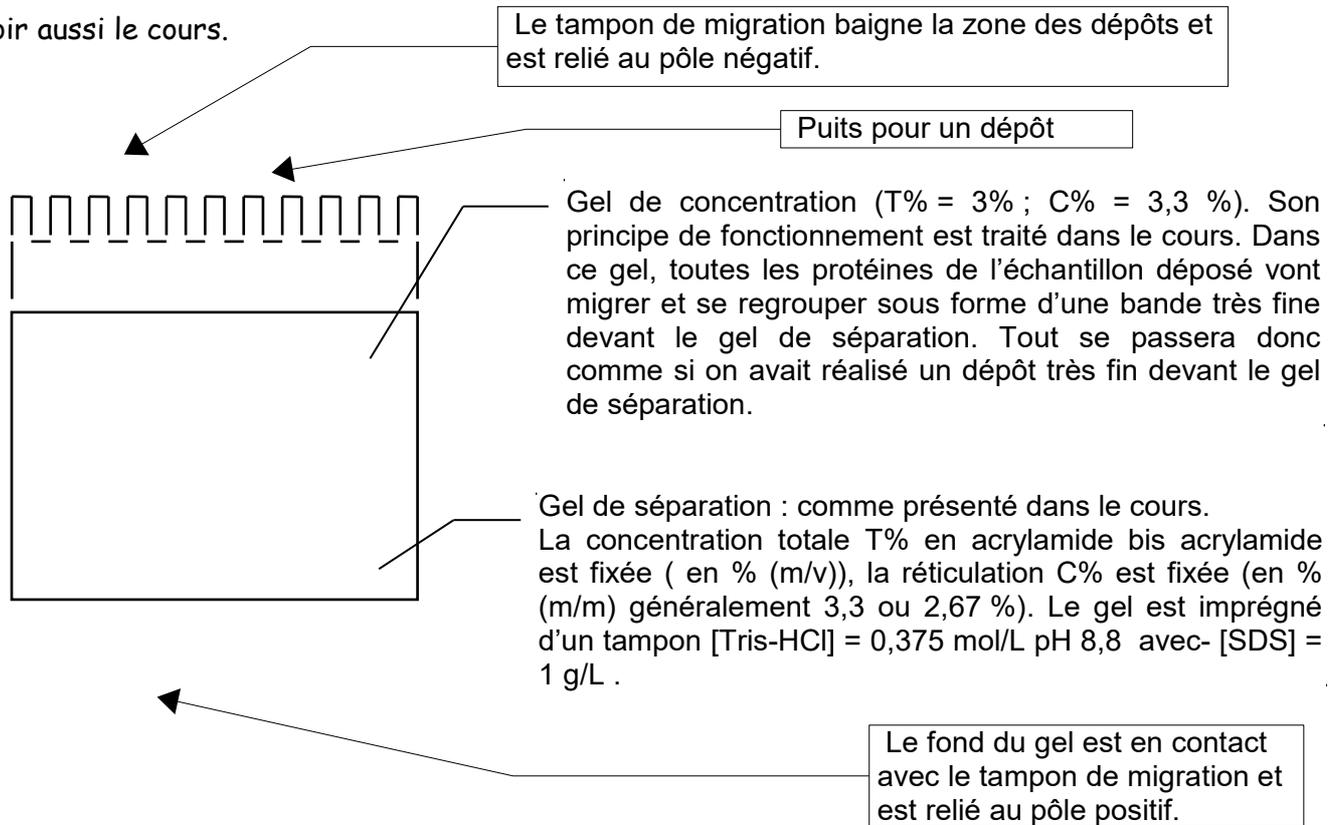


Manipulation d'initiation à l'électrophorèse de protéines en gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-page)

1. Présentation du montage

Voir aussi le cours.



Composition du gel de concentration :

- T% = 3% ;
- C% = 3,3 % (m/m) (proportion de bis acrylamide par rapport au total acrylamide et bis acrylamide) ;
- en tampon [tris-HCl] = 0,125 mol/L pH 6,8 avec [SDS] = 1 g/L .

Composition du tampon de migration RB1x : [Tris-HCl] = 25 mmol/L ; [glycine] = 192 mmol/L ; [SDS] = 1 g/L .

2. Préparation des gels

2.1 Solution stock d'acrylamide et de bis acrylamide

A disposition une solution commerciale acrylamide bis acrylamide 30% 29:1 (30% d'acrylamide et de bis acrylamide en % m/v dont 1% de bis acrylamide).

Le taux de réticulation C% des gels sera donc de $1/30 = 3,3\%$.

2.2 Domaines de fractionnement

Pour %C = 2,67% à 3,3 %				
T% = 5%	T% = 7,5%	T% = 10%	T% = 12%	T% = 15%
100 à 500 kDa	65 à 200 kDa	21 à 200 kDa	14 à 100 kDa	6,5 à 100 kDa

2.3 Identification et gestion des risques

A disposition (format papier et fichiers sur internet) : une documentation de sécurité Y compris les liens internet donnés dans cette documentation : vers les fiches FDS (MSDS) et le site de l'INRS.. Après information et formation, le groupe prépare et vérifie la salle et les équipements. L'adéquation du travail réalisé aux risques identifiés est discutée et validée avec l'enseignant responsable.

