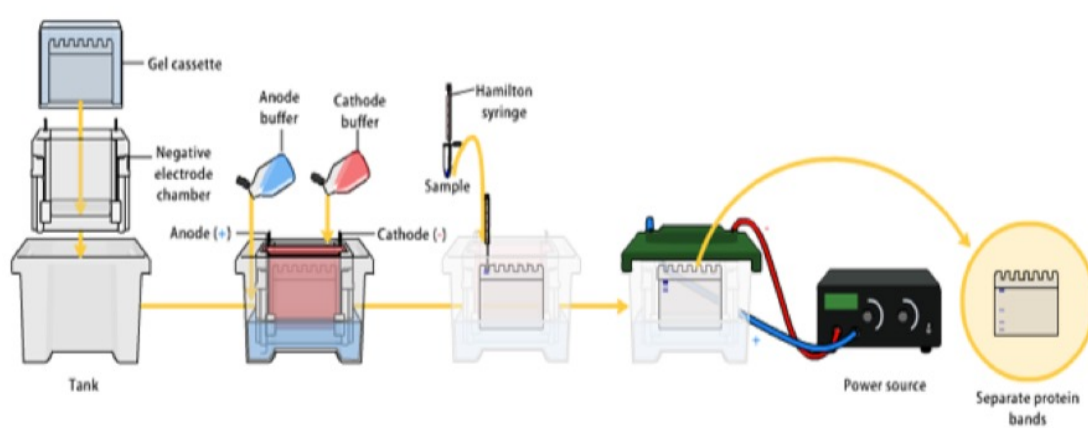


Techniques d'Analyse Biologique

Chapitre I



Contenu de la matière:

I Méthodes biochimiques de séparation

- Electrophorèse
- Chromatographie

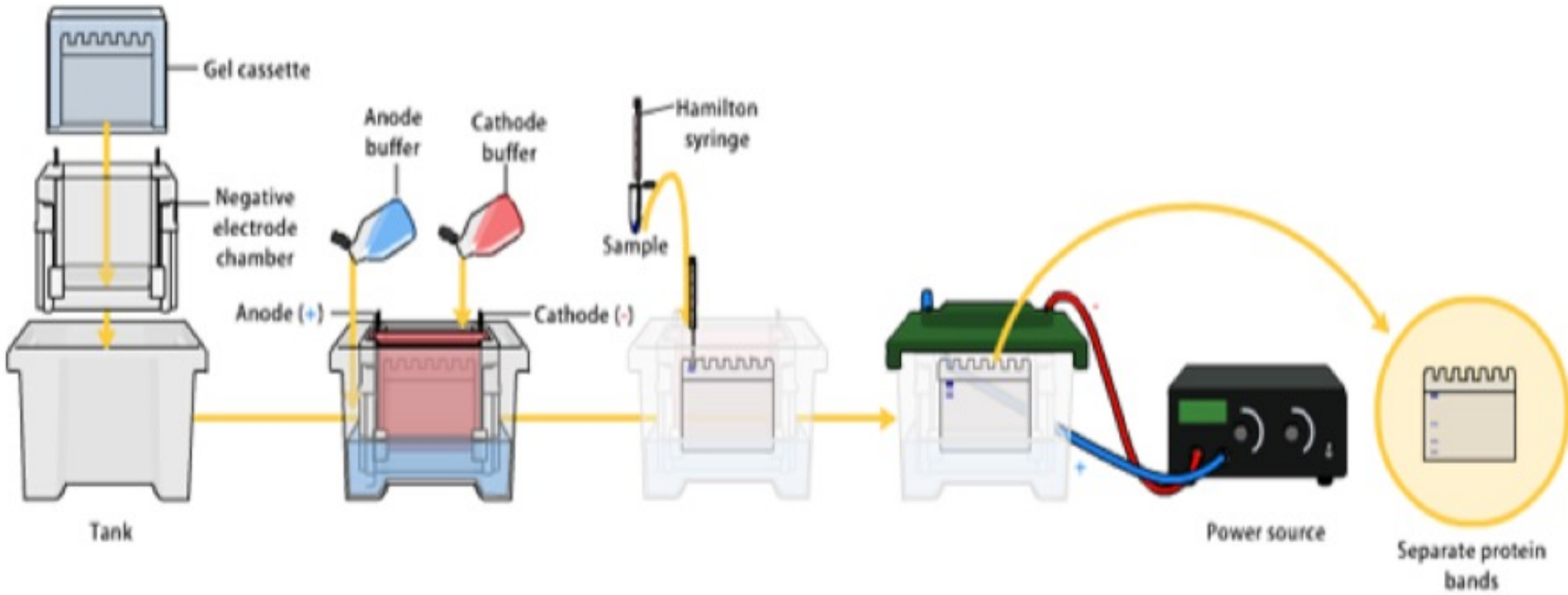
II Méthodes physiques de séparation

- Centrifugation
- Dialyse

III. Méthodes spectrales

- Spectroscopie UV- visible
- Spectroscopie infrarouge

I-1 Electrophorèses SDS page (Sodium dodécyl sulfate)



I-1 Electrophorèses SDS page (Sodium dodécyl sulfate)

L'électrophorèse SDS-PAGE (électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du dodécylsulfate de sodium) est une technique consistant à faire migrer des protéines dans un gel, sous l'influence d'un champ électrique, permettant ainsi leur séparation. Cette électrophorèse est réalisée en conditions dénaturantes, c'est-à-dire en présence de SDS, de β -mercaptoéthanol pendant ébullition des extraits. Le SDS a la particularité de conférer aux protéines une charge globale négative permettant ainsi de les séparer selon leur poids moléculaire.

1^{ère} étape : Dénaturation des protéines

Dans un tube eppendorf 0.5 ml, combiner 3 volumes d'échantillon protéique à un volume de tampon d'échantillon 4 X contenant β -mercaptoéthanol 10% (v/v).

Chauffer à 100°C pendant 3 minutes.

Tampon d'échantillon 4 X

Tris 250 mM	1.51 g Tris (PM=121.1)
Glycérol 20%	20 ml glycérol 50%
SDS 4%	20 ml SDS 10%

Ajuster le pH à 6.8

Attention : certains anticorps primaires ne requièrent pas de β -mercapthoéthanol.

