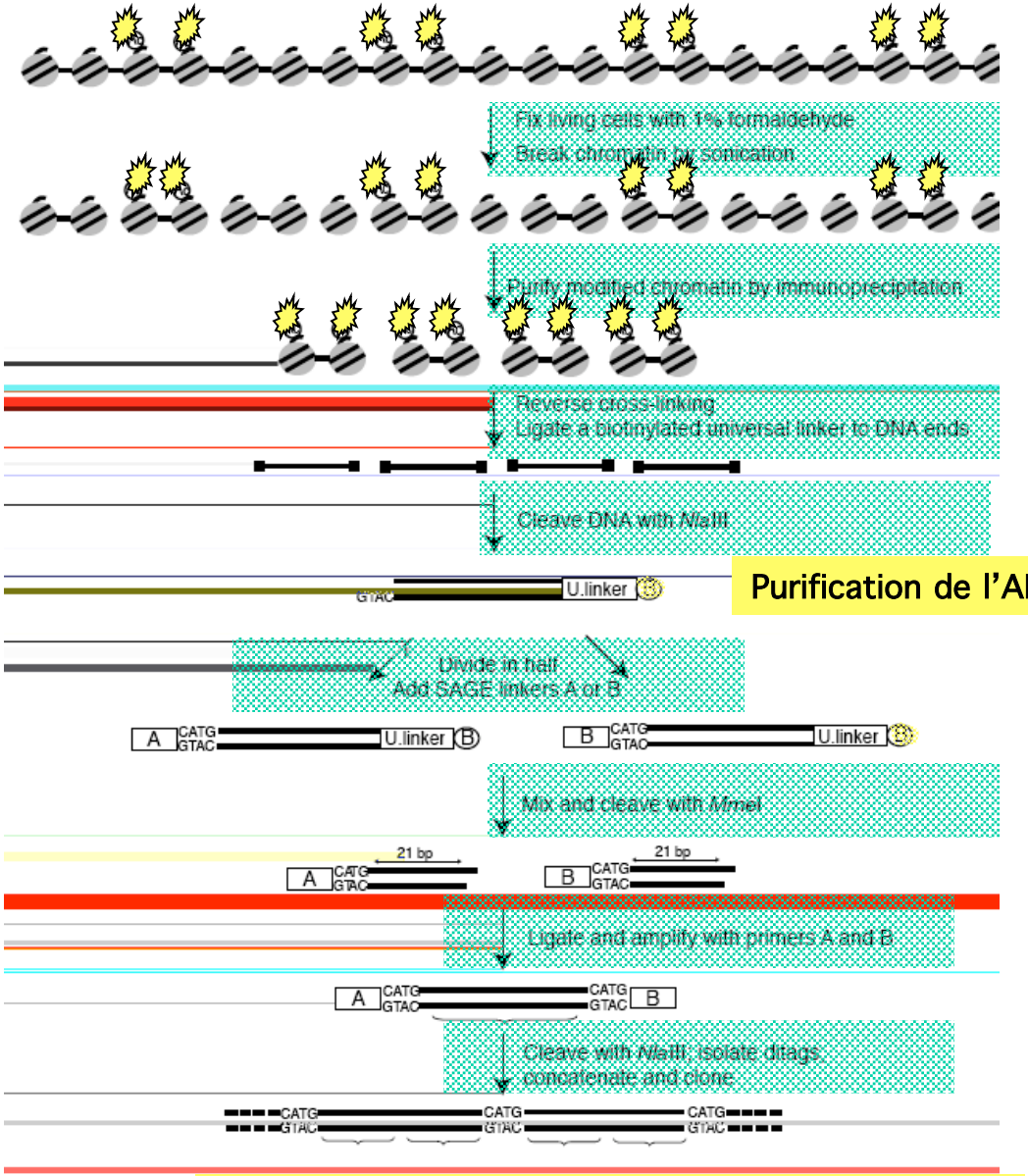
marqueur de la mitose et de la méiose

Exemple tiré de nos travaux

Image non publiée, enlevée

Embryon de drosophile doublement marqué par un anticorps anti tubuline et un anticorps anti phosphoshistone H3

Identification de séquences génomiques portant des marqueurs spécifiques d'un état de la chromatine : GMAT



Immunoprécipitation avec un anticorps dirigé contre un épitope d'histone modifiée

