

Marquage TMT (*Tandem Mass Tag*) du protéome total et de phosphopeptides

Résumé de la procédure :

Lyse Urée 8M (minimum 1 mg de protéines totales)



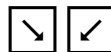
Enlever les ponts disulfures



Séparer l'échantillon



| Protéome Total | Enrichissement de phosphopeptides |
|---|---|
| Digestion à la trypsine. Congeler l'échantillon. | Digestion à la trypsine. |
| | Purification des peptides (colonnes C18). Quantification des peptides totaux. |
| | Purification des phosphopeptides (billes TiO ₂). Quantification des phosphopeptides. |



Marquage TMT



Quantification des peptides



Analyse MS

Marquage TMT (*Tandem Mass Tag*) du protéome total et de phosphopeptides

Utiliser des tips filtrés en tout temps et des tubes *Low Binding* le plus possible, sinon des tubes stériles (Falcon 15mL et 50mL si besoin). Toutes les solutions sont faites avec de l'eau MS Grade.

Réactifs

PBS 1X froid (commercial si possible) ;

Urée 8M, Hepes 10mM pH7.5 ;

TEAB 100mM ; TEAB 50mM ;

TCEP 200mM (40µL TCEP 0,5M/40µL H₂O MS/20µL TEAB 1M) ;

CIAA 375mM (40µL de TEAB 100mM dans 25µL de CIAA 1M, des aliquots de 25µL de CIAA 1M sont disponibles ainsi que du CIAA en poudre si besoin. Faire le stock 1M avec de l'H₂O MS puis le CIAA 375mM avec du TEAB 100mM) ;

Trypsine à 1µg/µL ;

Acétone 100% réfrigérée à -20°C ;

Acétonitrile 100% ;

TFA 100% ; TFA 0,1% ;

Tampon d'éluion (colonnes et zip-tips) : acétonitrile 50%/acide formique 1% ;

Acide formique 100% ; acide formique 2% ; acide formique 1% ;

Hydroxylamine 5% (solution commerciale à 50% à diluer 1/10 avec de l'H₂O MS).

Préparation d'extraits de protéines de cellules entières

1. Cultiver les cellules pour obtenir entre 1mg et 6mg environ de protéines par condition (6mg ≈ 1 pétri 150cm).
2. Rincer 3 fois les cellules avec du PBS 1X froid (PBS 1X commercial si possible).
3. Récolter dans 5mL de PBS 1X froid (PBS 1X commercial si possible).
4. Centrifuger 5 minutes à 500 x g à 4°C puis retirer le surnageant.
5. Lyser les cellules avec 1,35mL d'urée 8M/Hepes 10mM. Soniquer 12 fois 5 sec, (1min / pulse ON 5sec / pulse OFF 5 sec) intensité 20-25% (soniquer jusqu'à ce que l'échantillon soit moins visqueux et homogène).
6. Centrifuger 16 000 x g pendant 10min à 4°C et transférer le surnageant dans un nouveau tube.
7. Déterminer la concentration protéique par dosage BCA.
8. Transférer 1mg (*ou* 500µg) par condition dans un nouveau tube 2mL.

Attention, plus tard, la concentration d'urée doit être diminuée à 2M. Il est donc important de connaître la concentration d'urée dans les échantillons et qu'elle soit la même partout. Ajuster les quantités d'urée tel que dans l'exemple suivant :

Si dans l'échantillon le moins concentré 1mg de protéines totales = 600µL, ajuster les volumes des autres échantillons à 600µL d'urée. Exemple : 1mg = 550µL, ajouter 50µL d'urée 8M. Faire de même pour tous les échantillons et passer à l'étape suivante.

9. Diminuer la concentration d'urée à 2M avec du TEAB 100mM.

Dans l'exemple précédent, le volume final adéquat pour [urée] = 2M serait de 2,4mL.

10. Ajouter du TCEP 200mM (120µL pour un volume final de 2,4mL).
11. Incuber l'échantillon 1h à 55°C.

NB : il est plus facile de travailler avec 500µg de protéines totales pour que l'échantillon rentre dans un eppendorf 1,5mL et puisse être incubé dans des blocs chauffants.