La technique du gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes ("sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis" ou SDS-PAGE) a été décrite par Ulrich Laemmli en 1970. C'est l'une des techniques (et donc l'un des articles) les plus cité(e)s dans la littérature scientifique : **Laemmli, U. K. (1970) "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4" *Nature* 227, 680 – 685.**

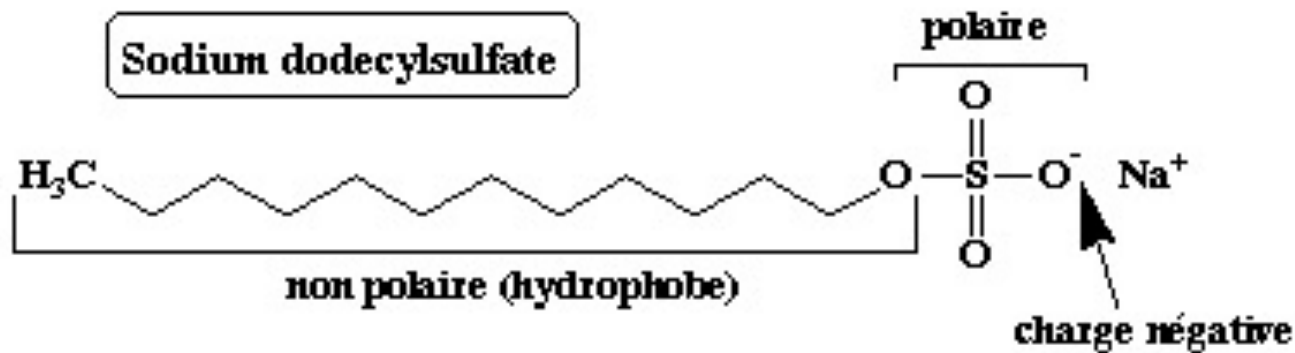
On fait bouillir un mélange de protéines en présence :

d'un agent réducteur : le β -mercaptoéthanol qui réduit les ponts disulfures.

d'un détergent anionique fort : Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) qui enveloppe les chaînes polypeptidiques des protéines de charges négatives. Ces charges se repoussent en déplient les chaînes polypeptidiques.

En conséquence :

les protéines sont dénaturées : elles ont perdu leur structure tridimensionnelle native
les protéines n'ont plus de pont disulfure : elles sont sous une forme monomérique



1

Protein



2

Add SDS



SDS binds to amino acid residues and gives uniform negative charge to protein with heat the protein is linearized

3



MolecularStation.com

Add Protein Sample onto SDS-PAGE Gel Lane #2 (Protein Ladder is in Lane #1)

NEGATIVE ELECTRODE

4

Electric Current



Protein Bands are separated By Size



POSITIVE ELECTRODE

Copyright 2008 MolecularStation.com

I-2 Préparation gel de polyacrylamide (SDS page)

Le gel de polyacrylamide est créé par la polymérisation d'acrylamide et de bis-acrylamide, en présence d'agents de polymérisation (TEMED (Tétraméthyléthylènediamine), persulfate d'ammonium par exemple). Plus la concentration en acrylamide est élevée, plus les pores seront petits et plus les molécules seront freinées dans le gel.

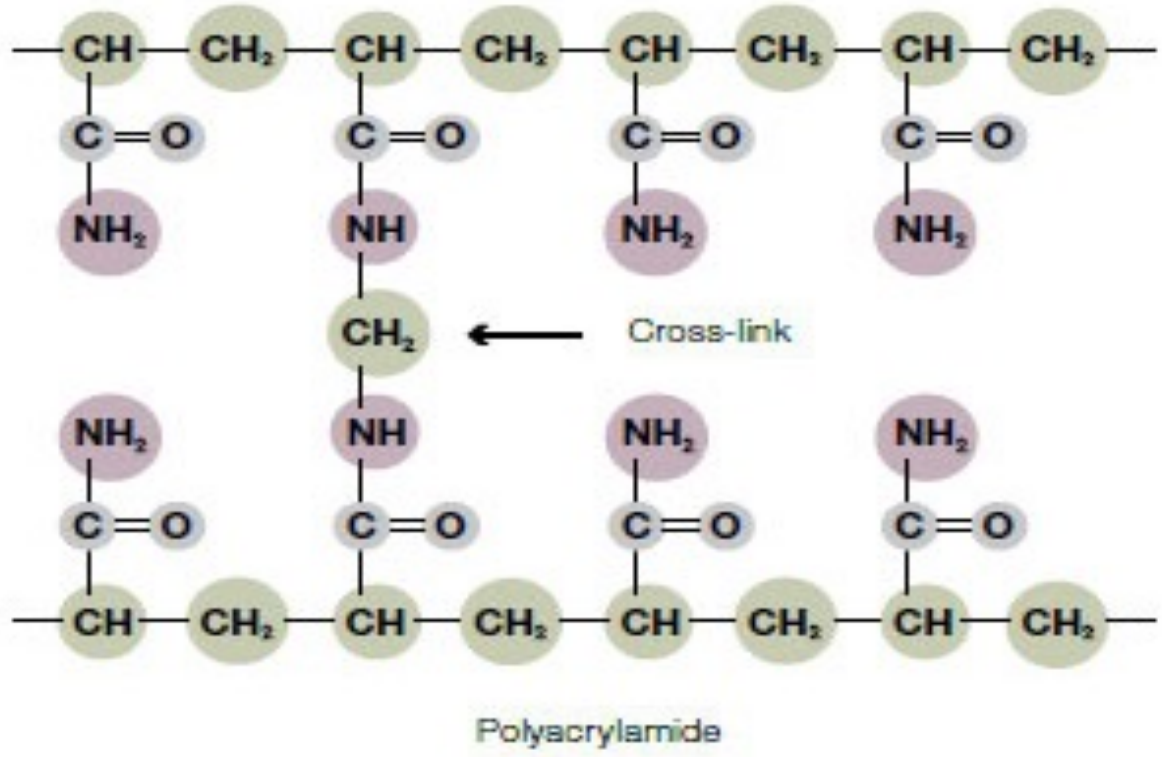
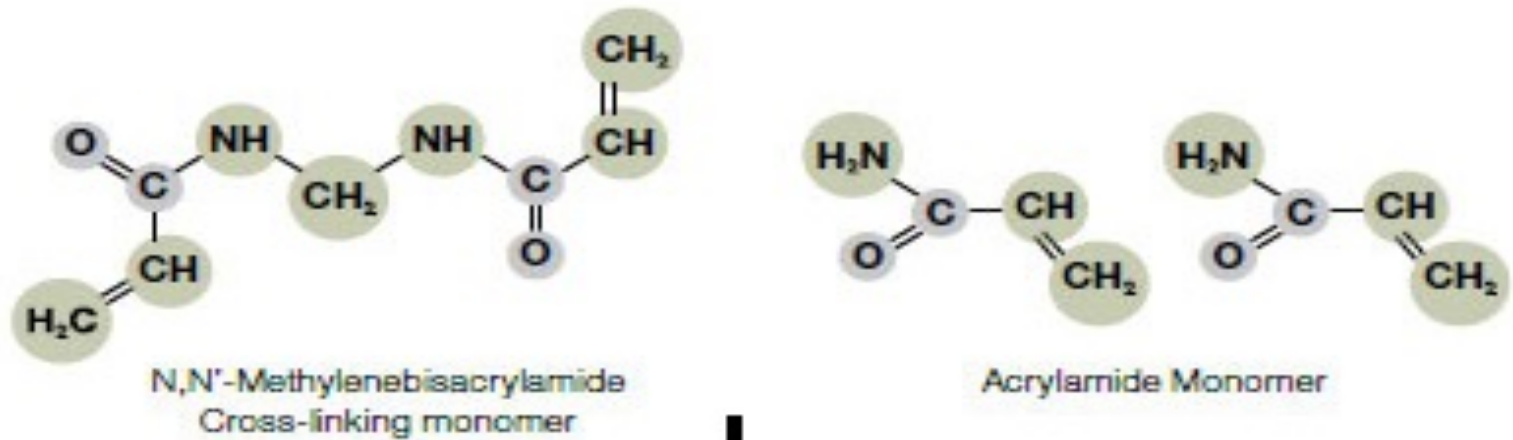
Solutions de travail