Purification de l'ADN sur billes couplées à la streptavidine

Clonage : banque GMAT....sonde pour microarray

GMAT : Genome wide MApping Technique
SAGE : Serial Analysis of Gene Expression
CHIP :CHromatin ImmunoPrecipitation

	Description	Tested Applications	Species Reactivity	Cat. #	Pack Size	Pos. Cntrl.	Price
Histone H3							
P Ac	Anti-acetyl (Lys27)-phospho (Ser28)-Histone H3, cl. D2W	WB RIA	WR	05-896	100 µl		$319
P	Anti-phospho-Histone H3 (Thr3)	WB IF	H	07-424	100 µl		$299
P	Anti-phospho-Histone H3(Ser10), biotin conjugate	WB ICC	H	16-189	100 µg		$339
P	Anti-phospho-Histone H3 (Thr3), clone JY325	WB DB BD	H	05-746	100 µg		$319
P	Anti-phospho-Histone H3 (Ser10), clone 3H10	WB ICC IF FC	H	05-806	100 µg		$299
P	Anti-phospho-Histone H3 (Ser10), clone 3H10, Cy5 conj.	WB IF	WR	16-218	100 assays		$339
P	Anti-phospho-Histone H3 (Ser10), clone 3H10, FITC conj.	WB IF	H	16-222	100 assays		$319
P	Anti-phospho-Histone H3 (Ser10), clone MC463	WB ICC IF ChIP	H	05-817	100 µl		$299
P	Anti-phospho-Histone H3 (Ser10), clone MC463, FITC conj.	WB IF	H	16-223	100 µg		$319
P	Anti-phospho-Histone H3 (Ser10), clone RR002	WB ICC IHC	H Ce WR	05-598	200 µg		$309
P	Anti-phospho-Histone H3 (Ser10), Mitosis Marker	WB IP ICC IHC FC	WR	06-570	200 µg		$299
P	Anti-phospho-Histone H3 (Thr11), clone MC83	WB BD	H	05-789	100 µl		$319
P	Anti-phospho-Histone H3 (Ser28)	WB ICC	Eu	07-145	200 µl		$299
P Ac	Anti-phospho (Ser10)-acetyl (Lys14)-Histone H3	WB ICC ChIP	Eu	07-081	100 µl		$324
P Me	Anti-phospho (Thr3)-monomethyl (Lys4) Histone H3	WB	H	07-554	100 µl		$299
P Me	Anti-phospho-trimethyl (Thr3/Lys4 & Thr22/Lys23) Histone H3, clone MVD336		H	05-748	100 µg		$319
Me P	Anti-monomethyl-phospho-(Lys9/Ser10 & Lys27/Ser28) Histone H3	WB DB	H	07-578	100 µl		$289
Me P	Anti-trimethyl-phospho (Lys9/Ser10 & Lys27/Ser28) Histone H3	WB DB BD	H WR	07-527	100 µl		$289
Me P	Anti-trimethyl-phospho (Lys9/Ser10 & Lys27/Ser28) Histone H3, clone NL35	WB DB BD	H	05-788	100 µl		$319
P Ac	Phospho (Ser10)-acetyl (Lys14)-Histone H3 Peptide, biotin conjugate		EA	12-426	100 µg		$149
P	Phospho (Ser10)-Histone H3 Peptide, biotin conjugate		EA	12-427	100 µg		$149
P Ac	Phospho (Ser10)-acetyl (Lys9/14)-Histone H3 Peptide, biotin conjugate		EA	12-428	100 µg		$149

Exemples d'anticorps disponibles chez Upstate pour les modifications de l'histone H3- y compris combinaison de modications

Nature Genetics 37, 391 – 400 (2005)

Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer

Mario F Fraga1, Esteban Ballestar1, Ana Villar-Garea1, Manuel Boix-Chornet1, Jesus Espada1, Gunnar Schotta2, Tiziana Bonaldi3, Claire Haydon4, Santiago Ropero1, Kevin Petrie1, N Gopalakrishna Iyer5, Alberto Pérez-Rosado6, Enrique Calvo7, Juan A Lopez7, Amparo Cano8, Maria J Calasanz9, Dolors Colomer10, Miguel Ángel Piris6, Natalie Ahn4, 11, Axel Imhof3, Carlos Caldas5, Thomas Jenuwein2 & Manel Esteller1