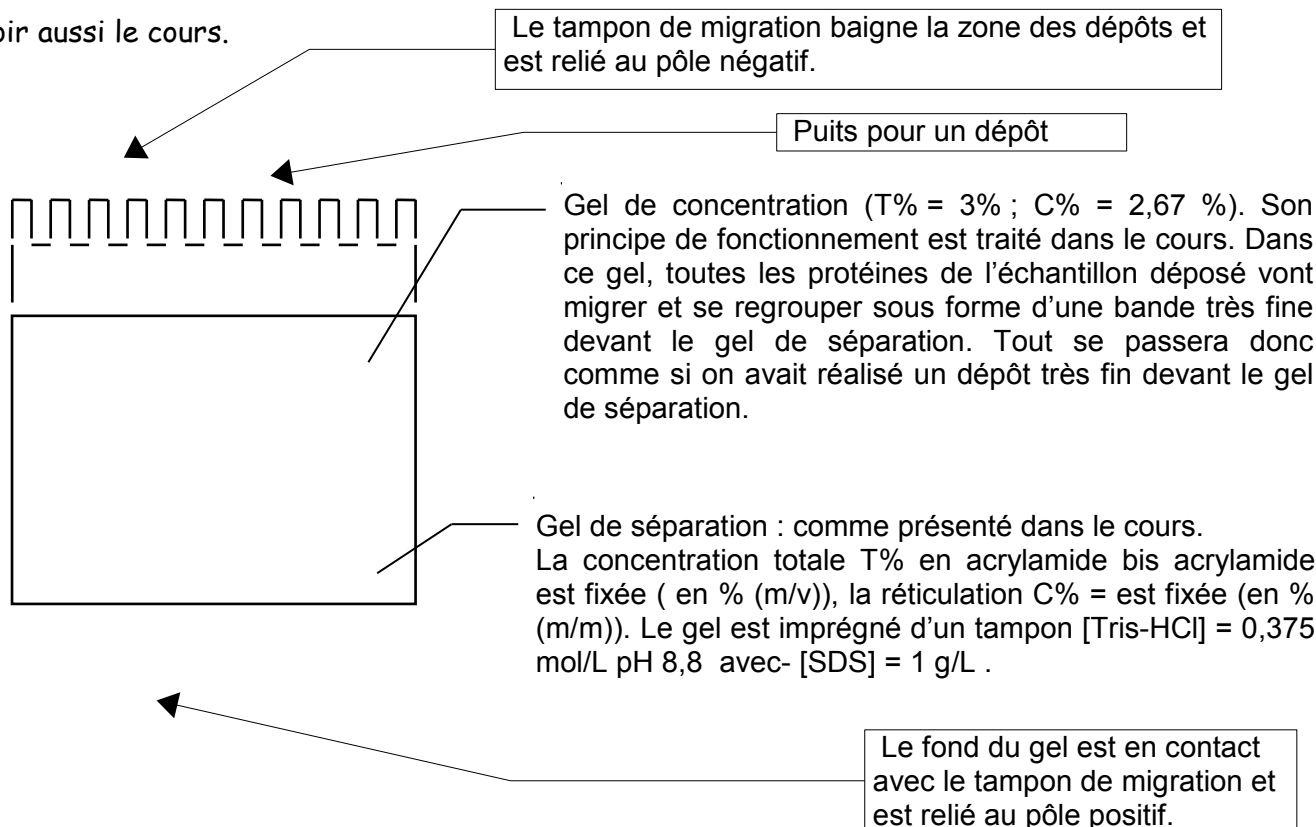


Manipulation d'initiation à l'électrophorèse de protéines en gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-page)

1. Présentation du montage

Voir aussi le cours.



Composition du gel de concentration :

- T% = 3% ;
- C% = 2,67 % (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% / 0,8% (30% d'acrylamide et de bis acrylamide en % m/v dont 0,8% de bis acrylamide).

Le taux de réticulation C% des gels sera donc de $0,8/30 = 2,67\%$.

2.2 Domaines de fractionnement

Pour %C = 2,67%				
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 la documentation concernant les risques chimiques liés à la réalisation de SDS-page (document « tp-gelspolyacrylamide-risquessecurite.odt »). 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% / 0,8 %	selon teneur finale désirée	Acryl. Bis acryl. 30% / 0,8 %	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 soin de placer une coulée d'agar en surfusion à 60°C (à 1% m/v en tampon RB1x) sur le joint de coulage 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.

<u>Sous hotte</u> , 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 la révélation au bleu de coomassie)



- démouler le gel, éliminer la partie de gel dont la fonction était la concentration du dépôt, marquer la position du bleu de bromophénol ;
- 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 (demande quelques heures, est accéléré en présence d'un papier adsorbant le bleu de Coomassie);
- les gels peuvent être analysés immédiatement ou conservés (par séchage ou dans un bain d'acide acétique à 5 % 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 100 mL/L + papier adsorbant

Risques liés au bleu de coomassie R250 en poudre. Peut être nocif par inhalation, ingestion, absorption par la peau, peut provoquer une irritation des yeux. **S22** Ne pas respirer les poussières. **S24/25** Eviter le contact avec la peau et 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.

acide acétique	Phrases de risques	Phrases de sécurité
pureté 99,8%, MM = 60,05 g/mol, 1,0049 kg/L 25 °C  corrosif	R10 Inflammable. R35 Provoque de graves brûlures.	S23 Ne pas respirer les vapeurs. S26 En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste. S45 En cas d'accident ou de malaise consulter immédiatement un médecin (si possible lui montrer l'étiquette).

propanol-2	Phrases de risques	Phrases de sécurité
Pureté > 99,5%,   Facilement inflammable Irritant	R11 Facilement inflammable. R36 Irritant pour les yeux. R67 L'inhalation de vapeurs peut provoquer somnolence et vertiges.	S7 Conserver le récipient bien fermé. S16 Conserver à l'écart de toute flamme ou source d'étincelles - Ne pas fumer. S24/25 Eviter le contact avec la peau et les yeux. S26 En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste.

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

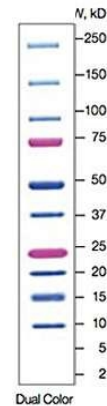
6. Electrophorèse SDS-page à réaliser et compte rendu de la manipulation

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 le marqueur1, 1 piste avec l'échantillon

cytochrome c, 1 piste avec le lysat *E. coli*, une piste avec l'échantillon β galactosidase purifiée, 1 piste avec l'échantillon phosphatase alcaline purifiée, 1 piste avec l'échantillon blanc d'œuf dilué au 1/50, 2 pistes avec un extrait d'*Agaricus hortensis* comme obtenu lors de la séance « catéchol-oxydase » chez *Agaricus hortensis*, 1 piste avec le marqueur2.

Le marqueur1 a la composition suivante :

- 67 μ g de Phosphorylase b de muscle de lapin (MM 97 000)
- 83 μ g d'Albumine de sérum bovin (MM 66000)
- 147 μ g d'ovalbumine de blanc d'œuf de poule (MM 45000)
- 83 μ g d'anhydrase carbonique de globule rouge bovin (MM 30000)
- 80 μ g d'inhibiteur de la trypsine de soja (MM 20100)
- 116 μ g d'alpha-lactalbumine de lait de vache (MM 14400)
- pour un volume final de 200 μ L en tampon SB1x.



Marqueur2 = marqueur à protéines colorées, allure des bandes

Compte-rendu : tableau complet de préparation des gels, résultats obtenus, 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/sdspace0.php>