- Solution du gel de séparation

Le pourcentage en acrylamide du gel de séparation est déterminé en fonction de la taille des protéines d'intérêt.

% en acrylamide	Résolution
15%	15 à 45 kDa
12,5%	15 à 60 kDa
10%	18 à 75 kDa
7%	30 à 120 kDa
gradient progressif	60 à 212 kDa

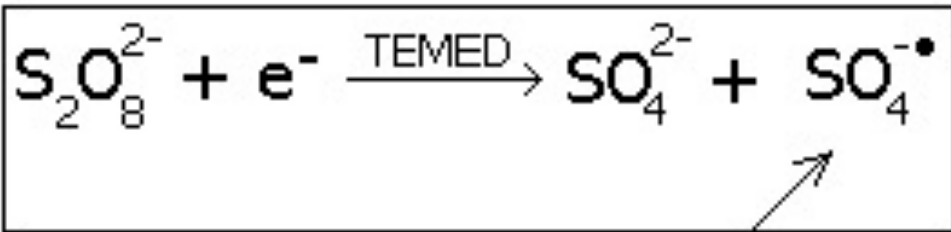
	<i>Gel 4%</i>	<i>Gel 7%</i>	<i>Gel 8%</i>	<i>Gel 10%</i>	<i>Gel 12,5%</i>	<i>Gel 15%</i>	<i>Gel 16%</i>
Acrylamide Solution A.	5 ml	8,75 ml	10 ml	12,5 ml	15,63 ml	18,75 ml	20 ml
Tris 0,375 M	2,27 g Tris (PM = 121,1)						
SDS 0,2%	1 ml SDS 10 %						
Glycérol 10%	10 ml glycérol 50%						



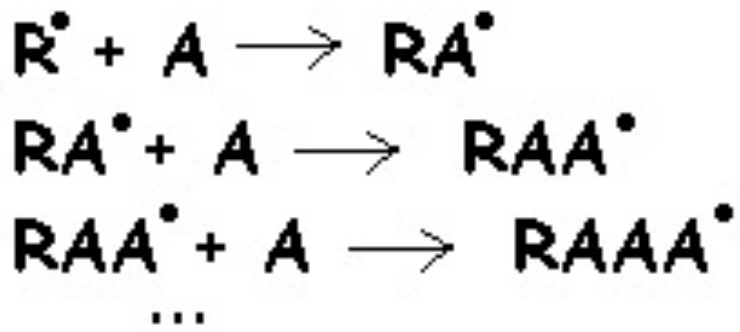
Comment ils sont formés les gels de polyacrylamide ? Le réseau de polyacrylamide est formé par polymérisation de monomère d'acrylamide (Acryl) en présence du bis acrylamide (NN'méthylène-bisacrylamide).

Le bis acrylamide est l'équivalent de 2 monomères d'acrylamide liés par un groupement méthyl. Après réaction de polymérisation on obtient un gel de polyacrylamide avec un degré de réticulation bien précis (dépendant du pourcentage du bis acrylamide). La polymérisation de l'acrylamide est un exemple de catalyse par radicaux libres initiée par l'addition de **persulfate d'ammonium** et de **TEMED** (NNN'N'-tétraméthyléthylènediamine).

