

Retard sur gel (EMSA) – Fiche Technique

But

L'EMSA (Electromobility Shift Assay), est une technique simple pour étudier une interaction entre un acide nucléique et des protéines. Elle permet de voir si une protéine (ou une partie d'une protéine) est capable de se fixer sur un ADN (ou un ARN) cible, ou de mettre en évidence l'existence de site de fixation pour une protéine connue dans la séquence d'un acide nucléique en cours d'étude.

Principe

Le principe de cette technique repose sur le fait qu'un complexe ADN-protéine ou ARN-protéine migrera moins vite dans un gel de polyacrylamide non-dénaturant que le même ADN ou ARN nu (c'est-à-dire seul en l'absence de la protéine) du fait d'un encombrement plus important. Ce retard de migration permet de juger au premier coup d'œil si une séquence particulière d'ADN ou d'ARN a été reconnue par une protéine qui s'y est fixée.

Afin de visualiser aisément l'acide nucléique ou le complexe ADN-protéine (ou ARN-protéine), l'acide nucléique est marqué radioactivement (autrement dit on réalise une sonde). La détection s'effectue alors à l'aide d'une autoradiographie, le complexe étant détectable car la protéine est en interaction avec la sonde radioactive. La migration est réalisée sur un gel de polyacrylamide non dénaturant, afin de préserver le complexe si celui-ci a été formé.

Limites

Lors de la mise en évidence d'un retard, il faut s'assurer que ce retard est bien dû à une interaction spécifique entre la sonde et la protéine et non simplement parce que la protéine étudiée est capable de se fixer sur n'importe quel acide nucléique, quelle que soit la séquence de ce dernier. Une expérience de compétition permet alors de vérifier la spécificité d'interaction (voir plus loin).

Remarque : l'interaction entre une protéine et un acide nucléique peut s'effectuer soit par la reconnaissance d'une séquence précise au niveau de l'acide nucléique (c'est-à-dire la nature et l'ordre d'enchaînement des nucléotides), soit par la reconnaissance d'une structure secondaire particulière (par exemple la formation de tige-boucle sur un acide nucléique simple brin), soit par les deux niveaux de structure (une séquence précise au sein d'une structure secondaire).

Étapes de réalisation

Matériel nécessaire :

- sonde ADN ou ARN correspondant à l'acide nucléique cible ;
- protéine d'intérêt purifiée (ou bien uniquement son domaine putatif de fixation à l'acide nucléique)* ;
- un gel de polyacrylamide, **non dénaturant** afin de conserver le complexe formé.

* Un retard sur gel peut également être réalisé à partir d'un extrait protéique, contenant les différentes protéines solubles d'une cellule (ou du noyau par exemple), donc non purifiées, afin de mettre en évidence l'existence d'une interaction sans connaître précisément l'acteur protéique.

- 1) Marquage radioactif de la sonde (ADN ou ARN)

Le fragment d'acide nucléique doit être marqué radioactivement (voir poly d'annexe – réalisation de sondes). Ce marquage peut ici être réalisé soit tout le long de la molécule (via la technique d'amorçage aléatoire ou par PCR pour un ADN, soit par transcription *in vitro* en présence d' α -P32 NTP pour un ARN) ou bien en marquant uniquement le fragment en extrémité 5' (voir la technique correspondante). Néanmoins, il est d'usage d'utiliser un simple marquage en 5', car ce marquage est amplement suffisant pour générer un signal fort sur l'autoradiographie et cela permet de limiter l'exposition à la radioactivité pour l'expérimentateur.

- 2) Mise en contact et obtention des complexes ADN (ou ARN) - protéine

La sonde est répartie, en quantité égale, au moins dans deux tubes.

- Dans le premier tube, aucune protéine n'est ajoutée. Ce tube constituera le témoin négatif, permettant de visualiser la migration du fragment d'acide nucléique seul, migration qui s'effectuera en fonction de sa taille ou/et de sa conformation (le gel étant non dénaturant). On utilise le terme de « sonde libre ». Il correspond à la référence de migration du fragment d'acide nucléique non fixé.

- Dans le second tube, la protéine (ou le peptide correspondant à son domaine de fixation à l'acide nucléique, ou encore l'extrait protéique) est ajoutée. C'est ce tube qui nous permettra de mettre en évidence l'existence ou non d'un éventuel complexe.

Remarque : cette étape est assez délicate, différents paramètres peuvent intervenir dans la formation du complexe acide nucléique-protéine et dans sa stabilisation, comme la température, la concentration en sels, le pH, etc.

