

Denis DEZEST  
[ddezest@laas.fr](mailto:ddezest@laas.fr)



les 14/11/11 et 16/11/11  
08h30-12h00 13h30-15h à l'AIME



## 5<sup>ème</sup> ANNEE INSA DEPARTEMENT GENIE PHYSIQUE OPTION NANOBIO

### TRAVAUX PRATIQUES SUR LA QCM (*Quartz Crystal Microbalance*)

#### I. OBJECTIFS

Le principal objectif de ce TP est de découvrir le fonctionnement et l'utilisation de la microbalance à quartz à travers une expérience illustrant le principe de reconnaissance spécifique intervenant dans la détection de molécules biologiques. A cet effet, deux interactions de type antigène-anticorps spécifiques et antigène-anticorps non spécifiques seront réalisées. L'antigène choisi pour servir de molécule « sonde » est une protéine GST (*Gluthatione S-Transferase*).

#### II. PRINCIPE

La microbalance à quartz est une technique de biodétection sensible capable de mesurer des changements de masse de l'ordre du nanogramme à la surface d'un capteur résonant. Elle repose sur le principe de la piézoélectricité, via l'utilisation d'un cristal de quartz pris « en sandwich » entre deux électrodes conductrices. Sous l'action d'une polarisation extérieure, le matériau piézoélectrique va se déformer (effet piézoélectrique inverse) et entrer en oscillations. Dans le cas d'une excitation non entretenue, le retour du résonateur à sa position d'équilibre se fait à travers une série d'oscillations libres détectées électriquement par effet piézoélectrique direct. La fréquence  $f$  de résonance ainsi que l'amortissement  $Q$  du résonateur sont alors déduits et permettent de remonter non seulement à la masse adsorbée sur le cristal mais également aux propriétés mécaniques (élasticité) de la couche adsorbée.

#### III. PROTOCOLE :

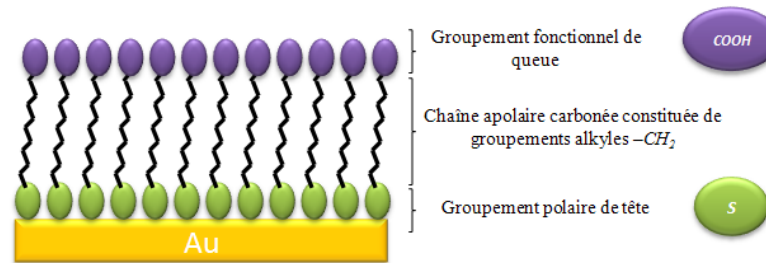
##### 1. *Fonctionnalisation de l'or par une monocouche auto-assemblée de thiols*

Cette étape vise à fonctionnaliser la couche d'or du capteur de quartz à l'aide de thiols via la formation d'une monocouche auto-assemblée (SAM pour *Self-Assembled Monolayer*) par incubation.

Le groupement de tête  $-SH$  interagit de manière covalente avec l'or selon la réaction :



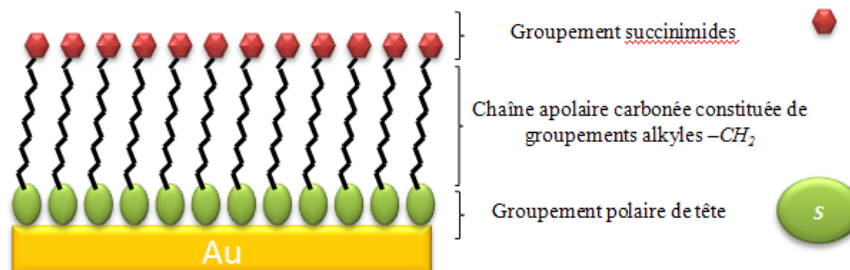
Le groupement fonctionnel de queue  $-COOH$  constituera un site d'accueil privilégié, après activation, pour l'accroche covalente des molécules biologiques « sondes ».



- Immersion du cristal de quartz pendant une nuit dans une solution de 5mM de 11-Mercapto-Undecanoic Acid avec pour solvant de l'éthanol
- Nettoyage et rinçage à l'éthanol et à l'eau DI

## 2. Activation du groupement $-COOH$ par le couple NHS/EDC

L'activation consiste en une réaction chimique avec le couple NHS/EDC, qui va remplacer la partie hydroxyle  $-OH$  des groupements fonctionnels carboxyles  $-COOH$  par des groupements succinimides, nécessaires à la réaction d'accroche des molécules « sondes » de GST.



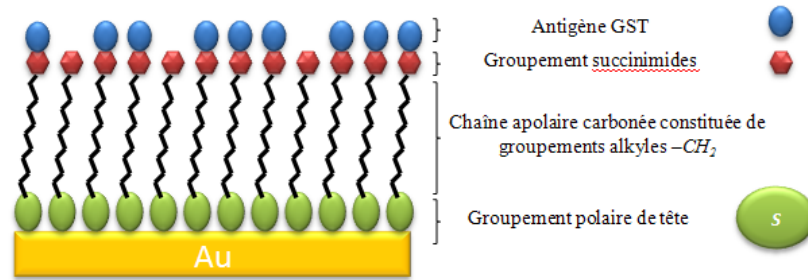
**NHS** : N-HydroxySuccinimide

**EDC** : N-Ethyl-N'-(3-Diméthylaminopropyl)Carbodiimide)

- NHS dans tampon HEPES : 100mM
- EDC dans tampon HEPES : 400mM
- Passage solvant HEPES 10mM, débit 130  $\mu$ L /min. Attente stabilisation.
- Mélanger les deux solutions NHS et EDC avant injection.
- Passage solution NHS/EDC. Durée d'interaction : 20min. Attente stabilisation.