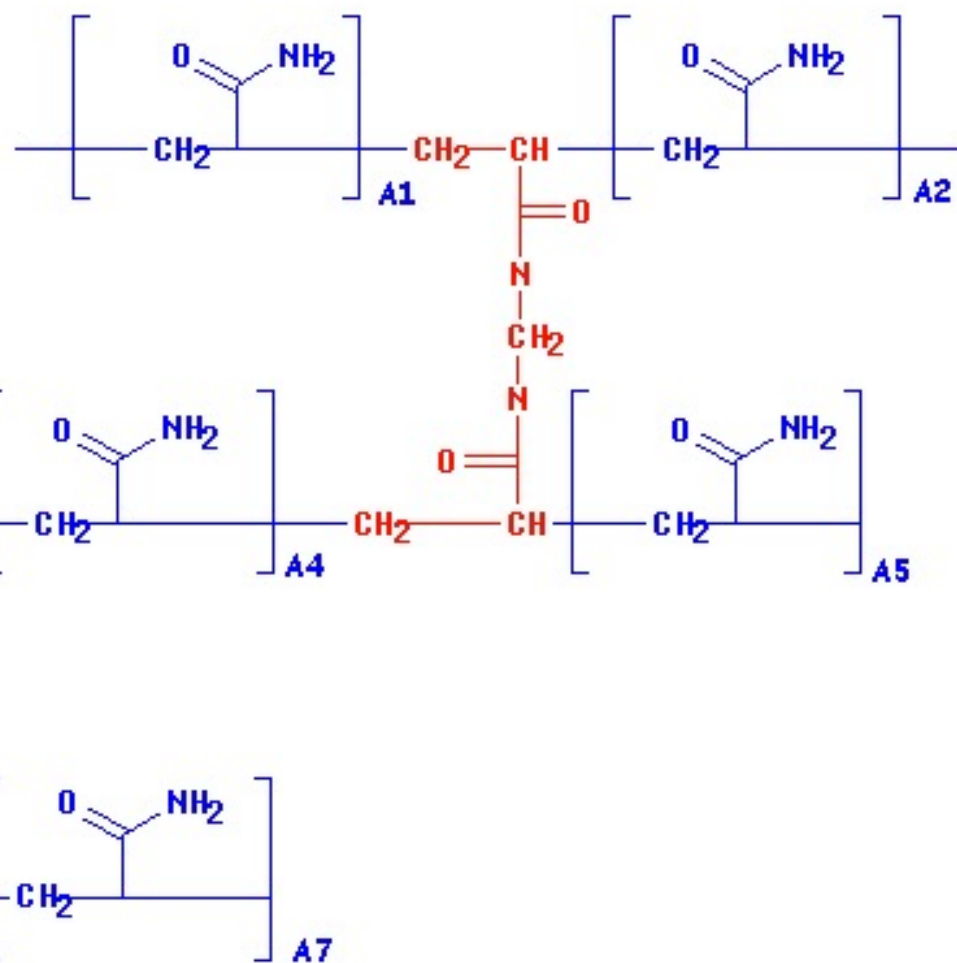
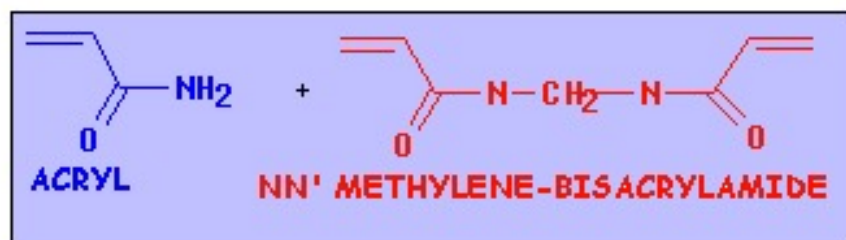
Le TEMED catalyse la décomposition des ions persulfates pour donner un radical libre R• (molécule avec un électron seul). La polymérisation du polyacrylamide (A) se fait selon les réactions suivantes:



RADICAL LIBRE R•



REACTION DE POLYMERISATION DU POLYACRYLAMIDE



I-3 : le Chargement et électrophorèse

- 1- Charger délicatement l'échantillon dans le puits en utilisant les cônes prévus à cet effet.
- 2- Prévoir la première ou la dernière ligne pour le marqueur de poids moléculaires (5 μ l).
- 3- Faire migrer à 80 volts pendant 15 minutes, puis à 95 volts. Le temps de migration dépend des poids moléculaires des protéines à séparer.

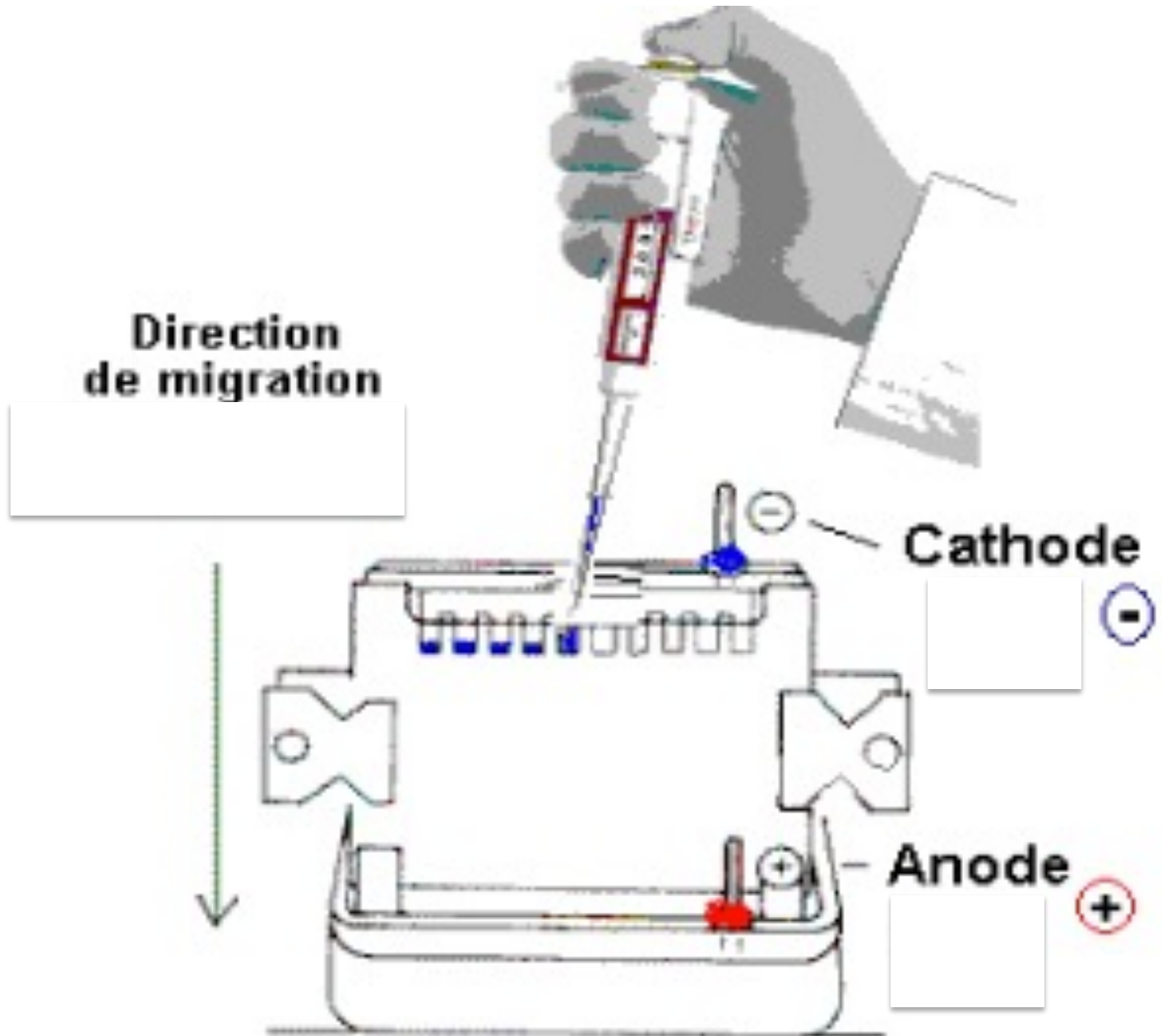
Tampon électrophorèse

Tris 25 mM	3 g Tris (PM=121.1)
Glycine 192 mM	14.41 g glycine (PM=75.07)
SDS 0.2 %	20 ml SDS 10%