Compte-rendu : Plus tard dans la séance, lors de l'étape de migration électrophorétique, rédiger, en collaboration avec les autres membres du groupe, une fiche d'instructions pour la gestion des risques

lors d'une manipulation de réalisation d'une SDS-page. Instructions concernant la salle dédiée et le matériel dédié, instructions pour les manipulations, instructions pour la gestion des déchets ...

2.4 Préparation des gels

Dans la suite TEMED signifie NNN'N'-tétraméthyléthylènediamine. Le persulfate d'ammonium 10% est à préparer extemporanément ou utiliser une solution conservée congelée après préparation immédiate.

Gel de séparation		Gel de concentration	
volume total préparé	V mL	volume total préparé	V mL
Acryl. Bis acryl. 30% 29:1	selon teneur finale désirée	Acryl. Bis acryl. 30% 29:1	selon teneur finale désirée
Tris-HCl 1 M pH 8,8 pour obtenir 0,375 M final	$V * 0,375$ mL	Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 pour obtenir 0,125 M final	$V * 0,25$ mL
SDS 10 %	V/100 mL	SDS 10 %	V/100 mL
H ₂ O	qsp V	H ₂ O	qsp V
Mélange doux pour ne pas oxygéner (inhibiteur de polymérisation) et au dernier moment, avant de couler			
TEMED	1,5 V μ L	TEMED	1,5 V μ L
persulfate 10 %	10 * V μ L	persulfate 10 %	10 * V μ L
Couler rapidement. Laisser polymériser sans bouger le gel.		Couler rapidement. Laisser polymériser sans bouger le gel, en présence d'un peigne.	

2.5 Préparation des plaques, coulage, montage

Tout le matériel doit être propre, dégraissé. Se conformer à la notice du système fourni (avec certains matériels peu performants, prendre éventuellement soin de placer une coulée d'agar en surfusion à 60°C (à 1% m/v en tampon RB1x) sur le joint de coulage - si il a vieilli - afin d'éviter les fuites).

Couler le gel de séparation sans emprisonner de bulles d'air jusqu'à 3 cm du bord supérieur. Recouvrir de butanol saturé en eau (20 volume de butanol + 1 volume d'eau, agitation, utilisation de la phase supérieure). Le temps de polymérisation peut être contrôlé en observant le reliquat de gel préparé. Laisser polymériser sans bouger le gel. Éliminer le butanol et l'eau de rétraction avec un papier absorbant, rincer avec un peu d'eau, éliminer avec un papier absorbant. Le temps de polymérisation peut être contrôlé en observant le reliquat de gel préparé. Couler le gel de concentration en présence du peigne en remplissant au maximum. Laisser polymériser sans bouger le gel.

Pour le montage, se conformer à la notice du système fourni. Les points critiques : pas de bulles d'air sous la plaque de gel ; attention à ne pas abîmer les puits lors du retrait du peigne ; pas de fuite de tampon de migration !

En général, le tampon de migration RB est fabriqué sous forme RB10x (donc ne pas oublier de diluer au 1/10).

3. Marqueurs de taille et préparation des échantillons

Les échantillons à analyser doivent avoir des concentrations en protéines au voisinage de 0,1 à 2 g/L pour les colorations classiques au bleu de Coomassie. Pas de potassium et pas trop de sels (<0,2 mol/L) dans les échantillons.

Sous hotte , en tube microfuge + perforation de couvercle	
100 μ L d'échantillon	100 μ L de solution de marqueurs de masses moléculaires aux bonnes concentrations
Tampon standard de dénaturation SB5x (avec SDS et 2-mercaptoéthanol) : 25 μ L	
SB5x = Tris-HCl 0,313 M pH 6,8 + glycérol 50% (v/v) + SDS 100 g/L + BBP 0,5 g/L + 2-mercaptoéthanol 25 % (v/v).	
Porter 4 minutes à 100°C (sur flotteur au bain-marie bouillant ou en bloc chauffant) puis refroidir rapidement.	

4. Dépôt des échantillons et migration

Déposer 5 μ L par puits. Migration : 15 à 18 V/cm ; le bleu de bromophénol présent dans le tampon de dénaturation est utilisé comme marqueur de migration. Il migre très rapidement.

C'est le glycérol présent dans le tampon de dénaturation qui donne une forte densité aux dépôts, ce qui les fait « couler » au fond des puits.

5. Révélation (cas de révélations au bleu de Coomassie)

5.1 Révélation classique au bleu de Coomassie R250 en milieu acétique

- Démouler le gel, éliminer la partie gel de concentration du dépôt, marquer la position du bleu de bromophénol ; orienter le gel par rapport au plan de dépôt (encoche en bas à droite par exemple).
- Immerger le gel 45 minutes dans le bain de fixation et coloration.
- Immerger le gel dans plusieurs bains de solution de lavage jusqu'à retrouver un fond incolore (le gel est en effet coloré après la première étape et sa décoloration est très lente ; elle est accélérée sous agitation en présence d'un papier adsorbant le bleu de Coomassie).
- Les gels peuvent alors être analysés immédiatement ou conservés (par séchage ou dans un bain d'acide acétique à 5-7 % v/v) pour analyse ultérieure.

