

THE "RECOMBINANT PROTEINS" TECHNICAL PLATFORM

IS A TECHNICAL DEPARTMENT OF INEM DEDICATED TO THE PURIFICATION OF RECOMBINANT PROTEINS BY CHROMATOGRAPHY

This platform provides some equipment to allow you to carry out the production and purification of your recombinant protein, or to fractionate biological samples.

The "Recombinant proteins" technical platform is in a cold room located on **the 1st floor** of the **Necker Faculty of Medicine building**, which houses the Institut Necker Enfants Malades (INEM).

LOCATION AND CONTACT

This technical platform is under the responsibility of:

- A part-time operational manager: Emeline Pacreau, assistant engineer
Contact: emeline.pacreau@inserm.fr Tel: 01.40.61.55.06
- A Scientific Manager: Pamela Schnupf, INSERM research director
Contact: pamela.schnupf@inserm.fr

ACCESSIBLE EQUIPMENT

The material listed below is made available to users; the maintenance of the devices is for the moment ensured by the resources INEM. The purchase of consumables that are not available are the responsibility of the users (eg: disposable columns, buffers, dialysis cassettes, etc.).

- An **AKTA-FPLC PURIFICATION SYSTEM** (chromatography system with high pressure)

This system is controlled by Unicorn Software version 5.3 installed on a laptop.

A few disposable columns (ion exchange, "His6" type affinity) can be made available to users according to availability.



- Alongside the purification of recombinant proteins, chromatography equipment can also be used to fractionate biological samples (serum, tissue lysate, conditioned culture media, etc.).

- A **FRENCH PRESS**, a device that lyses bacteria at high pressure (~1,000 psi).



This step releases a soluble fraction and an insoluble fraction. The recombinant proteins over-expressed in *E. coli* are very often found in the insoluble part (inclusion body), which facilitates the subsequent purification steps but requires a suitable solubilization/renaturation protocol (i.e. "refolding").

This equipment is suitable for the lysis of large volume cultures (example: 1L of culture resuspended in 40 mL of buffer). It is not suitable for lysing small volumes of cultures.

- A **CONTINUOUS DIALYSIS SYSTEM** for the renaturation of proteins produced in insoluble form (inclusion bodies).

Insoluble proteins must first be dissolved in denaturing buffers (8M urea, 6M guanidium chloride) then renatured by progressive elimination of these denaturing agents during continuous dialysis. The "home-made" system includes a 5-liter tank equipped with an overflow, in which are placed the dialysis cassettes loaded with the protein solution to be renatured, an 8-liter fresh buffer tank, and a peristaltic pump allowing continuous dialysis.

PROCEDURE FOR USE

Anyone interested in using the platform will contact the managers in order to present their scientific project. Members of the platform are available to discuss upstream protocols and downstream results (see Discussion sheet).

The production steps upstream of the purification (bacterial cultures, verification of the production by electrophoresis, etc.) will be carried out by the users within their team (bacteriology room of the INEM available). The manipulation of the purification system will be ensured by the Assistant Engineer of the Technical Platform, except for recurring users who will follow an ad hoc training if they wish to become autonomous. Access to the platform will remain controlled.

RECOMBINANT PROTEIN PLATFORM

DISCUSSION SHEET

1- Has your protein of interest already been produced (published)?

- a. Yes: we look together, and we follow the same protocol
- b. No: see point 2

2- Does the expression plasmid exist?

- a. Yes: we attempt a "classic" production test – see point 3
- b. No:
 - i. Reflect together on a suitable expression plasmid (tags, etc.)
 - ii. You (not the platform) builds, sequences, and amplifies the vector

Nicolas Kuperwasser (SFR Genome editing platform) can probably help you

3- TESTS of analytical production:

- a. We discuss the protocol together, we help you if necessary
- b. First test in small volume (10-50 ml)
- c. SDS PAGE gel before/after induction, reducing/non-reducing (if relevant)
- d. Production analysis (to be done together)
 - i. If OK: see point 4
 - ii. If no production: we think ...

4- Production of a first preparatory batch

- a. 500-1000 ml – standard protocol or adapted according to your protein/protocol
 - i. At home (agitator available bacterial room) – we help you if needed
 - ii. Check production by SDS PAGE (same as analytical)
- b. IF OK, French press (breaking of bacteria)
 - i. By the platform (autonomy possible if recurring use)
 - ii. Separate soluble/insoluble fraction
 - iii. By you: SDS PAGE to determine if soluble or insoluble protein
 1. If insoluble: see point 5
 2. If soluble: see point 6

5- If insoluble protein:

- a. Standard denaturation protocol (urea/continuous dialysis) – we show you the first time
 - i. If protein precipitates during renaturation: we reflect...
 - ii. If protein remains soluble: proceed to purification by chromatography

6- Purification by chromatography

- a. Depending on the characteristics of what needs to be purified (volume, pH, pI of the protein, etc.), we decide on a type of column (Emeline does the purification, at least at the beginning):
 - i. Ion exchange (Q or S): above (Q) or below (S) the pI of the protein of interest
 - ii. Affinity: Tag His 6, ...
 - iii. Sieve (gel filtration): analytical test on AKTA, preparative on Gradifrac
- b. For each purification, you make an SDS PAGE of the fractions/peaks to locate the protein, define its state of purity etc.
 - i. If OK, you keep it at home (frozen, freeze-dried), then proceed to the functional tests
 - ii. If not OK: think about purification protocol, change column, etc.