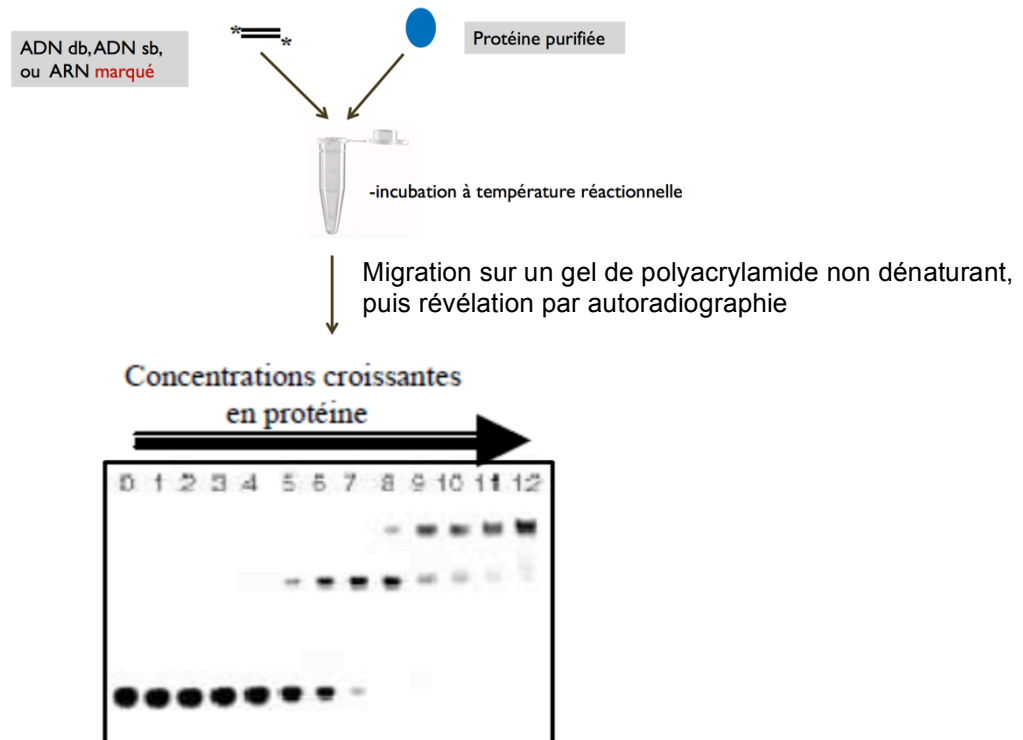
De plus, plusieurs concentrations de protéine peuvent être utilisées dans différents tubes, afin de s'assurer que l'absence éventuelle de formation d'un complexe (et donc d'un retard de migration) n'est pas dû à une quantité insuffisante de protéine, notamment dans le cas où la protéine possède une faible affinité pour la sonde. Dans ce cas, l'intensité du signal correspondant au complexe ainsi formé doit augmenter avec la quantité de protéine utilisée, avec, inversement, une diminution du signal correspondant à la sonde libre.

- 3) Migration électrophorétique en gel de polyacrylamide non dénaturant.

Le contenu de chaque tube est déposé dans les différents puits d'un même gel de polyacrylamide non dénaturant (pour conserver), puis mis à migrer. Le caractère non dénaturant est crucial puisqu'il permet de conserver les éventuels complexes formés.

- 4) Autoradiographie afin de révéler la position des sondes.

Le marquage radioactif des sondes va permettre de révéler leur position sur le gel. Les complexes formés avec la protéine seront bien évidemment révélés car ils contiennent une molécule de sonde.



L'analyse de ce retard sur gel vous est expliquée dans **La fiche Retard sur gel – Application.**

