
**Textiles — Analyse protéomique
qualitative et quantitative de certaines
fibres animales —**

**Partie 2:
Détection des peptides par MALDI-TOF
MS**

iTeh STANDARD PREVIEW

(standards.iteh.ai)
*Textiles — Qualitative and quantitative proteomic analysis of some
animal hair fibres —*

Part 2: Peptide detection using MALDI-TOF MS

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/679183a9-0188-44e9-8bc4-f4dd23f7bc08/iso-20418-2-2018>



iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 20418-2:2018

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/679183a9-0188-44e9-8bc4-f4dd23f7bc08/iso-20418-2-2018>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2018

Tous droits réservés. Sauf prescription différente ou nécessité dans le contexte de sa mise en œuvre, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie, ou la diffusion sur l'internet ou sur un intranet, sans autorisation écrite préalable. Une autorisation peut être demandée à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Case postale 401 • Ch. de Blandonnet 8
CH-1214 Vernier, Genève
Tél.: +41 22 749 01 11
Fax: +41 22 749 09 47
E-mail: copyright@iso.org
Web: www.iso.org

Publié en Suisse

Sommaire

	Page
Avant-propos.....	iv
Introduction.....	v
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	1
4 Termes abrégés	2
5 Principe	2
6 Réactifs	2
7 Appareillage	5
8 Méthodes d'essai	6
8.1 Préparation de l'échantillon.....	6
8.2 Extraction des protéines.....	6
8.3 Purification partielle des protéines extraites par SDS-PAGE.....	6
8.4 Digestion à la trypsine des protéines extraites.....	7
8.5 Analyse des peptides tryptiques par MALDI-TOF MS.....	7
8.6 Calcul des pourcentages pondéraux.....	7
8.7 Courbes d'étalonnage.....	8
8.8 Calcul de la teneur (%) de chaque type de poil animal dans les mélanges binaires.....	8
8.9 Calcul de la teneur (%) de chaque type de poil animal dans les mélanges ternaires.....	8
9 Fidélité	9
10 Essai interlaboratoires	9
11 Rapport d'essai	9
Annexe A (informative) Exemple d'image de protéines extraites par SDS-PAGE	11
Annexe B (informative) Pics spécifiques à chaque espèce animale dans le cadre de l'analyse par MALDI-TOF MS	12
Annexe C (informative) Pics spécifiques à chaque espèce animale dans le cadre de l'analyse par MALDI-TOF MS	13
Annexe D (informative) Courbe d'étalonnage du mélange cachemire-laine	15
Annexe E (informative) Courbe d'étalonnage du mélange cachemire-yack	16
Annexe F (informative) Répétabilité et reproductibilité	17
Annexe G (informative) Analyse d'échantillons d'essai à l'aveugle à l'aide de la méthode MALDI-TOF MS	19
Annexe H (informative) Résultats de l'essai interlaboratoires	20
Bibliographie	24

Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (IEC) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les procédures utilisées pour élaborer le présent document et celles destinées à sa mise à jour sont décrites dans les Directives ISO/IEC, Partie 1. Il convient, en particulier de prendre note des différents critères d'approbation requis pour les différents types de documents ISO. Le présent document a été rédigé conformément aux règles de rédaction données dans les Directives ISO/IEC, Partie 2 (voir www.iso.org/directives).

L'attention est attirée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir www.iso.org/brevets).

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité, à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

Pour une explication de la nature volontaire des normes, la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'Organisation mondiale du commerce (OMC) concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir le lien suivant: www.iso.org/iso/fr/avant-propos.

Le présent document a été élaboré par le comité technique ISO/TC 38, *Textiles*.

Une liste de toutes les parties de la série ISO 20418 se trouve sur le site web de l'ISO.

Il convient que l'utilisateur adresse tout retour d'information ou toute question concernant le présent document à l'organisme national de normalisation de son pays. Une liste exhaustive desdits organismes se trouve à l'adresse www.iso.org/fr/members.html.

Introduction

Les fibres animales sont utilisées pour produire des étoffes ou des fourrures. En général, les fibres issues de différents animaux présentent des couleurs et des morphologies distinctes et peuvent être différenciées jusqu'au niveau de l'espèce par observation au microscope. Dans le secteur du textile, l'identification et la quantification de fibres animales jouent un rôle clé pour garantir la qualité des produits textiles. À l'heure actuelle, le seul moyen pratique de reconnaître les fibres animales est la méthode microscopique. Cependant, l'identification par microscopie des espèces animales à partir de fibres peut s'avérer difficile en présence de fibres hautement transformées ou en cas d'échantillons ambigus. Par conséquent, les microscopistes des laboratoires d'analyse doivent avoir une grande expérience et un niveau de compétence élevé.