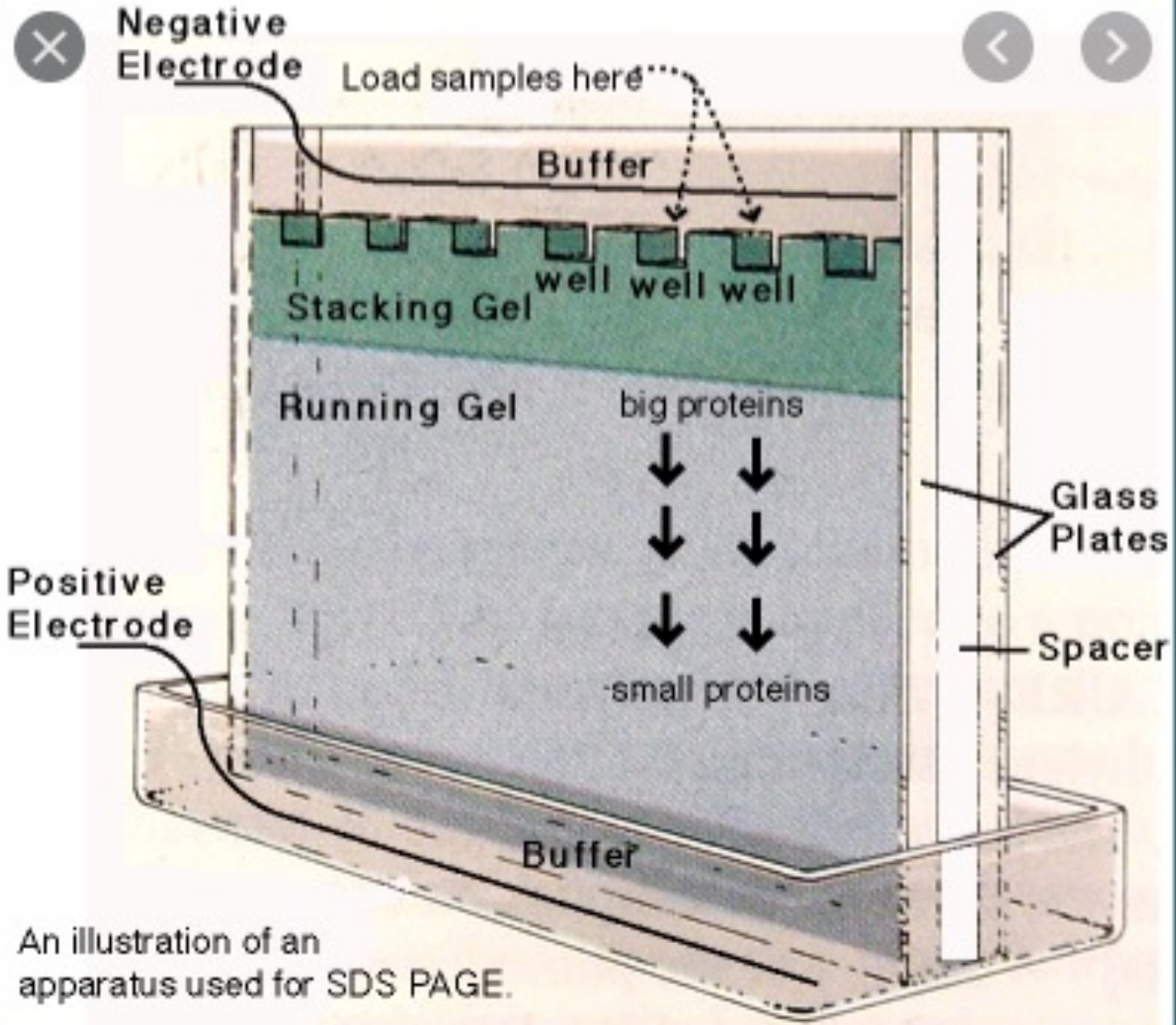
Le PH doit être compris entre 8.1 et 8.4

Électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Ce type d'électrophorèse peut être réalisé en utilisant des systèmes tampons dissociant ou non dissociant, continus ou non continus. L'agent dissociant le plus utilisé est le détergent anionique; **Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)**. Une fois fixé sur les protéines (à chaud) le SDS affecte **une charge négative (-)** à tous les polypeptides. Ces derniers migreront, donc, dans le gel de polyacrylamide selon leur taille, uniquement. Ainsi, l'expérimentateur peut déterminer le poids moléculaire (PM) des différents polypeptides en se référant à la mobilité de polypeptides de PM connus (marqueurs de PM).

