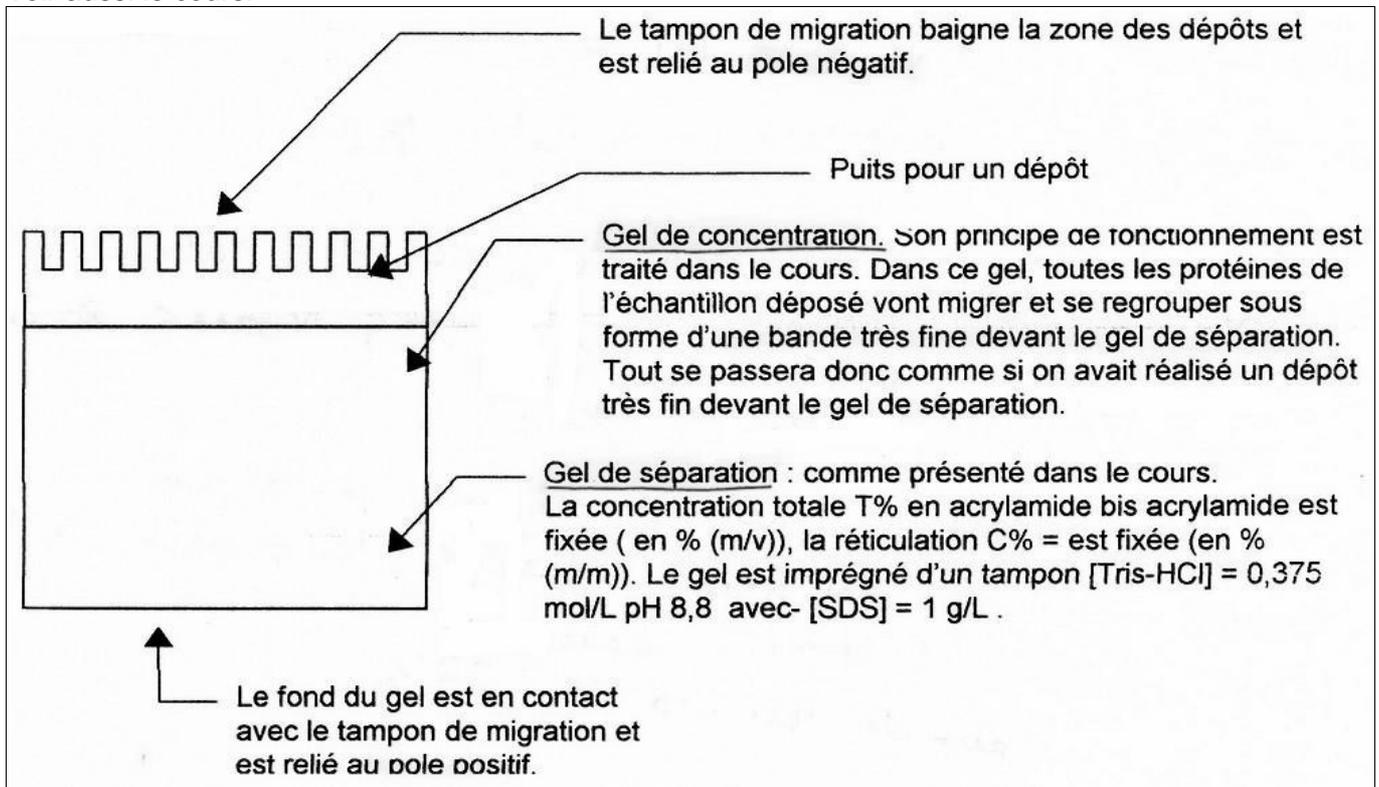


Initiation à l'électrophorèse de protéines en gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-page)

1. Montage

Voir aussi le cours.



Composition du gel de concentration :

- T% = 3% (m/v),
- 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] = 1g/L.

2. Préparation des gels

2.1. Solution stock d'acrylamide et de bis acrylamide

L'acrylamide et le bis acrylamide sont des neurotoxiques puissants. La connaissance des données de sécurité (par consultation de la fiche de sécurité par exemple) est obligatoire avant la manipulation. Il n'y a plus aucune raison d'utiliser les produits en poudre (risques élevés de suspensions toxiques dans l'air); il faut utiliser des solutions commerciales concentrées.