LE PLATEAU TECHNIQUE "PROTEINES RECOMBINANTES" EST UN SERVICE TECHNIQUE DE L'INEM DEDIE A LA PURIFICATION DES PROTEINES RECOMBINANTES PAR CHROMATOGRAPHIE.

Ce plateau met à disposition quelques équipements pour vous permettre de réaliser la production et purification de votre protéine recombinante, ou de fractionner des échantillons biologiques.

LOCALISATION ET CONTACT

Le plateau technique « Protéines recombinantes » est dans une chambre froide située au **1^{er} étage** du bâtiment de la **Faculté de Médecine Necker, qui héberge l'INEM.**

Ce plateau technique est sous la responsabilité de :

- Une Responsable opérationnelle à temps partiel : Emeline Pacreau, assistante-ingénieure
Contact : emeline.pacreau@inserm.fr / Tél: 01.40.61.55.06
- Un Responsable Scientifique : Pamela Schnupf, directrice de recherche INSERM
Contact : pamela.schnupf@inserm.fr

LES EQUIPEMENTS ACCESSIBLES

Le matériel listé ci-dessous est mis à disposition des utilisateurs ; la maintenance des appareils est pour l'instant assurée par la mutualisation de l'INEM. L'achat des consommables qui ne seraient pas disponibles sur le plateau est à charge des utilisateurs (ex: colonnes jetables, tampons, boudins à dialyse,...).

- Un **SYSTEME AKTA-FPLC PURIFIER** (système de chromatographie à haute pression)

Ce système est contrôlé par le Logiciel Unicorn version 5.3 installé sur un ordinateur portable.

Quelques colonnes jetables (échange d'ions, affinité type "His6") peuvent être mises à disposition des utilisateurs selon disponibilité.

- 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 (i.e. "refolding").

Cet équipement est adapté à la lyse de cultures préparatives de grand volume (ex: 1L de culture resuspendu dans 40 mL de tampon). Il n'est pas adapté pour lyser des petits volumes de cultures.



- Un **SYSTEME DE DIALYSE CONTINUE** pour la renaturation des protéines produites sous forme insoluble (corps d'inclusion).

Les protéines insolubles doivent d'abord être solubilisées dans des tampons dénaturants (Urée 8M, Chlorure de guanidium 6M) puis renaturées par élimination progressive de ces agents dénaturants lors d'une dialyse continue. Le système "home-made" comprend un bac de 5 litres muni d'un trop-plein, dans lequel sont placés les boudins à dialyses chargés de la solution de protéines à renaturer, d'un réservoir de tampon frais de 80 litres, et d'une pompe péristaltique permettant la dialyse continue.

PROCEDURE D'UTILISATION

Toute personne intéressée par l'utilisation du plateau 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 en amont de la purification (cultures bactériennes, vérification de la production par électrophorèse, etc) seront réalisées par les utilisateurs au sein de leur équipe (salle bactériologie de l'INEM disponible). La manipulation du système de purification sera assurée par l'Assistante-ingénieure du Plateau technique, sauf pour des utilisateurs récurrents qui suivront une formation ad hoc s'ils souhaitent devenir autonomes. L'accès au plateau restera contrôlé.

FICHE DE DISCUSSION

1- VOTRE PROTEINE D'INTERET A-T-ELLE DEJA ETE PRODUITE DANS E. COLI (PUBLICATION)?

- a. Oui: on regarde ensemble, et on vous conseille pour reconduire 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 amplifiez le vecteur, sous-clonez, et séquencez le vecteur recombinant.
NB : Nicolas Kuperwasser (plateforme SFR Genome editing) peut sans doute vous aider dans ces étapes si besoin

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 PREPARATIF

- a. 500-1000 ml – protocole standard ou adapté selon votre protéine/protocole
 - i. Chez vous ou salle bactériologique INEM – on vous conseille si besoin
 - ii. Vérifier la production par SDS PAGE (idem production analytique)
- b. Si OK, Presse de French (cassage bactéries)
 - i. Par nous-mêmes (autonomie possible si utilisation récurrente)
 - ii. Séparer fraction soluble/ insoluble par centrifugation
 - 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 PROTEINE INSOLUBLE :

- a. Protocole de dénaturation standard (urée/dialyse continue) – on vous montre la première fois
 - i. Si la protéine précipite lors de la renaturation : on réfléchit
 - ii. Si la 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, pI 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 pI 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.