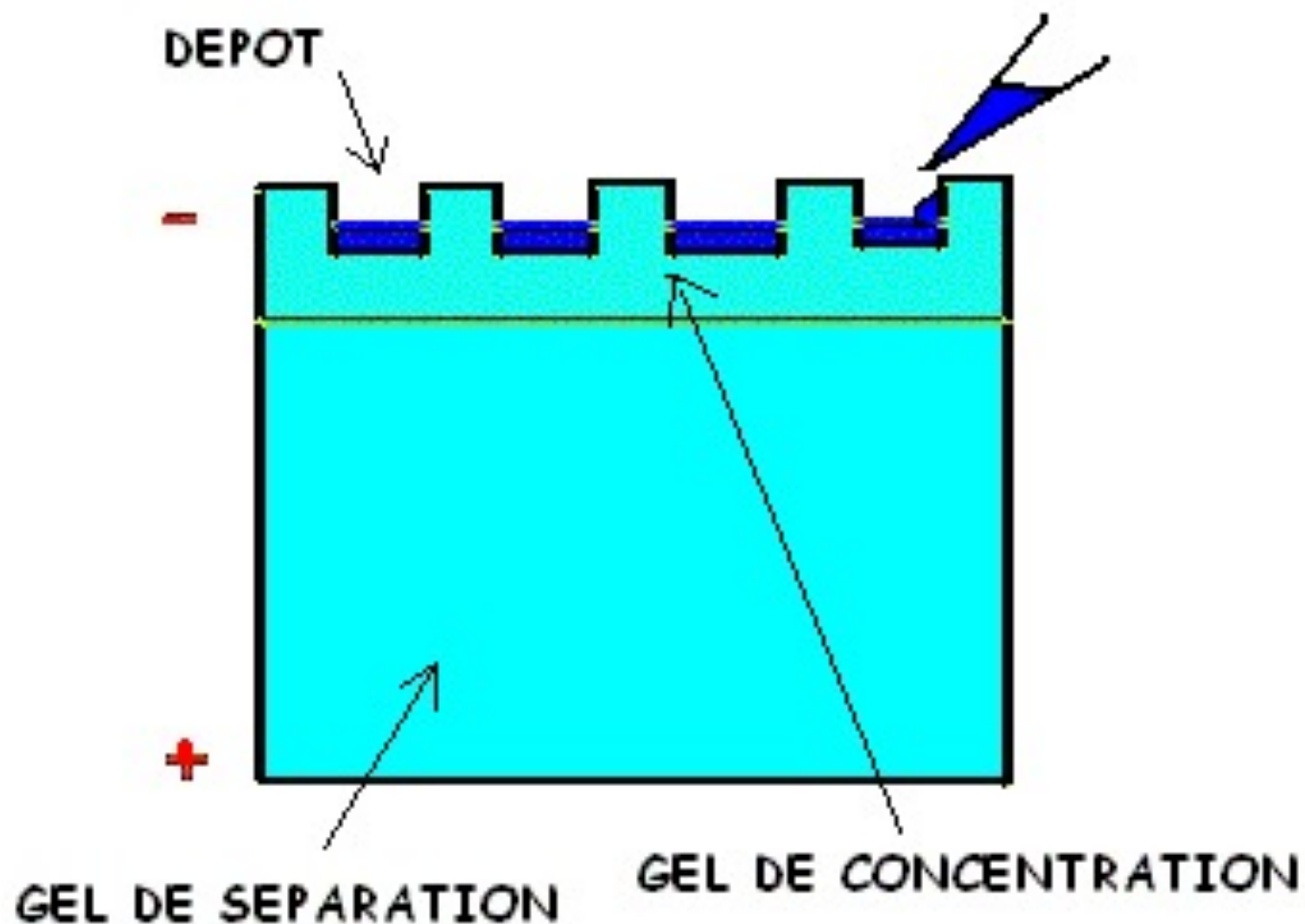
Le système tampon non dissociant est recommandé pour l'électrophorèse de protéines natives, où l'interaction subunitaire, la conformation et l'activité biologique des protéines doivent être préservées. Dans ce cas, la séparation se fait sur la base de la charge et de la taille. Les systèmes tampons discontinus (multiphasiques) utilisent différents tampons à des Ph différents.



Électrophorèse verticale



An illustration of an apparatus used for SDS PAGE.