Retard sur gel - Expérience de compétition

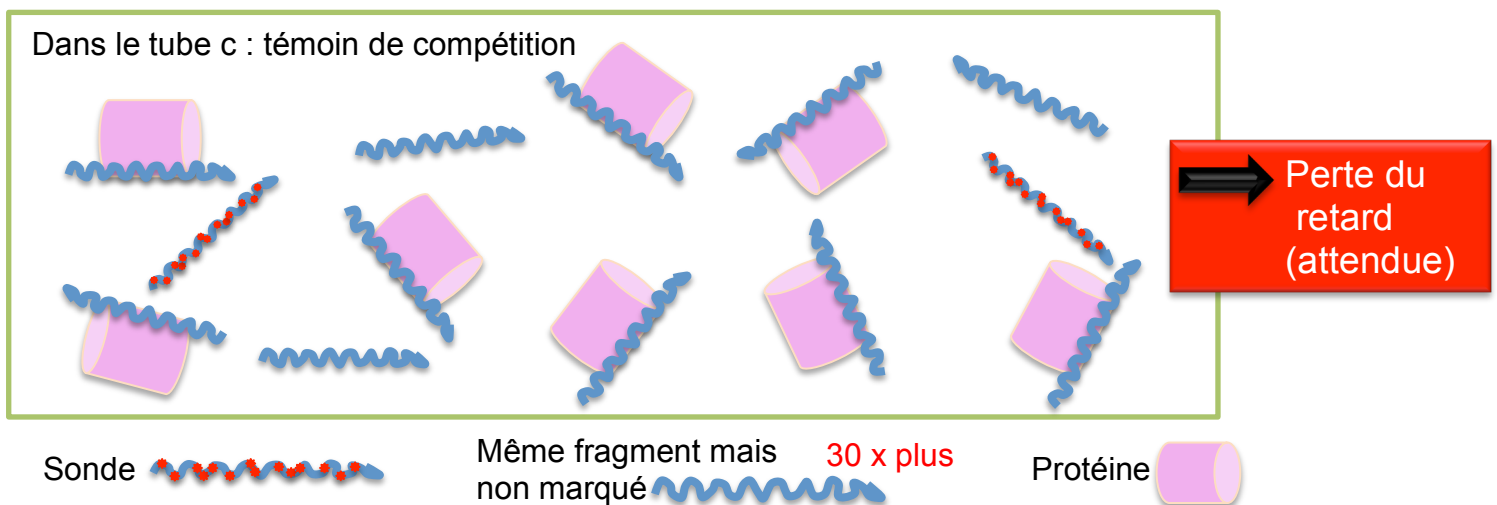
La spécificité de l'interaction acide nucléique-protéine peut être vérifiée par une expérience dite de « compétition ». Pour réaliser cette expérience, il faut 4 mélanges réactionnels, dont trois serviront de témoin :

- un mélange contenant une quantité q de sonde seule (témoin de migration de la sonde libre) ;
- un mélange contenant la même quantité de sonde plus la protéine d'intérêt (témoin migration du complexe) ;
- un mélange contenant une quantité q de sonde, la protéine et un excès de la **même molécule** d'acide nucléique utilisée pour faire la sonde **mais non radioactive** (on parle ici de compétiteur spécifique ; il s'agit du témoin de compétition) ;

d) un mélange contenant une quantité q de sonde, la protéine et un excès d'une autre molécule d'acide nucléique (différente en séquence mais de même taille) **non radioactive** (on parle ici de [compétiteur non spécifique](#) ; Il s'agit là de l'expérience de compétition proprement dite, qui nous permettra de trancher quant à la spécificité ou non d'interaction entre la protéine et la sonde).

Le mélange c) constitue donc le contrôle positif de la compétition : la version non marquée de l'acide nucléique étant en excès, la protéine va statistiquement se fixer sur ces molécules non radioactives, et ceci au détriment de la version radioactive. Les molécules de sonde étant délaissées au profit des molécules non marquées, elles ne seront alors plus retardées dans leur migration. Cela se traduira sur l'autoradiogramme par une perte du retard (les molécules marquées, dans leur majorité, redeviendront libres et migreront donc comme en a). *N.B. : bien sûr, la migration de la version non marquée sera elle retardée, mais cela ne se verra pas puisque la révélation se fait par autoradiographie et ne permet donc pas de visualiser les molécules non radioactives.*