Afin de surmonter les difficultés de la méthode microscopique, plusieurs nouvelles méthodes objectives, telles que la méthode fondée sur l'ADN, ont été développées afin d'identifier les fibres animales. Cette méthode est très sensible et peut être utilisée pour l'analyse qualitative. Toutefois, l'analyse quantitative de certains échantillons hautement transformés reste difficile avec la méthode fondée sur l'ADN.

Il est établi que les poils animaux sont principalement composés de protéines et que les séquences d'acides aminés de ces protéines présentent de légères différences selon l'espèce animale. Au début des années 2000, la spectrométrie de masse s'est révélée être une méthode très utile pour l'identification des structures protéiques. La spectrométrie de masse des petits peptides obtenus par digestion enzymatique des protéines permet de clarifier les différences de séquences d'acides aminés entre les protéines. Une méthode qualitative et quantitative particulièrement efficace a été développée en 2014 à l'aide de la spectrométrie de masse couplant une désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI-TOF MS) et un analyseur à temps de vol. Cette méthode s'est avérée très utile même pour analyser des échantillons hautement transformés et peut être appliquée à différents types de poils animaux, tels que les poils de chèvre (cachemire ou mohair), la laine ou le yack.

[ISO 20418-2:2018](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/679183a9-0188-44e9-8bc4-f4dd23f7bc08/iso-20418-2-2018)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/679183a9-0188-44e9-8bc4-f4dd23f7bc08/iso-20418-2-2018>

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 20418-2:2018

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/679183a9-0188-44e9-8bc4-f4dd23f7bc08/iso-20418-2-2018>

Textiles — Analyse protéomique qualitative et quantitative de certaines fibres animales —

Partie 2: Détection des peptides par MALDI-TOF MS

1 Domaine d'application

Le présent document spécifie une méthode qualitative et quantitative pour déterminer la composition des mélanges de fibres animales par MALDI-TOF MS.

La composition de fibres non animales peut être déterminée par les méthodes décrites dans la série ISO 1833. Les deux résultats sont ensuite combinés pour déterminer la composition globale des fibres.

La méthode repose sur une identification préliminaire par microscopie optique de toutes les fibres présentes dans le mélange sur la base de leur morphologie conformément à l'ISO/TR 11827. En présence de fibres de la même espèce animale (telles que des mélanges de cachemire et de mohair), la méthode ne peut pas être appliquée et l'analyse quantitative peut être réalisée par microscopie (tel que décrit dans la série ISO 17751 par exemple).

2 Références normatives (standards.iteh.ai)

Les documents suivants cités dans le texte constituent, pour tout ou partie de leur contenu, des exigences du présent document. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les éventuels amendements).

ISO 3696, *Eau pour laboratoire à usage analytique — Spécification et méthodes d'essai*

3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions suivants s'appliquent.

L'ISO et l'IEC tiennent à jour des bases de données terminologiques destinées à être utilisées en normalisation, consultables aux adresses suivantes:

- ISO Online browsing platform: disponible à l'adresse <https://www.iso.org/obp>;
- IEC Electropedia: disponible à l'adresse <http://www.electropedia.org/>.

3.1

fibre animale

type de fibre de kératine pour usage textile: laine, cachemire et yack

EXEMPLE Certaines fibres animales proviennent du chameau, de l'alpaga et du lapin angora.

[SOURCE: ISO 20418-1:2018, 3.1, modifiée — Des exemples de fibres animales ont été ajoutés.]

3.2

protéines

polymères d'acides aminés qui jouent de nombreux rôles essentiels dans le corps

3.3

peptides

petites *protéines* (3.2) composées de moins de 50 acides aminés environ

3.4

solution tampon

solution utilisée pour maintenir le pH à la valeur souhaitée pour la solution de réaction

3.5

marqueur

m/z d'un pic monoisotopique spécifique à une espèce animale utilisé pour l'identification et la quantification

Note 1 à l'article: Voir (Article 4) pour obtenir une explication de m/z .

4 Termes abrégés

SDS-PAGE méthode d'électrophorèse utilisant un gel de polyacrylamide contenant du dodécylsulfate de sodium permettant de séparer les protéines en fonction de leur taille moléculaire

MALDI méthode d'ionisation utilisée en spectrométrie de masse, ionisation/désorption laser assistée par matrice

TOF MS spectrométrie de masse à analyseur de temps de vol, type de spectrométrie de masse fondée sur la différence de temps mis par les ions pour atteindre la plaque cible en fonction de leur masse moléculaire

m/z grandeur, sans dimension, obtenue en divisant le rapport de la masse d'un ion sur l'unité de masse atomique unifiée, par son nombre de charges (quel que soit son signe)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/679183a9-0188-44e9-8bc4-f4dd23f7bc08/iso-20418-2-2018>

5 Principe

Les protéines contenues dans les fibres animales sont extraites à l'aide d'une solution tampon de SDS/dithiothréitol (DTT)/phosphate. Les protéines extraites sont partiellement purifiées par SDS-PAGE. Les protéines contenues dans le gel sont digérées enzymatiquement par des trypsines. Les ratios de peptides propres à chaque espèce animale sont analysés par MALDI-TOF MS. La composition en pourcentage de chaque fibre animale est calculée en utilisant la courbe d'étalonnage.