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 500kDa	65 à 200 kDa	21 à 200 kDa	14 à 100 kDa	6,5 à 100 kDa

2.3. Préparation des gels

Dans la suite TEMED signifie N,N,N',N'-tétraméthylènediamine. Le persulfate d'ammonium 20% 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 1M pH8,8 pour obtenir 0,375 M final	V x 0,375 mL	Tris-HCl 1M pH6,8 pour obtenir 0,125 M final	V x 0,125mL
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 µL	TEMED	1,5 V µL
persulfate 10%	10 x V µL	persulfate 20%	10 x V µL
Couler rapidement. Laisser polymériser sans bouger le gel.		Couler rapidement. Laisser polymériser sans bouger le gel, en présence d'un peigne.	

2.4. Préparation des plaques, coulage, montage

Tout le matériel doit être propre, dégraissé. Se conformer à la notice du système fourni (prendre soin de placer une coulée d'agar à 1% en tampon RB1x, en fusion, 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. Le temps de polymérisation peut être contrôlé en observant le reliquat de gel préparé. Laisser polymériser sans bouger le gel.

Éliminer l'eau de rétraction. Couler le gel de concentration en présence du peigne en remplissant au maximum. Laisser polymériser sans bouger le gel.

NB : on peut préparer le système quelques jours à l'avance et stockera 4°C sous emballage étanche.

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 et préparation des échantillons

Les échantillons à analyser doivent avoir des concentrations en protéines au voisinage de 0,5 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.

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

4. Dépôt des échantillons et migration

Déposer 5µL 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

- 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] = 100 mL/L + papier adsorbant.

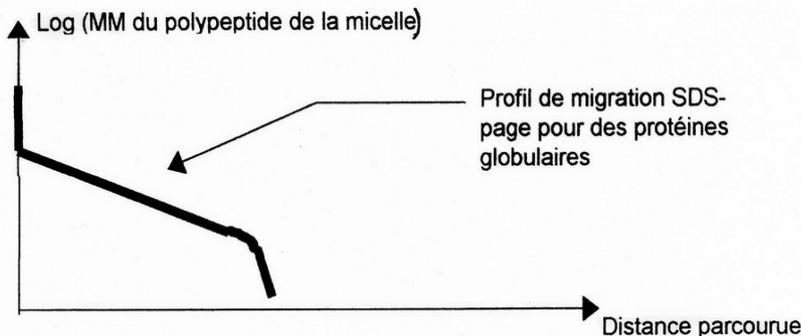
6. Travail à réaliser et compte rendu

- Chaque binôme doit réaliser un gel à 10,12 ou 15% (voir §1 et §2) qui sera chargé avec les échantillons suivants : 2 pistes avec le marqueur, 1 piste avec l'échantillon cytochrome c, une piste avec l'échantillon bêtagalactosidase, 1 piste avec l'échantillon phosphatase alcaline, 1 piste avec l'échantillon blanc d'œuf dilué au 1/50, 2 pistes avec des extraits A, B₀, B₁ ou D ou G d'*Agaricus hortensis* comme obtenu lors de la séance « polyphénol-oxydases chez *Agaricus hortensis* »
- Le marqueur a la composition suivante: 67µg de Phosphorylase b de muscle de lapin (MM 97 000) + 83µg d'Albumine de sérum bovin (MM 66000) + 147µg d'ovalbumine de blanc d'œuf de poule (MM 45000) + 83µg d'anhydrase carbonique de globule rouge bovin (MM 30000) + 80µg d'inhibiteur de la trypsine de soja (MM 20100) + 116µg d'alpha-lactalbumine de lait de vache (MM 14400) pour un volume final de 200µL en tampon SB1x.
- Compte-rendu: tableau complet de préparation des gels/ résultats obtenus, analyse complète, comparaison des résultats selon les teneurs totales en acrylamide, conclusions.

7. Rappel concernant le principe de séparation des protéines par SDS-page

Revoir le cours.

En présence de 2-mercaptoéthanol + chaleur + SDS, toutes les sous unités polypeptidiques des protéines perdent leurs ponts disulfures éventuels, sont séparées, sont dénaturées et forment des micelles SDS - sous unité polypeptidique. Toutes les micelles présentent la même densité de charge. La migration de séparation a lieu dans un gel de porosité très contrôlée. Les grosses micelles sont freinées ou arrêtées par le maillage du gel contrairement au petites micelles. D'où un profil de migration du type :



Bibliographie

Documentation Sigma, Technical bulletin n° MWS-877L, juillet 1988

Technoscope, Biofutur n°9, février 1987

INRS, fiche toxicologique n°119 de 1992

Les cahiers de l'ingénieur, chapitres consacrées aux électrophorèses.