Réactifs :

- Solution de coloration : [bleu de Coomassie R250] = 2,5 g/L + [propanol-2] = 200 mL/L + [acide acétique] = 200 mL/L.
- Solution de lavage : [acide acétique] à 70 à 100 mL/L + papier adsorbant

La solution de coloration est réutilisable de nombreuses fois. Pas de rejet à l'évier mais en conteneur dédié.

5.2 Révélation au bleu de Coomassie G250 colloïdal en présence de cyclodextrines

- Démouler le gel, éliminer la partie gel de concentration du dépôt, marquer la position du bleu de bromophénol ; orienter le gel par rapport au plan de dépôt (encoche en bas à droite par exemple) ;
- Immerger le gel sous agitation 45 minutes dans le bain de coloration. La forme colloïdale permet de ne pas colorer le gel mais de seulement déplacer le colorant vers son adsorption aux protéines. Les cyclodextrines piègent le SDS qui tend à complexer le bleu de Coomassie.
- Rincer (si nécessaire) à l'eau distillée sous agitation jusqu'à retrouver un fond parfaitement transparent.

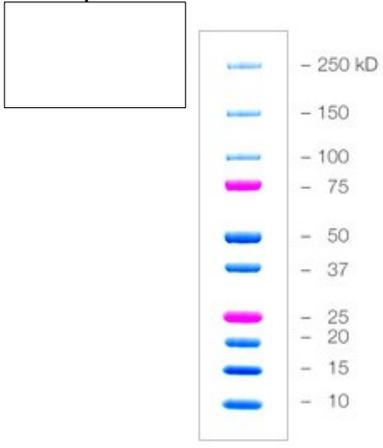
Réactifs :

Solution A, dans l'ordre : bleu de Coomassie G250= 80 mg +éthanol 95 % 50 mL + acide phosphorique = 80 mL/L + [eau 700 mL. Homogénéiser 2 minutes. Solution B : 10 g de béta-cyclodextrine + 120 mL NaOH 0,25M + 170 mL d'eau. Ajouter B à A et homogénéiser.

Note. Risques particuliers liés au bleu de Coomassie R250 ou G250 en poudre. Cette substance est non classifiée selon le règlement CLP. Il semblerait cependant que la poudre puisse être nocive par inhalation, ingestion et puisse provoquer une irritation des yeux. Utiliser la poudre sous hotte, ne pas respirer les poussières et éviter absolument le contact les yeux. Pas de données écotoxicologiques. La charge à 2,5 g/L dans la solution de coloration ne pose a priori pas de problème de sécurité particulier.

6. Electrophorèse SDS-page à réaliser et compte rendu de la manipulation

Pour le groupe de 5 étudiants, réaliser 3 types de gels, un à 10, un à 12 et un à 15 % (voir S1 et S2) qui seront chargés avec les échantillons suivants : 1 piste avec chacun des 2 marqueurs proposés, 1 piste avec l'échantillon cytochrome c, une piste avec l'échantillon béta-galactosidase, 1 piste avec l'échantillon phosphatase alcaline, 1 piste avec l'échantillon blanc d'œuf dilué au 1/50, 3 pistes avec les extraits protéiques obtenus lors des séquences de TP précédentes.

<p>Le marqueur1 a la composition suivante :</p> <ul style="list-style-type: none"> • 67 µg de Phosphorylase b de muscle de lapin (MM 97 000) • 83 µg d'Albumine de sérum bovin (MM 66000) • 147 µg d'ovalbumine de blanc d'œuf de poule (MM 45000) • 83 µg d'anhydrase carbonique de globule rouge bovin (MM 30000) • 80 µg d'inhibiteur de la trypsine de soja (MM 21000) • 116 µg d'alpha-lactalbumine de lait de vache (MM 14400) • pour un volume final de 200 µL en tampon SB1x. 	<p>Marqueur2 = marqueur à protéines colorées, allure des bandes et M correspondantes.</p> 
---	--

Compte-rendu : tableau complet de préparation des gels, résultats obtenus (photographies), analyse complète, comparaison des résultats selon les teneurs totales en acrylamide, conclusions.

Bibliographie

- Documentation Sigma, Technical bulletin n° MWS-877L, juillet 1988
- Technoscope, Biofutur n°9, février 1987
- Les cahiers de l'ingénieur, chapitres consacrées aux électrophorèses
- <http://www.perrin33.com/biochanalys/electroph/sdspage0.php>
- Données fournies par D. Loncle
- Delphine Lapaillerie, Ludovic Martin, Jean Marie Schmitter and Marc Bonneau, Magic Blue: a very fast and sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis , EuPA 2013 Scientific Meeting, Saint Malo, France, 14-17 Oct 2013 ; disponible à http://www.cgfb.u-bordeaux2.fr/sites/default/files/Poster_2013_EUPA_P088.pdf