

Mallette « électrophorèse SDS PAGE »

1 COMPOSITION DE LA MALLETTE SDS PAGE

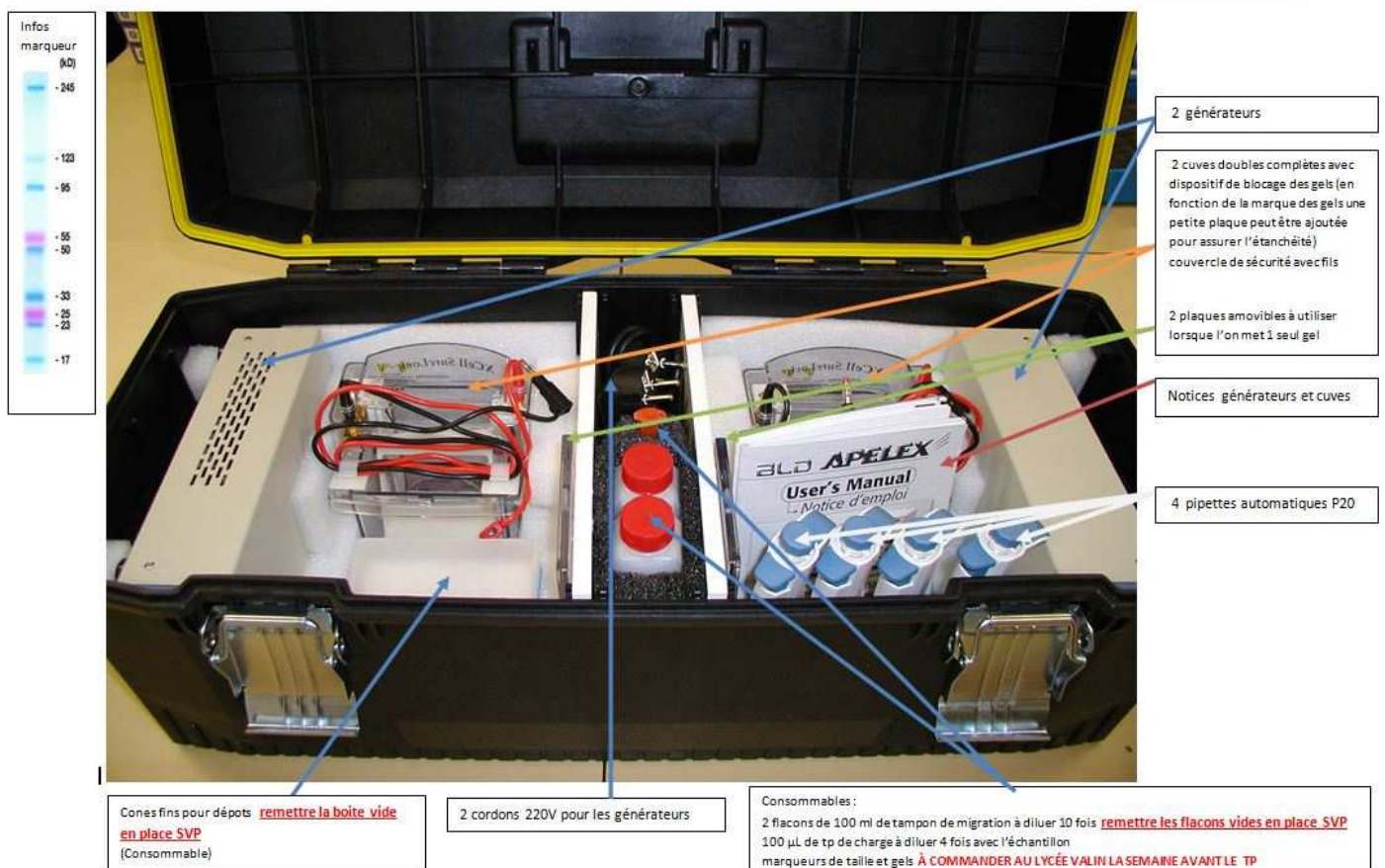
- 2 Générateurs pour électrophorèse
- 2 cuves pouvant accueillir 2 gels chacune (+dispositif blocage + fils + notice)
- 4 pipettes P20 + les cônes fins
- 2 x 100 mL de running buffer = tampon de migration (à diluer au 1/10^{ème})
- 100 µL de sample buffer = tampon de charge (à diluer au ¼)
- Feuille de prêt à renseigner