12. Séparer l'échantillon : en prélever 50µL (25µg de protéines totales) qui seront marquées au TMT pour le protéome total ; et en prélever 1mL (500µg de protéines totales) duquel sera purifié les phosphopeptides.

| Pour l'enrichissement de phosphopeptides | Pour le marquage du protéome total |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> Ajouter 50µL de ClAA 375mM au 1mL. Incuber 30min à l'obscurité à T°P. <p><u>Digestion :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> Ajouter 5µg (5µL) de trypsine. Digérer l'échantillon à 30°C avec agitation, sur la nuit. | <ul style="list-style-type: none"> Ajouter 2,5µL de ClAA 375mM aux 50µL. Incuber 30min à l'obscurité à T°P. Ajouter 6 volumes d'acétone pré-réfrigéré (-20°C) : 315µL/échantillon. Laisser la précipitation se poursuivre pendant au moins 4h (ou sur la nuit) à -20°C. Centrifuger les échantillons à 8 000 x g pendant 10min à 4°C. Retourner avec précaution les tubes pour enlever le surnageant (acétone) sans remuer le culot blanc. Laisser le culot sécher pendant 2-3min (ou jusqu'à ce que ce soit complètement sec). Resuspendre les échantillons dans 50µL de TEAB 50mM. <p><u>Digestion :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> Ajouter 0,625µg (0,6µL) de trypsine. Digérer l'échantillon à 30°C avec agitation, sur la nuit. |

Purification des peptides

Les échantillons « totaux » sont placés à -20°C jusqu'au marquage TMT puisque tous les échantillons sont marqués en même temps. La purification des peptides ici ne concerne que les échantillons « phospho ».

Utiliser les colonnes HYPERSEP C18, 100mg / 1mL (Thermo Scientific, cat : 60108-302). NB : vous pouvez accélérer le débit de la colonne en poussant doucement de l'air à l'aide d'une pipette P1000 et d'un tip filtré.

1. Acidifier l'échantillon à une concentration finale de 0,2% TFA.
2. Faire passer 3 fois 1mL d'acétonitrile 100% (wetting).
3. Faire passer 3 fois 1mL de 0,1% TFA (équilibre).
4. Faire passer votre échantillon 3 fois dans la colonne à un débit d'environ 0,5-1mL/min (en collectant l'éluat et en le remettant sur la colonne).
5. Faire passer 3 fois 1mL de 0,1% TFA (lavage).
6. Éluer une première fois avec 500µL de tampon d'élution acétonitrile 50%/acide formique 1% (débit d'environ 0,5-1mL/min). Récolter dans un tube *Low Binding*.

7. Éluer une seconde fois avec 500µL de tampon d'éluat, récolter dans un second tube *Low Binding*. Reprendre l'éluat de la deuxième élution et le repasser sur la colonne. Récolter dans le 1^{er} tube contenant le 1^{er} éluat.
8. Sécher par speedVac.
9. Resuspendre l'éluat dans 100µL de 2% acide formique en vortexant vigoureusement. Il est conseillé de laisser les échantillons se resuspendre quelques minutes en vortexant vigoureusement de temps à autre.
10. Quantifier la quantité de peptides au NanoDrop en utilisant l'absorbance à 205nm (coefficient d'extinction molaire : 31 mg/mL, pathlength : 1cm, baseline correction 340nm) (A205 Custom Method for protein and peptide quantification, protocol from Thermo Scientific on the WEB). Typiquement, vous devriez obtenir 2,5-3,5µg/µL de concentration de peptides.
11. Après quantification, ajouter 400µL d'acétonitrile 100% et 8µL d'acide formique 100% (concentration finale : 80% acétonitrile, 2% acide formique, 500µL). Vortexer vigoureusement.

Purification des phosphopeptides

Utiliser Pierce Magnetic titanium dioxide phosphopeptide enrichment kit, cat : 88811 ou 88812).

Préparer les solutions de Binding et Washing (incluses dans le kit) : pour chaque échantillon de 500µL, préparer :

- 8mL d'une solution 1:1 d'acétonitrile 100%:binding buffer
- 1mL d'une solution 1:1 d'acétonitrile 100%:washing buffer.

Préparation des billes :

1. Pour chaque échantillon ($\approx 300\mu\text{g}$), mélanger 30µL de billes 20X TiO₂ (environ 1µL de billes/10µg de protéines totales) avec 970µL de solution de Binding et mettre 1mL de la solution billes/Binding dans un tube *Low Binding*. **Bien mélanger les billes avant de prendre votre aliquot pour assurer l'homogénéité.**
2. Séparer les billes en utilisant un *rack* magnétique. Enlever le surnageant.
3. Ajouter rapidement 1mL de solution de Binding pour resuspendre les billes. Ne pas faire de *up and down*. Séparer les billes en utilisant un *rack* magnétique. Enlever le surnageant.
4. Répéter 2 autres fois.

