

Électrophorèse sur bandes d'acétate de cellulose

Corps humain et santé

Chapitre 3A - Le maintien de l'intégrité de l'organisme - Fiche technique et aide à l'interprétation - TP 3A2

A. Objectif

- On désire repérer la présence possible d'anticorps dans un sérum de lapin récemment mis en contact avec une albumine étrangère. On utilise deux sérums de lapin :
 - un sérum de lapin L₁ ayant été récemment en contact avec un antigène BSA (albumine bovine)
 - un sérum de lapin L₂ qui n'a pas été mis en contact avec l'antigène.

B. Principe

En milieu basique, les protéines sont chargées négativement. Lorsqu'un mélange de protéines est soumis à un champ électrique, les protéines migrent vers le pôle positif et se séparent.

Les anticorps font partie des gammaglobulines

Le rouge Ponceau a une très forte affinité pour les protéines dont il est le colorant spécifique.

C. Protocole expérimental

1. Mise en place des bandes d'acétate de cellulose dans la cuve.

- a) Remplir la cuve à électrophorèse au moins 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 de doigts imprégnées de protéines apparaîtront à la coloration.

- b) À l'aide d'une pince plate, sortir une bande des bacs de coloration contenant du tampon où elles ont séjourné 15 minutes pour éliminer le méthanol dans lequel elles étaient conservées.
- c) Placer la bande entre 2 feuilles de papier-filtre et la sécher à l'aide d'un mouvement rapide.
- d) Fixer les bandes d'acétate de cellulose sur le portoir de la cuve, tendues le plus possible, de façon à ce que la face mate qui est absorbante soit sur le dessus (encoche de la bande en bas à droite). Comme deux binômes peuvent travailler dans la même cuve, vérifier que les bandes sont parallèles entre elles et perpendiculaires à l'axe du portoir pour permettre une migration des protéines dans l'axe du portoir.
- e) Poser le portoir dans la cuve et vérifier que les extrémités de la bande trempent dans le tampon de la cuve.

2. Dépôt des sérums

Chaque binôme utilise une bande d'acétate de cellulose.

- a) Tremper l'applicateur dédié L1 puis L2 dans le sérum de lapin L1 et L2.
- b) Déposer l'applicateur à un centimètre du bord de la bande du côté de la cathode (borne noire) et perpendiculairement à l'axe du portoir. Faire une application bien nette.

Attention les 2 dépôts se font sur la même bande, en veillant à ce que les tâches ne se touchent pas.

3. Mise en route de l'électrophorèse

- a) Fermer la cuve avec le couvercle : côté cathode (pôle négatif, borne noire), du côté des dépôts.
- b) Relier la cuve au générateur à l'aide du cordon. Respecter la correspondance des couleurs entre cordons et douilles.
- c) Régler la tension de l'alimentation sur 160V.
- d) Raccorder l'appareil au secteur.
- e) Mettre sous tension. Appuyer sur le bouton démarrer. Les voyants du générateur doivent rester allumés. La migration démarre et durera **une heure**.

4. Arrêt de la migration et coloration des bandes

- a) Remplir le premier compartiment du bac de coloration avec du rouge Ponceau et les bacs suivant d'acide éthanoïque à 5%.
- b) Pour arrêter l'électrophorèse, débrancher les cordons reliés à la cuve et retirer le couvercle en le faisant coulisser. Sortir le portoir de la cuve et dégager les baguettes de fixation de leur logement.
- c) Prendre la bande à l'aide d'une pince plate pour la coloration.
- d) Immerger la bande dans le compartiment contenant le rouge Ponceau. Laisser la se colorer pendant environ 1 minute.
- e) Puis tremper la bande dans des bains successifs d'acide éthanoïque à 5 %. Changer la bande de compartiments lorsque la solution d'acide éthanoïque est saturée en rouge Ponceau. Dans le dernier compartiment d'acide éthanoïque à 5 % la bande doit être redevenue blanche, seules les protéines apparaissent sous forme de taches rouges.
- f) Sortir la bande du dernier compartiment et la sécher entre deux feuilles de papier filtre.

5. Résultats attendus

Les différentes protéines constituant le sérum sont visibles sous forme de bandes rouges séparées les unes des autres.

6. Lecture optique des résultats des électrophorèses

- On numérise au scanner les résultats obtenus sur les bandes d'acétate de cellulose (il est possible de régler *légèrement* le contraste avec réglage de niveaux dans un logiciel de traitement d'image mais il faut éviter d'utiliser les outils d'amélioration de netteté) puis on sauvegarde au format .jpg.
- On utilise le logiciel *Mesurim* afin de lire optiquement la densité de coloration sur les bandes. Se reporter à la fiche technique Mesurim.
- Pour ne pas avoir à attendre la fin de l'électrophorèse, on utilisera une image numérisée « *electroserum1.jpg* » obtenue lors de TP précédents avec les sérums L₁ et L₂.
- Suivre les consignes de la *fiche technique Mesurim* pour compléter et imprimer la fiche élève qui sera interprétée avec l'aide qui suit et jointe à la fiche T.P.

7. Aide à l'interprétation des résultats de la lecture optique des électrophorèses

Résultat de la comparaison de 3 protéines du sang avec le logiciel Rastop.

	Albumine 1AO6	α 1 macroglobuline	Anticorps humain γ globuline
Forme	2 pelotes jointes	Le signe ∞	Y
Nombre de chaînes	3 dont A et B	3 dont A et B	5 dont H et I et L et M
Nombre d'acides aminés par chaîne	A (578) et B (578) = 1156	A (134) et B (130) = 264	H et I (452) et L et M (216) = 1336
Nombre d'acides aminés chargés	388	69	256
% d'acides aminés chargés / nombre total d'a.a	33,6%	26,1%	19,2%

►► Expliquer pourquoi ces protéines migrent à des endroits différents le long de la bande d'électrophorèse ?

►► Sachant que des β globulines sont intercalées entre les α et les γ globulines, nommer sur les graphes de la fiche élève les 4 types de molécules mis en évidence et localiser les molécules dont la quantité varie avec la présence d'antigènes. À la lumière de ces informations interpréter les lectures optiques des électrophorèses.