

# 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 L<sub>1</sub> ayant été récemment en contact avec un antigène BSA (albumine bovine)
  - un sérum de lapin L<sub>2</sub> 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 L<sub>1</sub> et L<sub>2</sub>.
- 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	$\alpha$ 1 macroglobuline	Anticorps humain $\gamma$ globuline
Forme	2 pelotes jointes	Le signe $\infty$	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  $\beta$  globulines sont intercalées entre les  $\alpha$  et les  $\gamma$  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.