

## SEPARATION DE PROTEINES PAR ELECTROPHORESE

### Principe

En milieu basique, les protéines sont chargées négativement. Lorsqu'un mélange de protéines est soumis à un champ électrique, les protéines migrent à une distance caractéristique par rapport à la ligne de dépôt, en fonction de leur taille et de leur charge.

Le rouge Ponceau est un colorant spécifique des protéines, ayant une grande affinité pour elles.

### Protocole

#### **Mise en place des bandes d'acétate de cellulose dans la cuve :**

1. **Remplir** la cuve à électrophorèse au 2/3 avec la solution tampon, de chaque côté, en évitant tout débordement.

***Ne jamais toucher les bandes d'acétate avec les doigts, sinon des traces apparaîtront à la coloration.***

2. **Sortir** les bandes des bacs à l'aide d'une pince, les placer entre 2 feuilles de papier filtre et les sécher à l'aide d'un mouvement rapide.

3. **Fixer** les bandes d'acétate de cellulose sur le portoir de la cuve, tendues autant que possible (sans les déchirer bien entendu), de façon à ce que la face mate qui est absorbante soit sur le dessus (encoche de la bande tenue dans la longueur en bas à droite). Les bandes doivent être parallèles entre elles et perpendiculaires à l'axe du portoir pour permettre une migration des protéines dans l'axe du portoir.

4. **Poser** le portoir dans la cuve et **vérifier** que les extrémités de chaque bande trempent dans le tampon de la cuve.

#### **Dépôt du mélange**

1. **Tremper** l'applicateur dans le mélange, **déposer** rapidement l'applicateur près du bord, du côté de l'encoche et perpendiculaire au grand axe de la bande d'acétate (faire une application bien nette).

#### **Mise en route de l'électrophorèse**

1. **Fermer** la cuve avec le couvercle, côté de la cathode (pôle négatif, borne noire) près du bord avec encoche.

2. **Relier** la cuve au générateur à l'aide du cordon. **Respecter** la correspondance des couleurs entre cordons et douilles.

3. **Régler** la tension de l'alimentation sur 160V.

4. **Raccorder** l'appareil au secteur. **Mettre** sous tension. La migration démarre et durera une heure.

#### **Coloration au rouge Ponceau des protéines, décoloration des bandes et transparisation**

1. **Verser** le colorant dans un bain.

2. **Immerger** les bandes 10 min face à traiter vers le liquide.

3. **Décolorer** les bandes en les plongeant successivement dans deux bains d'acide acétique 5 %. Seules les traces laissées par les protéines apparaîtront.

4. **Immerger** enfin les bandes dans un 4<sup>ème</sup> bain avec la solution de transparisation. **Retirer** les dès qu'elles deviennent translucides.

5. **Poser** les bandes sur des plaques en verre et **laisser sécher** à l'air libre.