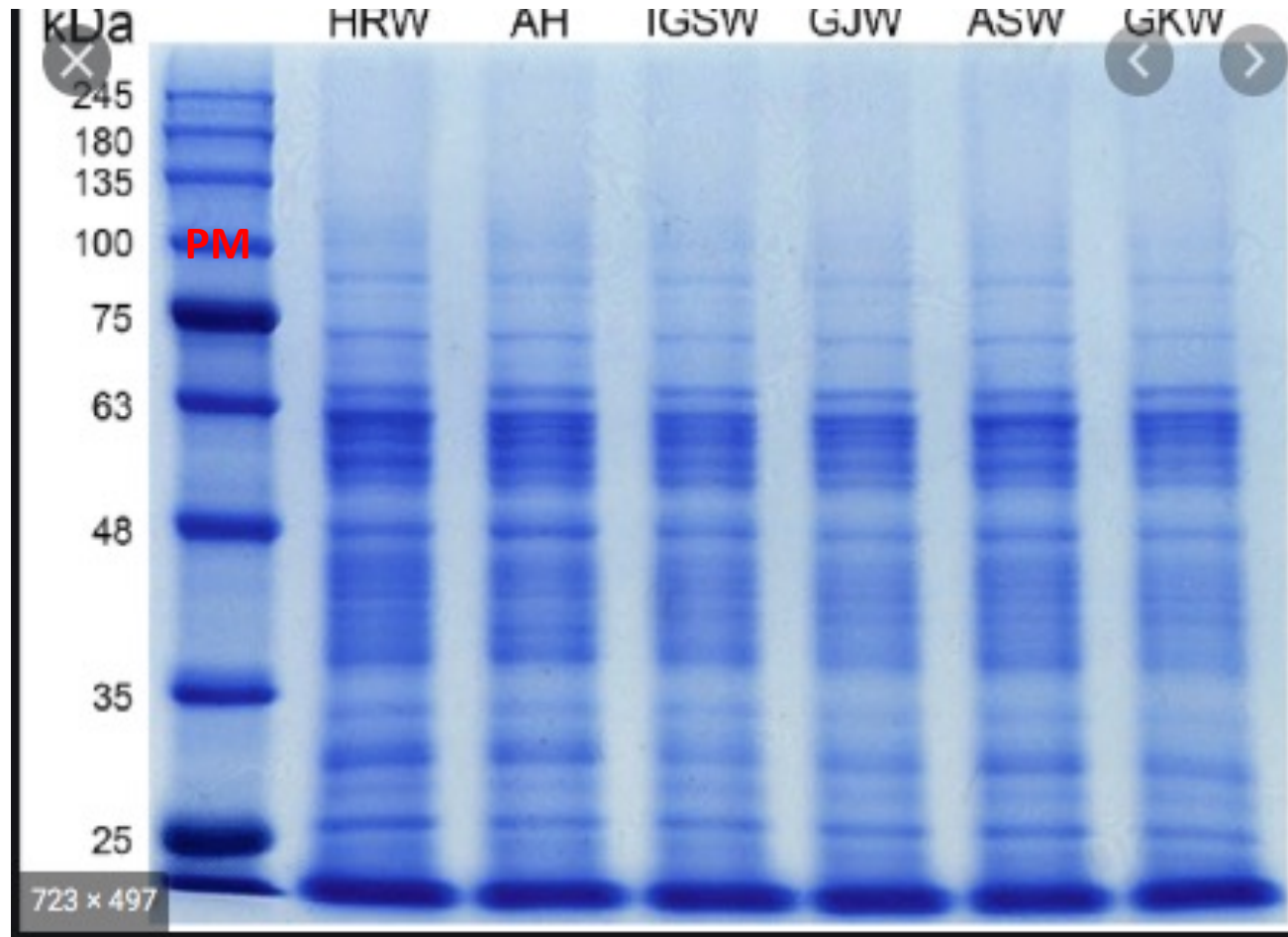


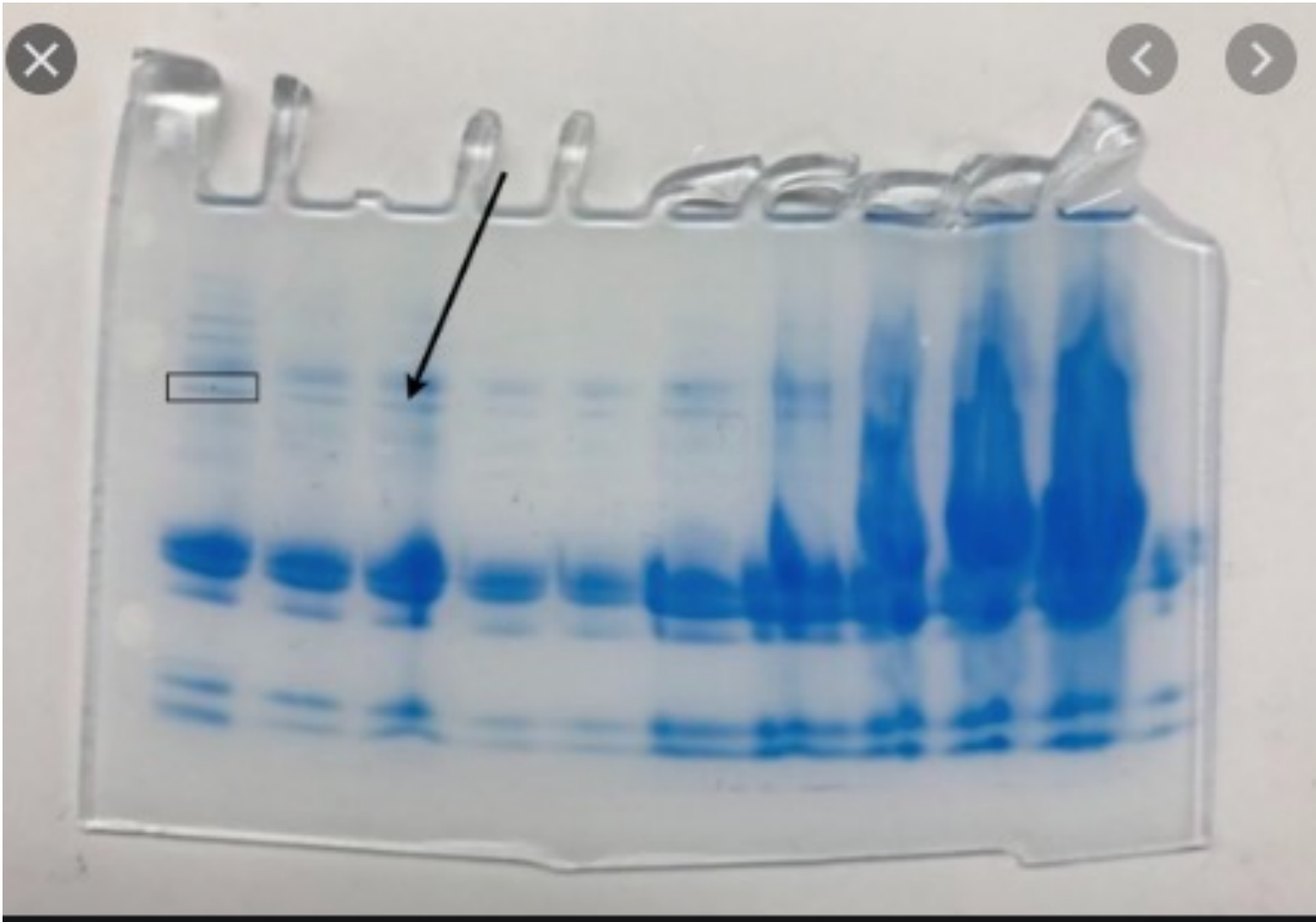
**ELECTROPHORESE VERTICALE
SUR GEL PLAT**

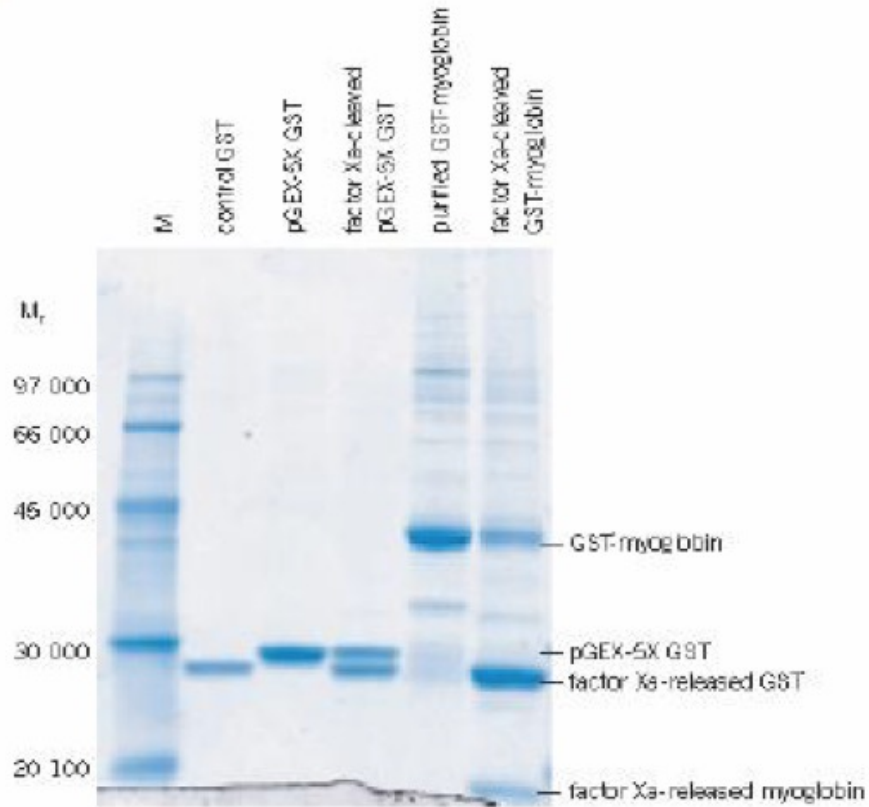
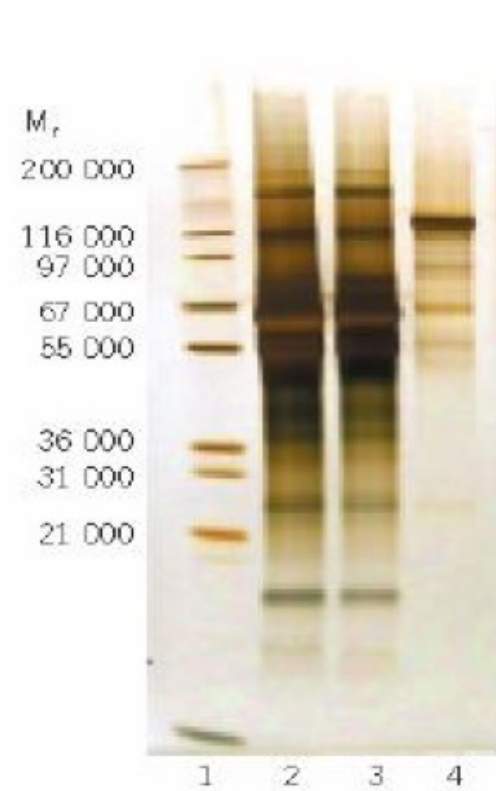
I-3 Vérification électrophorèse SDS page