## 3. Immobilisation des « sondes » GST

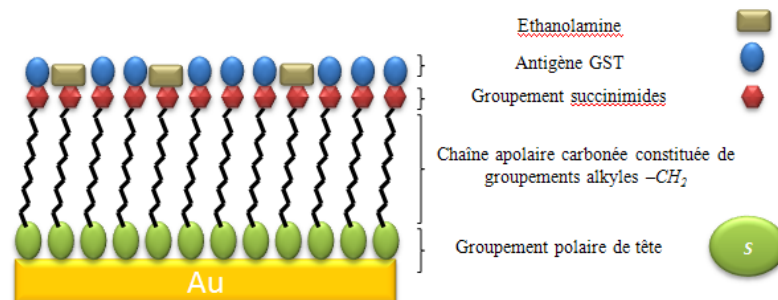
L'accroche des antigènes GST s'effectue via le groupement amine  $-NH_2$ .



- Préparation de GST dans tampon PBS 1x (*Phosphate Buffered Saline*) 200 $\mu$ g/mL.
- Passage solution tampon PBS 1x, débit 130 $\mu$ L/min. Attente stabilisation.
- Passage solution GST. Durée d'interaction : 60min. Attente stabilisation.
- Rinçage pour éliminer le non spécifique et les agrégats par passage solution tampon PBS 1x, débit 130 $\mu$ L/min. Attente stabilisation.
- Mesure du décalage de fréquence, vérification de la validité du modèle de Sauerbrey et calcul de la masse adsorbée.

#### 4. *Saturation des sites encore actifs par l'éthanolamine*

Cette étape consiste à désactiver les groupements succinimides encore actifs qui n'auraient pas permis la fixation d'un antigène, afin d'éviter les interactions non spécifiques entre les espèces biologiques « cibles » à détecter et la monocouche assemblée.



- Ethanolamine 1M.
- Passage solution ethanolamine. Durée d'interaction : 30min. Attente stabilisation.

#### 5. *Interaction antigène-anticorps spécifiques*

Le but est d'étudier quantitativement les ajouts de masse dus respectivement à l'interaction spécifique GST / anti-GST et l'interaction non spécifique GST / anticorps quelconques. Le dernier ajout de masse doit être au mieux nul ou en tout cas négligeable par rapport à celui de l'interaction spécifique.

- Solution d'anticorps spécifiques anti-GST préparée dans du tampon PBS 1x. Concentration de 50 $\mu$ g/mL.
- Passage de solution tampon PBS 1x, débit 130 $\mu$ L/min. Attente stabilisation.
- Passage solution d'anticorps. Durée d'interaction : 60min. Attente stabilisation.
- Rinçage pour éliminer le non spécifique et les agrégats par passage solution tampon PBS 1x, débit 130 $\mu$ L/min. Attente stabilisation.

- Mesure du décalage de fréquence, vérification du modèle de Sauerbrey et calcul de la masse adsorbée. Comparaisons.

### **6. Interaction antigène-anticorps non spécifiques**

Pour réaliser cette interaction non spécifique, un autre quartz a été préparé et toutes les étapes de **1.** à **4.** ont été réalisées.

Pour cette interaction, il est possible de choisir n'importe quel anticorps qui ne possède pas une affinité avec les antigènes GST immobilisés. Dans le cadre de ce TP, des anticorps anti-rat IgG produits par le lapin ont été choisis.

- Solution d'anticorps non spécifiques anti-rat préparée dans du tampon PBS 1x. Concentration de 50µg/mL.
- Passage de solution tampon PBS 1x, débit 130µL/min. Attente stabilisation.
- Passage solution d'anticorps. Durée d'interaction : 60min. Attente stabilisation.
- Rinçage pour éliminer le non spécifique et les agrégats par passage solution tampon PBS 1x, débit 130µL/min. Attente stabilisation.
- Mesure du décalage de fréquence, vérification du modèle de Sauerbrey et calcul de la masse adsorbée. Comparaisons.

### **7. Nettoyage de la chambre**

- Sécher la chambre et les tuyaux par pompage à l'air.
- Sortir le quartz, le sécher ainsi que la chambre au jet d'azote.
- Placer un quartz de nettoyage (quartz usagé) dans la chambre.
- Passage d'une solution de Hellmanex 5% (en volume, dilution dans eau milli-Q) pendant 10 min. Débit 130µL/min.
- Passage eau DI 10min pendant 10min. Débit 130uL/min.
- Séchage de la chambre et des tuyaux par pompage à l'air.
- Sortir le quartz et sécher l'intérieur de la chambre au jet d'azote.

### **Données complémentaires :**

Diamètre du quartz : 14mm

Diamètre surface active du quartz : 10mm

Epaisseur du quartz : 300µm

Epaisseur de la couche d'or : 100nm

Densité du quartz : 2650kg/m<sup>3</sup>

Vitesse de propagation du son dans le quartz : 3340m/s

Volume de la chambre de réaction : environ 150µL

Diamètre intérieur du tuyau de pompage : 0.38mm

Sensibilité massique dans le liquide : 1.8ng/cm<sup>2</sup> (shift de 0.1Hz)

Poids moléculaire GST : 26kDa

Poids moléculaire anti-GST : 25,7kDa

Poids moléculaire marqueur fluorescent anti-GST : 390Da

1Da = 1g/mol