6 Réactifs

Tous les réactifs doivent être de qualité suffisante, adaptée aux analyses biochimiques. Certains milieux de culture sont disponibles dans le commerce.

6.1 **Eau**, de qualité 3 tel que spécifié dans l'ISO 3696.

6.2 **Dihydrogénophosphate de sodium dihydraté**, d'une pureté égale ou supérieure à 99 %.

6.3 **Hydrogénophosphate disodique**, d'une pureté égale ou supérieure à 99 %.

6.4 **Solution de dihydrogénophosphate de sodium** (0,2 mol/l).

— Dihydrogénophosphate de sodium dihydraté 31,2 g

Compléter à 1 l en le dissolvant dans de l'eau.

6.5 Solution d'hydrogénophosphate disodique (0,2 mol/l).

- Hydrogénophosphate disodique 28,4 g

Compléter à 1 l en le dissolvant dans de l'eau.

6.6 Tampon phosphate (pH 7,8 et 0,2 mol/l).

- Solution de dihydrogénophosphate de sodium à 0,2 mol/l (6.4)
- Solution d'hydrogénophosphate disodique à 0,2 mol/l (6.5) 100 ml

Ajouter la solution de dihydrogénophosphate de sodium à 0,2 mol/l (6.4) à la solution d'hydrogénophosphate disodique à 0,2 mol/l (6.5) pour ajuster le pH à 7,8.

6.7 Dodécylsulfate de sodium (SDS), d'une pureté égale ou supérieure à 99,5 %.**6.8 Dithiothréitol (DTT), d'une pureté égale ou supérieure à 97 %.****6.9 Solution tampon SDS.**

- Tampon phosphate à 0,2 mol/l (pH 7,8) (6.6) 50 ml
- SDS 4,0 g

Compléter à 100 ml en ajoutant de l'eau.

6.10 Tampon d'extraction.

ISO 20418-2:2018

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/679183a9-0188-44e9-8bc4-f4dd23f7bc08/iso-204180>

- Solution tampon SDS (6.9) 0,25 ml
- DTT 1,9 mg

Dissoudre le DTT dans la solution tampon SDS juste avant emploi.

6.11 Solution d'iodoacétamide (IAA).

- IAA, d'une pureté égale ou supérieure à 98 % 4,7 mg

Dissoudre dans 50 µl d'eau juste avant emploi.

6.12 Solution DTT.

- DTT 1,9 mg

Dissoudre dans 10 µl d'eau juste avant emploi.

6.13 Gels de polyacrylamide de petite taille.**6.14 Tris (hydroxyméthyl) aminométhane (Tris), d'une pureté égale ou supérieure à 99,9 %.****6.15 MOPS (acide 3-Morpholinopropanesulfonique), d'une pureté égale ou supérieure à 99,5 %.**

6.16 Tampon Tris-MOPS.

— Tris	6,06 g
— MOPS	10,46 g
— SDS	1,0 g
— EDTA	0,3 g
— Eau	900 ml

Compléter à 1 l en ajoutant de l'eau.

6.17 Tampon Tris (0,5 mol/l).

— Tris	6,05 g
— Eau	80 ml

Ajuster le pH de la solution à 6,8 en ajoutant de l'acide chlorhydrique à 1 mol/l.

Compléter à 100 ml en ajoutant de l'eau.

6.18 Tampon de dosage.

— Tampon Tris à 0,5 mol/l (pH 6,8) (6.17)	4 ml
— SDS 10 %	1 ml
— Glycérol, d'une pureté égale ou supérieure à 99,8 %	4 ml

Compléter à 10 ml en ajoutant de l'eau.

6.19 Solution de bleu brillant de Coomassie (CBB).¹⁾

6.20 Bicarbonate d'ammonium (NH_4HCO_3), d'une pureté égale ou supérieure à 96 %.

6.21 Bicarbonate d'ammonium (100 mmol/l).

— Bicarbonate d'ammonium (6.20)	7,91 g
— Eau pure	900 ml

Compléter à 1 l en ajoutant de l'eau pure.

6.22 Acétonitrile, d'une pureté égale ou supérieure à 99,8 %.

6.23 Tampon de lavage.

— Bicarbonate d'ammonium à 100 mmol/l (6.21)	50 ml
— Acétonitrile	50 ml

1) L'AE-1340 EzStain Aqua est un exemple de produit approprié disponible dans le commerce. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs du présent document et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif du produit ainsi désigné.

