

## Sommaire :

- 1) Conditions Générales d'utilisation de la plateforme
- 2) Consignes d'utilisation de la plateforme
- 3) Requis PAOL : colonnes, échantillons, tampons ...

## **1) Conditions Générales**

- Seuls les échantillons biologiques non pathogènes sont acceptés. Arrêté du [18 juillet 1994](#) fixant la liste des agents biologiques pathogènes, modifié par les arrêtés du [17 avril 1997](#) et du [30 juin 1998](#). La liste des [agents biologiques pathogènes](#) est disponible sur le site internet de l'IPBS.
- La plateforme est ouverte aux académiques, qui usuellement devront se former à l'analyse des données. Elle est également ouverte aux industriels et académiques pour la réalisation par la plateforme d'études incluant les analyses, selon la disponibilité de l'équipement et du personnel.
- Un demandeur pourra utiliser par lui-même l'équipement, après une formation imposée, à renouveler tous les 3 mois. Il s'engage à suivre et à respecter les consignes d'utilisation (partie 2). En cas de manquement, l'utilisateur pourra être exclu.
- Le demandeur est responsable de ses échantillons, qui ne seront pas conservés (sauf demande expresse).
- Le système PAOL est connecté au réseau interne de l'IBS pour faciliter l'impression et la sauvegarde des résultats. Les données générées sont archivées pendant 3 ans. Passé ce délai, les données seront supprimées sans préavis.
- La plateforme ne garantit pas la confidentialité des données (sauf demande expresse).
- L'utilisateur s'engage à citer la plateforme dans les remerciements en cas de publication : "This work used the platforms of the Grenoble Instruct centre (ISBG; UMS 3518 CNRS-CEA-UJF-EMBL) with support from FRISBI (ANR-10-INSB-05-02) and GRAL (ANR-10-LABX-49-01) within the Grenoble Partnership for Structural Biology (PSB). We thank Aline Le Roy, and/or Michel Thépaut and/or Christine Ebel, for assistance and/or access to the Protein Analysis On Line (PAOL) platform" et à communiquer la référence de l'article aux responsables de la plateforme.
- Le personnel de la plateforme est co-auteur s'il participe à la rédaction des articles.

## **2) Consignes d'utilisation**

### **Procédures**

- Les utilisateurs (confirmés ou non) prennent contact avec la plateforme via la demande d'analyse. Suite à une discussion, les conditions expérimentales et le planning sont décidés. La plateforme ne fonctionne pas le weekend.
- Les conditions requises pour les expériences (échantillons, tampons, colonnes ...) sont décrites en partie 3 et doivent être vérifiées pour chaque expérience.
- En cas de problème en cours de manipulation, vous devez tenir le personnel de la plateforme informé et remplir une fiche anomalie.
- Pour chaque expérience, une fiche Acquisition des données PAOL doit être remplie :
  - Noter le détail de l'expérience.
  - Noter les valeurs des contrôles quotidiens.
  - Noter les anomalies s'il y a lieu.

### **Documents**

- Les protocoles d'utilisation du système PAOL sont disponibles sur place.
- Les manuels de référence des logiciels utilisés (LC Solution, ASTRA, Dynamics) sont consultables sur place.

### **Utilisateurs autonomes**

- Les procédures décrites ici font partie de celles enseignées pendant la **formation obligatoire**. Les documents correspondants sont mis à votre disposition.
- À la fin de chaque expérience, vous devez :
  - Mettre les colonnes en H<sub>2</sub>O, 0.3g/L NaN<sub>3</sub>.
  - S'assurer du bon arrêt de l'expérience : est-ce vous ou le local contact qui arrêtez le système ?
  - Sauvegarder vos données sur l'espace de stockage de la plateforme (Partages). Il est possible de faire une copie sur votre clé USB.

### 3) Requis PAOL (Copie du protocole « Prot\_colonnes »)

➤ Les colonnes disponibles avec le système PAOL sont :

Colonne	Fournisseur	Gamme de separation (kDa)	Résine	dimension colonne DxL (mm)	Buffer pH	Injection µl	Tampon de stockage
PROTEIN KW-804	Shodex	until 1 000	Silice 7 µm	8.0 x 300	3 – 7.5	20	H <sub>2</sub> O, 0.3g/L NaN <sub>3</sub>
PROTEIN KW-803	Shodex	until 700	Silice 5 µm	8.0 x 300	3 – 7.5	20	H <sub>2</sub> O, 0.3g/L NaN <sub>3</sub>
PROTEIN KW-802.5	Shodex	until 150	Silice 5 µm	8.0 x 300	3 – 7.5	20	H <sub>2</sub> O, 0.3g/L NaN <sub>3</sub>
PROTEIN KW-G	Shodex	Guard column		6.0 x 50			H <sub>2</sub> O, 0.3g/L NaN <sub>3</sub>
Superdex 200 10/300 GL	GE Healthcare	10 – 600	cross-linked agarose and dextran 13 µm	10 x 300	3 – 12	100	20% Ethanol
Superose 6 10/300 GL	GE Healthcare	5 – 5000	cross-linked agarose 13 µm	10 x 300	3 – 12	100	20% Ethanol
Superdex 75 10/300 GL	GE Healthcare	3 – 70	cross-linked agarose and dextran 13 µm	10 x 300	3 – 12	100	20% Ethanol
WTC 050N5	Wyatt	15 - 5 000	Silice 5 µm	4.6 x 300		30	20% Ethanol
WTC 050N5G	Wyatt	Guard column		6.0 x 50			20% Ethanol

\* Cf. Protocole : « Tampons et Solvants PAOL »

➤ Les précautions d'utilisation des colonnes sont :

- Un débit entre 0.2 et 0.5 ml/min (en standard : 0.5ml/min)
- Les changements de débit (arrêt des pompes) doivent se faire progressivement
- Toujours précédées d'une colonne de garde sauf pour les superdex et superose
- Le tampon d'élution doit :
  - o Avoir un pH adapté à la colonne utilisée (voir tableau ci-dessus)
  - o Contenir 0.3 g/L NaN<sub>3</sub> (durée de vie = 8jours) **ATTENTION : NaN<sub>3</sub> = POISON=protections**
  - o Contenir au moins 100 mM sel
  - o Etre filtré à 0.1 µm

Tampon standard utilisé = PBS : 30mM Na Phosphate pH 6.8, 100 mM NaCl, 0.3 g/L NaN<sub>3</sub>

➤ Les nouvelles colonnes de silices doivent être éluées, pendant 1 semaine, avec le Tampon H<sub>2</sub>O, à 0.5 ml/min.

➤ Passage en tampon H<sub>2</sub>O pour toutes les colonnes, avant et après chaque utilisation (car réaction possible entre alcool et sels)

➤ L'échantillon doit être centrifugé 5-10 min avec l'Airfuge (Cf. protocole : Airfuge) ou filtré à 0.1µm. Pour les échantillons sensibles à la température, la centrifugation peut se faire à 13000xg pendant 30min.

➤ Pour les protéines membranaires, le tampon d'élution contient du détergent. Il est donc nécessaire d'équilibrer la colonne avec du tampon d'élution sans détergent pendant 1 à 2 jours puis avec détergent pendant 3 h, avant les injections.

**DATE ET VISA DU RESPONSABLE APPAREIL : 13/05/2013; C. EBEL AND ALINE LE ROY**