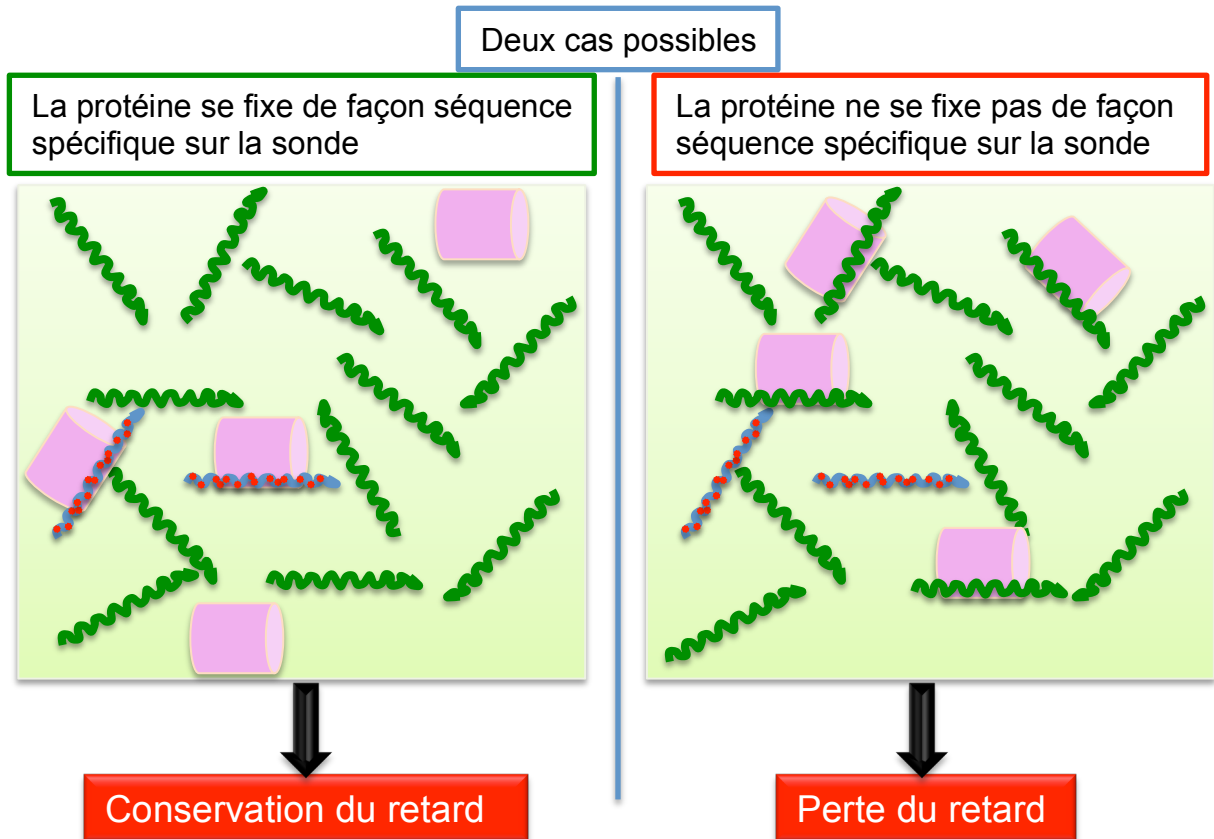
Pour pouvoir interpréter la piste d), il faut que le témoin de compétition en piste c) soit correct, c'est-à-dire qu'avec le compétiteur spécifique, aucun retard de migration ne soit mis en évidence, indiquant que la quantité de compétiteur est suffisante. Autrement dit, la bande (majoritaire) révélée en c) doit être identique à celle révélée en a).



Le mélange d) est celui qui permet de conclure véritablement à la spécificité ou non de fixation de la protéine d'intérêt sur l'acide nucléique étudié.

- Soit cette fixation est non spécifique (la protéine se fixe indifféremment sur n'importe quel acide nucléique, et ceci quelle que soit la séquence), et il se produira alors le même phénomène qu'en c). La protéine se fixera majoritairement sur l'acide nucléique compétiteur simplement car il est en excès. Il en résultera la disparition de la bande correspondant à la migration retardée de l'acide nucléique d'intérêt, c'est-à-dire une perte du retard.
- Soit cette fixation est spécifique (la séquence du fragment a de l'importance), et l'excès d'acide nucléique quelconque non marqué ne changera en rien le profil de migration. La migration de l'acide nucléique d'intérêt marqué sera donc toujours retardée car la protéine ne se fixera pas sur le compétiteur. On observera donc la conservation du retard.

Autre fragment ≠ de la sonde  30 x plus



Retard sur gel - Expérience de *supershift*

Il s'agit d'une variante de l'expérience de retard sur gel. Un anticorps reconnaissant la protéine d'intérêt est ajouté au mélange « sonde + protéine » au moment de l'incubation, puis l'ensemble est déposé sur un gel de polyacrylamide non dénaturant et une autoradiographie est réalisée après migration. En parallèle, bien sûr il faut déposer dans un puits la sonde libre et dans un second le mélange « sonde + protéine » (sans anticorps).

L'anticorps se fixant sur la protéine, elle-même fixée sur la sonde, il se forme alors un complexe ternaire Sonde-Protéine-Anticorps, plus encombrant que le complexe Sonde-Protéine. Ce complexe ternaire aura donc une migration encore plus retardée, qu'on qualifie de ***supershift***.

Cette technique est particulièrement adaptée lorsque les protéines ne sont pas purifiées (c'est-à-dire que la sonde a été incubée avec un extrait protéique) afin de mettre en évidence la protéine d'intérêt dans les complexes observés. Cette expérience est également pertinente dans le cas de complexes faisant intervenir plusieurs protéines : le *supershift* permettra alors d'identifier dans quel(s) complexe(s) sont impliqués les différents partenaires.