6.24 5-Cyclohexyl-1-pentyl- β -D-maltoside (CYMAL-5), un détergent qui stabilise la trypsine et diminue l'adsorption des peptides tryptiques sur la surface du puits de la microplaque.

6.25 Trypsine modifiée de qualité séquençage.²⁾

6.26 Tampon de digestion.

- Bicarbonate d'ammonium à 100 mmol/l (6.21) 50 ml
- CYMAL-5 10 mg

Compléter à 100 ml en ajoutant de l'eau.

6.27 Solution de trypsine.

- Trypsine modifiée de qualité séquençage (6.25) 20 μ g
- Acide chlorhydrique à 0,01 mol/l 300 μ l
- Tampon de digestion (6.26) 4 ml

Laisser refroidir le tampon de digestion sur de la glace et ajouter 100 μ l de trypsine dissoute dans de l'acide chlorhydrique à 0,01 mol/l avant emploi.

6.28 Acide trifluoroacétique (TFA), d'une pureté égale ou supérieure à 99,8 %.

6.29 Acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (CHCA), d'une pureté égale ou supérieure à 99,5 %, utilisé comme matrice pour les peptides dans le cadre des analyses par MALDI MS.

6.30 Solution de matrice.

- CHCA 25 mg
- Acétonitrile/TFA 0,1 % (7:3) 5 ml

7 Appareillage

7.1 Broyeur à billes, utilisé pour moudre les matériaux en une poudre extrêmement fine.

7.2 Bain à blocs en aluminium, utilisé pour maintenir une température de réaction constante, +30 °C à +100 °C.

7.3 Vortex, utilisé pour mélanger des microtubes de liquide.

7.4 Mini-cuve d'électrophorèse.

2) La trypsine modifiée de qualité séquençage est un exemple de produit approprié disponible dans le commerce. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs du présent document et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif du produit ainsi désigné.

7.5 Couteau à gel³⁾ ou lame de rasoir, utilisés pour couper la partie du gel contenant les protéines cibles.

Une pipette de 200 µl avec un cône de pipette, dont le cône est coupé à 2 cm environ, peut être utilisée comme couteau à gel.

7.6 Pipette, capable de mesurer et de prélever des volumes de (0 à 20) µl ($\pm 0,20$ µl), (20 à 200) µl ($\pm 1,60$ µl), (200 à 1 000) µl (± 8 µl).

7.7 Cône de pipette avec du milieu de chromatographie fixé à son extrémité afin de concentrer et de purifier les échantillons.

7.8 Spectromètre de masse MALDI-TOF, utilisé pour mesurer la masse moléculaire des peptides.

8 Méthodes d'essai

8.1 Préparation de l'échantillon

8.1.1 À l'aide de ciseaux, couper une quantité suffisante d'échantillon en petits tronçons pour en caractériser le contenu. Placer (12,5 \pm 2,5) mg de l'échantillon coupé dans un tube de réaction avec 0,25 ml de solution tampon SDS (6.9) et six petites billes de zircone.

8.1.2 Moudre les fibres de poils à l'aide d'un broyeur à billes (7.1) à une fréquence de 25 Hz pendant 30 min.

8.2 Extraction des protéines

8.2.1 Ajouter 0,25 ml de tampon d'extraction (6.10) à l'aide d'une pipette (7.6) dans le tube de réaction et bien mélanger à l'aide d'un vortex (7.3).

8.2.2 Conserver le tube à essai dans le bain à blocs en aluminium (7.2) à une température de 95 °C pendant 15 min.

8.2.3 Centrifuger la solution à 6 500 g pendant 1 min à température ambiante. Ajouter 10 µl de solution DTT (6.12) et conserver le tube à essai à une température de 95 °C pendant 15 min à nouveau.

8.2.4 Alkyler le mélange réactionnel avec 50 µl de solution IAA (6.11) pendant 15 min à température ambiante afin de bloquer la formation de liaisons disulfure.

8.2.5 Arrêter la réaction en ajoutant 20 µl de solution DTT (6.12).

8.2.6 Centrifuger la solution à 6 500 g pendant 5 min à température ambiante. Transférer le surnageant dans un autre tube à essai. Conserver l'extrait protéique pour analyse.

8.3 Purification partielle des protéines extraites par SDS-PAGE

8.3.1 Purifier partiellement l'extrait protéique (8.2.6) par SDS-PAGE à l'aide d'une mini-cuve d'électrophorèse (7.4) et de gels de polyacrylamide de petite taille (6.13) afin de retirer les composants de masse moléculaire le plus faible et le plus élevé.

3) Le couteau à gel de 1,8 mm de diamètre est un exemple de produit approprié disponible dans le commerce. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs du présent document et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif du produit ainsi désigné.