

Électrophorèse sur bandes d'acétate de cellulose

Corps humain et santé - Chapitre 3A - Le maintien de l'intégrité de l'organisme - Fiche technique - TP 3A2

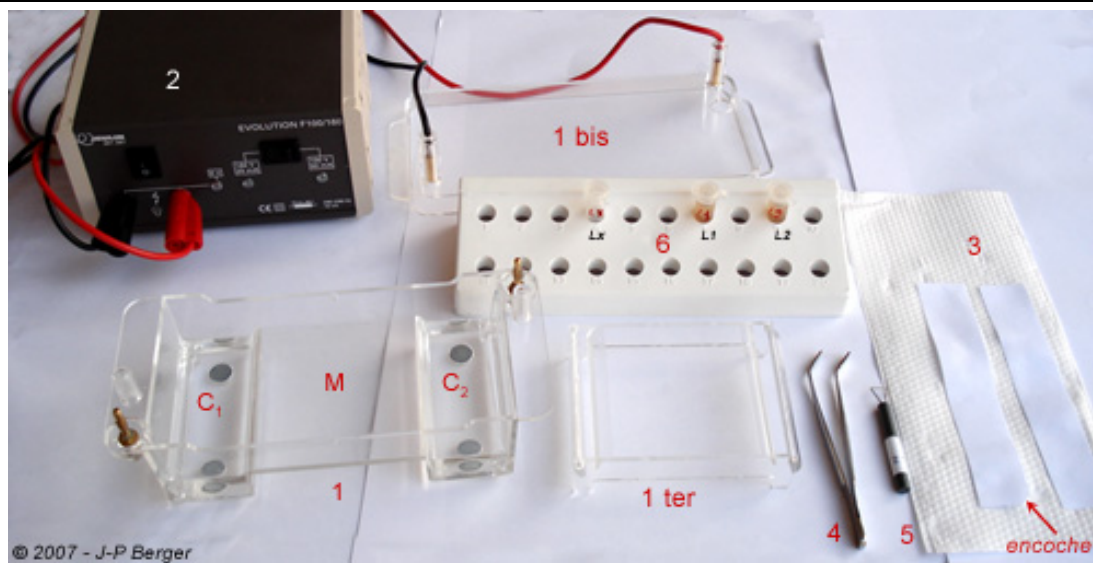
A. Principe

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 gamma globulines.

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

B. Protocole expérimental



- Cuve à électrophorèse (1), son couvercle (1 bis) et le support de bandes d'acétate de cellulose (1 ter)
- Alimentation (2)
- Bandes d'acétate de cellulose placée avec l'encoche en bas à droite (3)
- Pince plate (4)
- Applicateur (5)
- Portoir à tubes Eppendorf avec les 3 sérums

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

- a) Remplir la cuve à électrophorèse (1) au 2/3 avec la solution tampon, de chaque côté (compartiments C1 et C2), en évitant tout débordement sur la partie centrale (M).

Ne jamais toucher les bandes d'acétate (3) avec les doigts, sinon des traces de doigts imprégnées de protéines apparaîtront à la coloration.

- b) À l'aide d'une pince plate (4), sortir les bandes des bacs de coloration contenant du tampon où elles ont séjourné 15 minutes pour éliminer le méthanol dans lequel elles étaient conservées.
- c) Placer les bandes entre 2 feuilles de papier-filtre et les sécher à l'aide d'un mouvement rapide.
- d) Fixer les bandes d'acétate de cellulose sur le portoir de la cuve (1 ter), 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). 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.
- e) Poser le portoir dans la cuve et vérifier que les extrémités de chaque bande trempent dans le tampon de la cuve.



2. Dépôt des sérums

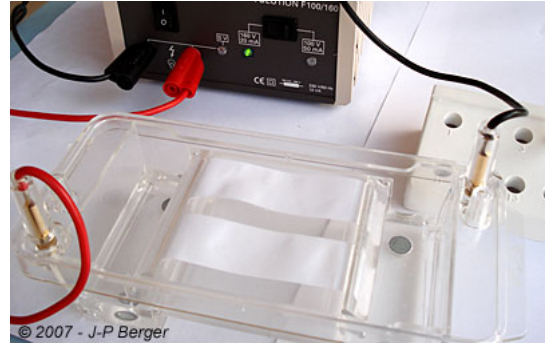
On utilise deux bandes d'acétate de cellulose.

- a) Tremper l'applicateur dédié (5 ou une lamelle couvre-objet) dans le sérum de lapin Lx à tester, déposer rapidement l'applicateur à un centimètre du bord de la bande, du côté de la cathode (borne noire) et perpendiculairement à l'axe du portoir en prenant appui sur le cadre du portoir. Faire une application bien nette.
- b) Faire de même sur l'autre bande pour le sérum L1 et le sérum L2 (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

- Fermer la cuve avec le couvercle (1 bis) : côté cathode (pôle négatif, borne noire), du côté des dépôts.
- Relier la cuve au générateur à l'aide du cordon. Respecter la correspondance des couleurs entre cordons et douilles.
- Régler la tension de l'alimentation sur 160V (2).
- Raccorder l'appareil au secteur.

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

- Remplir le premier compartiment du bac de coloration avec du rouge Ponceau et les bacs suivant d'acide éthanoïque à 5%.
- 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.
- Prendre chaque bande à l'aide d'une pince plate pour la coloration.
- Immerger la bande dans le compartiment contenant le rouge Ponceau. Laisser la se colorer pendant environ 1 minute.
- 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.
- 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	$\alpha 1$ 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'acide 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.