Ajout des peptides :

5. Ajouter aux billes votre 500µL d'échantillon. Bien mélanger. Incuber 15min à T°P en mélangeant de temps à autre, pour que les phosphopeptides se lient correctement aux billes. Séparer les billes en utilisant un *rack* magnétique. Enlever le surnageant.
6. Ajouter rapidement 1mL de solution de Binding pour resuspendre les billes. Ne pas faire de *up and down*. Séparer les billes en utilisant un *rack* magnétique. Enlever le surnageant.
7. Répéter 3 autres fois.
8. Ajouter rapidement 1mL de solution de Washing pour resuspendre les billes. Ne pas faire de *up and down*. Séparer les billes en utilisant un *rack* magnétique. Enlever le surnageant.
9. Ajouter 150µL du tampon d'éluat. Bien mélanger les billes. Incuber 10min à T°P. Séparer les billes en utilisant un *rack* magnétique. Récolter l'éluat et transférer dans un tube *Low Binding*.
10. Sécher par speedVac.
11. Resuspendre les phosphopeptides dans 55µL de TEAB 50mM. Il est conseillé de laisser les échantillons se resuspendre quelques minutes en vortexant vigoureusement de temps à autre.
12. Vous pouvez quantifier les phosphopeptides au NanoDrop en utilisant l'absorbance à 205nm comme précédemment. Typiquement vous devriez obtenir 2,5-3,5µg de phosphopeptides totaux.

Étiquetage peptidique (marquage TMT)

Le kit de marquage permet de marquer 100µg de protéines mais il est possible de marquer une quantité moindre de protéines en divisant les volumes. Les volumes ici ont été divisés par 4 pour 2 séries d'échantillons « totaux » (qui étaient stockés à -20°C jusqu'à maintenant) avec les 2 échantillons « phospho » correspondants :

4*6 réactions, 25µg de protéines totales OU 2,5-3,5µg de phosphopeptides dans chaque échantillon de 50µL.

1. Immédiatement avant utilisation, équilibrez les réactifs TMT à T°P.
2. Pour 0,8mg de réactif TMT, ajoutez 41µL d'acétonitrile 100%.
3. Laisser le réactif se dissoudre pendant 5min avec des vortex occasionnels.
4. Centrifuger brièvement le tube pour recueillir la solution.
5. Ajouter avec précaution 10,25µL de réactif TMT à chaque échantillon de 50µL.
6. Incuber la réaction pendant 1h à T°P.
7. Ajouter 2µL d'hydroxylamine 5% à l'échantillon.
8. Incuber pendant 15min pour quencher la réaction.
9. Combiner les échantillons.

Il devrait rester ici 4 échantillons : 2 échantillons « totaux » ainsi que les 2 échantillons « phospho » correspondants.

10. Séparer en 3 échantillons (100µL = 50µg par échantillon « total » = 2,5-3,5µg par échantillon « phospho »). Sur les 3 aliquots, 2 peuvent être conservés à -80°C. Passer à l'étape suivante avec un seul aliquot.
11. Sécher par speedVac.
12. Resuspendre dans 300µL de TFA 0,1%. Il est conseillé de laisser les échantillons se resuspendre quelques minutes en vortexant vigoureusement de temps à autre.
13. Zip-tip (100µL) :

Avant de commencer les zip-tips :

-Préparer les solutions nécessaires (acétonitrile, TFA 0,1% et tampon d'éluion) ainsi que des aliquots de ces solutions dans des eppendorf 1,5mL afin de travailler avec de plus petits volumes.
-Préparer les tubes de lavages et d'éluion ainsi qu'un béccher de récupération des solutions à éliminer.
-Placer les eppendorf dans un *rack* dans l'ordre d'utilisation des solutions pour ne pas se tromper.
-NB : il est important de ne pas faire passer d'air dans les *tips* une fois l'expérience commencée.
Attention à ne pas relâcher le pouce de la pipette entre chaque étape.

- Faire passer 3 fois 100µL d'acétonitrile 100% dans le *tip* en jetant la solution après chaque passage (hydratation).
- Faire passer 3 fois 100µL de 0,1% TFA dans le *tip* en jetant la solution après chaque passage (équilibration).
- Faire passer 100µL de votre échantillon dans le *tip* et faire 10 *up and down* avec ces 100µL. Répéter 2 autres fois (pour passer les 300µL d'échantillon dans le *tip*).
- Faire passer 3 fois 100µL de 0,1% TFA dans le *tip* en jetant la solution après chaque passage (lavages).
- Éluer une première fois avec 100µL de tampon d'éluion 50% acétonitrile/1% acide formique en faisant 10 *up and down* et récolter dans un tube *Low Binding*. Répéter 2 autres fois en mélangeant les 3 éluats.

14. Sécher par speedVac.
15. Resuspendre dans 50 μ L d'acide formique 1%. Il est conseillé de laisser les échantillons se resuspendre quelques minutes en vortexant vigoureusement de temps à autre.
16. Quantifier les peptides comme précédemment et transférer dans des vials pour analyse au MS.