

## **EXTRACTION DES PROTEINES DE LEVURE**

### **PRINCIPE**

Plusieurs méthodes sont utilisées pour lyser des cellules de levures (pression osmotique, pression mécanique). Celle qui est présentée ici consiste à lyser les cellules de levure en présence de billes de verre et sous l'action de la chaleur. Les protéines sont par ailleurs dénaturées en présence d'un détergent, le dodécyl sulfate de sodium (SDS) qui charge négativement les protéines; cette dénaturation s'accompagne d'un traitement avec un agent réducteur comme le  $\beta$ -mercaptoéthanol ou le dithiothreitol (DTT) de façon à rompre les ponts disulfure des protéines et dissocier les sous-unités. Le nombre de molécules de SDS fixées sur une molécule de protéine dépend de sa masse moléculaire (environ 1,3 g par gramme de protéine).

### **MATERIEL**

- Tubes Eppendorf stériles de 1,5 ml et micro centrifugeuse

### **SOLUTIONS**

- Billes de verre (0,45 mm de diamètre, Glasperlen Braun Biotech International)
- Solution de Laemmli 2 X (à conserver à -20°C) :

Tris-HCl (pH 6,8)	125 mM	pour 10 ml	1,25 ml de 1 M
SDS (p/vol)	4%		2 ml de 20%
$\beta$ -mercaptoéthanol (vol/vol)	1%		100 $\mu$ l
Glycérol pur (vol/vol)	20%		2 ml
Bleu de Bromophénol (p/vol)	0,05%		50 mg

## PROTOCOLE

- Ensemencer les souches de levure dans des tubes de culture contenant 3 ml de milieu approprié (sélectif non inducteur dans le cas étudié ici). Incuber pendant la nuit à 30°C avec agitation.
- Mesurer la  $DO_{600nm}$  d'une dilution au 1/10 des cultures de la nuit.
- Centrifuger un volume correspondant à un total de 10 unités de  $DO_{600nm}$  de chaque culture pendant 5 min à 4 000 t/min.
- Resuspendre le culot dans 2 ml d'eau distillée stérile.
- Transférer en tube Eppendorf de 2,2 ml et effectuer 2 lavages en resuspendant les cellules dans 2 ml d'eau distillée stérile.
- Diluer les cellules à 1 unité de  $DO_{600nm}$  par ml dans un erlenmeyer contenant 10 ml de milieu approprié (sélectif inducteur dans le cas des TP).
- Incuber pendant 3 h à 30°C avec agitation.
- Mesurer les  $DO_{600nm}$  sur 1 ml des cultures. S'il y a différents échantillons, la même quantité de cellules (équivalent de 10 unités de  $DO_{600nm}$ ) doit être utilisée pour la suite des opérations.
- Centrifuger un volume correspondant à un total de 10 unités de  $DO_{600nm}$  de la culture pendant 5 min à 4 000 t/min.
- Effectuer 1 lavage en resuspendant les cellules à la pipette dans 1 ml d'eau distillée stérile et transférer en tube Eppendorf de 2 ml.
- Centrifuger en microcentrifugeuse quelques secondes et retirer l'eau.
- Resuspendre les cellules dans 200  $\mu$ l de solution Laemmli 2 X.
- Ajouter 100  $\mu$ l de billes de verre.

*Vérifier attentivement la fermeture des tubes Eppendorf car sous la chaleur ils peuvent s'ouvrir et la projection des billes de verre peut être dangereuse. Porter des lunettes de protection.*

- Mettre les tubes à 95°C dans un bloc chauffant pendant 3 min.
- Mélanger soigneusement les tubes au Vortex pendant 30 s.
- Remettre les tubes à 95°C dans un bloc chauffant pendant 3 min.
- Mélanger les tubes au Vortex pendant 30 s.
- Centrifuger pendant 1 min et transférer chaque surnageant dans un tube propre.
- Utiliser 10  $\mu$ l (0,5 de  $DO_{600nm}$  par puits) de la préparation pour déposer sur gel de polyacrylamide.