En option : (à commander 1 semaine avant)

- Marqueur de taille
- Poudre de Coomassie
- Gels en cassette

A prévoir : Les protéines à analyser (Concentration idéale 1 g/L), Micro-onde, mélangeur, une pipette automatique de 100 µL ou 200 µL.

CONTENU DE LA MALLETTE « ÉLECTROPHORÈSE P.A.G.E. »



2 MANIPULATIONS (avec des gants de préférence)

2.1 Gel de séparation (Running Gel)

Utiliser un gel prêt à l'emploi (cassettes) à 10% ou à 12% ou à gradient (4 à 20%) en polyacrylamide.

2.2 Mise en place des plaques dans la cuve

- Après avoir enlevé le ruban du gel prêt à l'emploi, mettre en place le gel bien orienté sur le support prévu. (mettre un 2^{ème} gel ou une plaque pour former une minicuve).
- Mettre cette minicuve dans la grande cuve à électrophorèse, verrouiller le système en levant le levier blanc.
- Remplir la minicuve avec du tampon de migration (RUNNING BUFFER); effectuer lentement ce remplissage de façon à recouvrir et remplir les puits pour échantillons (éviter la mousse).
- Attendre quelques minutes pour tester l'étanchéité de la minicuve.
- Mettre 3 à 4 cm de tampon dans la grande cuve.
- Effectuer les dépôts des échantillons (cf 2.3)
- Mettre sous tension: appliquer une d.d.p. constante de 150 à 180 volts.
- Laisser migrer jusqu'à environ 1 cm du bord inférieur (~ 1h).

2.3 Préparation et dépôts des échantillons

Les échantillons à traiter sont : le mélange de protéines étalons (= marqueur de taille) ; SAB ; lysozyme et β galactosidase.

1. Préparer les échantillons : Mettre les protéines en solution dans le SAMPLE BUFFER (20 μ L de SAMPLE BUFFER + 60 μ L de solution à analyser). Chauffer au bain marie bouillant pendant 5 minutes, puis laisser refroidir avant utilisation.

Remarque : Le mélange de protéines étalons a déjà été traité.

2. Déposer **10 μ L par puits** en "sous-marin" de chacune des protéines à étudier

2.4 Récupération des gels

Dissocier ensuite l'ensemble gel/plaque, et récupérer soigneusement le gel dans une boîte contenant de l'eau.

2.5 Coloration / Décoloration des gels

1. Préparer la solution de coloration (CBB staining solution):

- Peser 100 mg de poudre de bleu de Coomassie
- Dissoudre cette poudre dans 250 mL d'eau distillée
- Mélanger pendant 2 à 4 heures
- Introduire 2 mL d'acide chlorhydrique concentré et mélanger 1 à 2 minutes.

2. Rinçage :

- Mettre le gel dans de l'eau distillée puis passer l'ensemble au micro-onde durant 30sec
- Après le passage au micro-onde, poser le tout sur un mélangeur (5')
- Changer l'eau et recommencer les deux étapes précédentes 3 à 4 fois. Il faut absolument éliminer le SDS pour éviter une coloration parasite.

3. Coloration :

- Mettre du colorant bleu dans la boîte à la place de l'eau puis 15 sec au micro-onde
- Poser l'ensemble sur le mélangeur (15 à 30 min).

4. Rinçage du bleu :

- Rincer abondamment le gel avec de l'eau distillée.

5. Conservation des gels

- Les gels peuvent être conservés entre deux feuilles de cellophanes.

Astuce de Bernard : tremper au préalable les feuilles de cellophanes dans du glycérol à 10%