Solution de coloration au bleu de Coomassie

- 10 % acide acétique
- 0,1 % Brilliant Blue G
- 45 % ΔH_2O
- 45 % méthanol



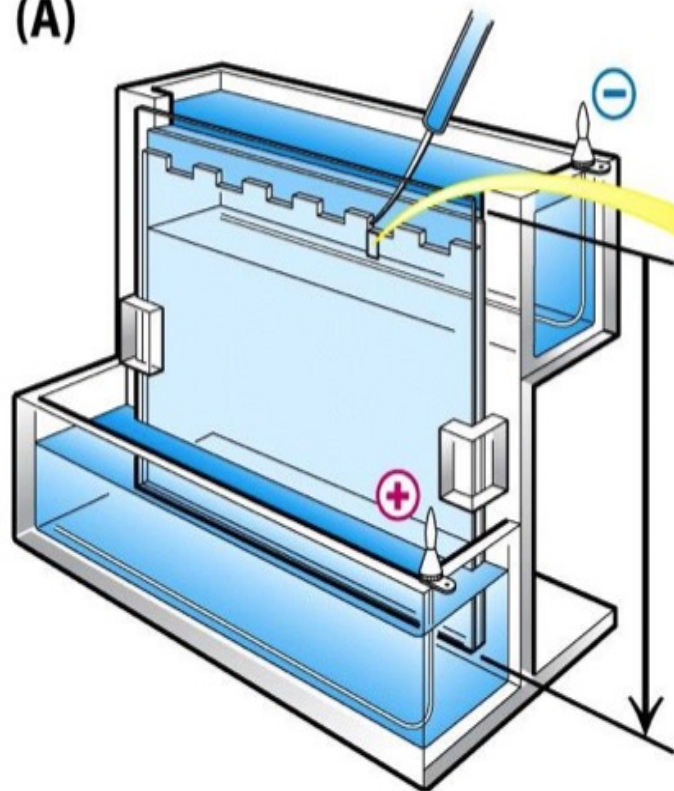


A**B**

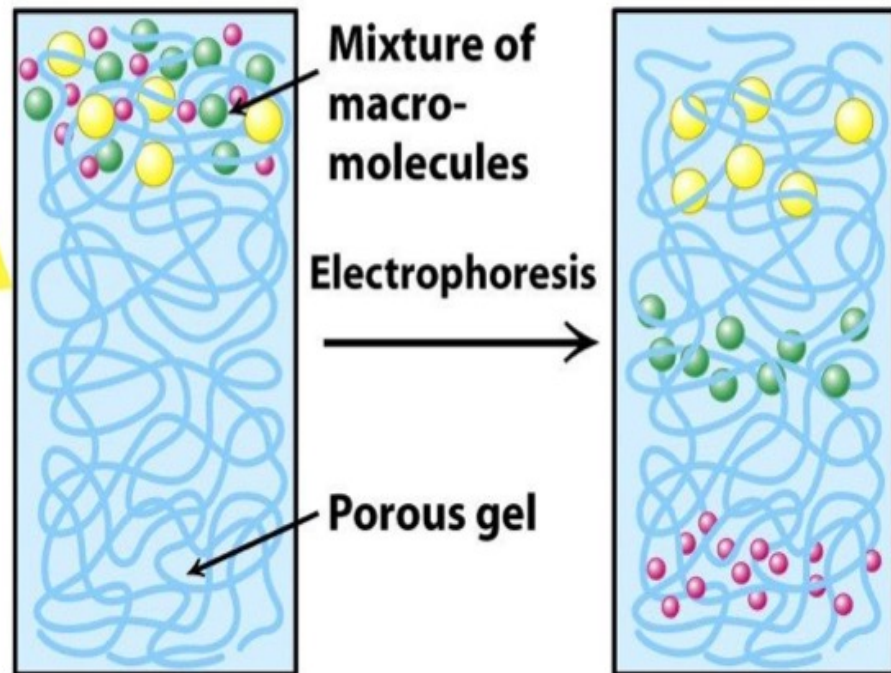
Coloration au Bleu de Coomassie brillant

Coloration au nitrate d'argent

(A)



(B)



Direction of electrophoresis

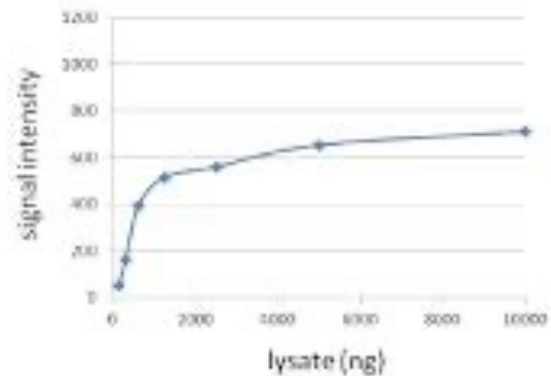
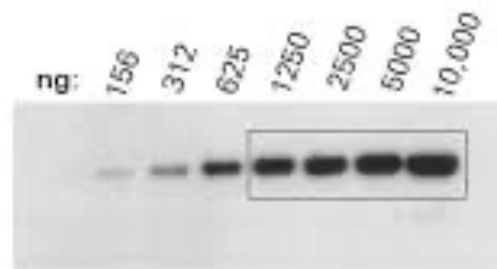
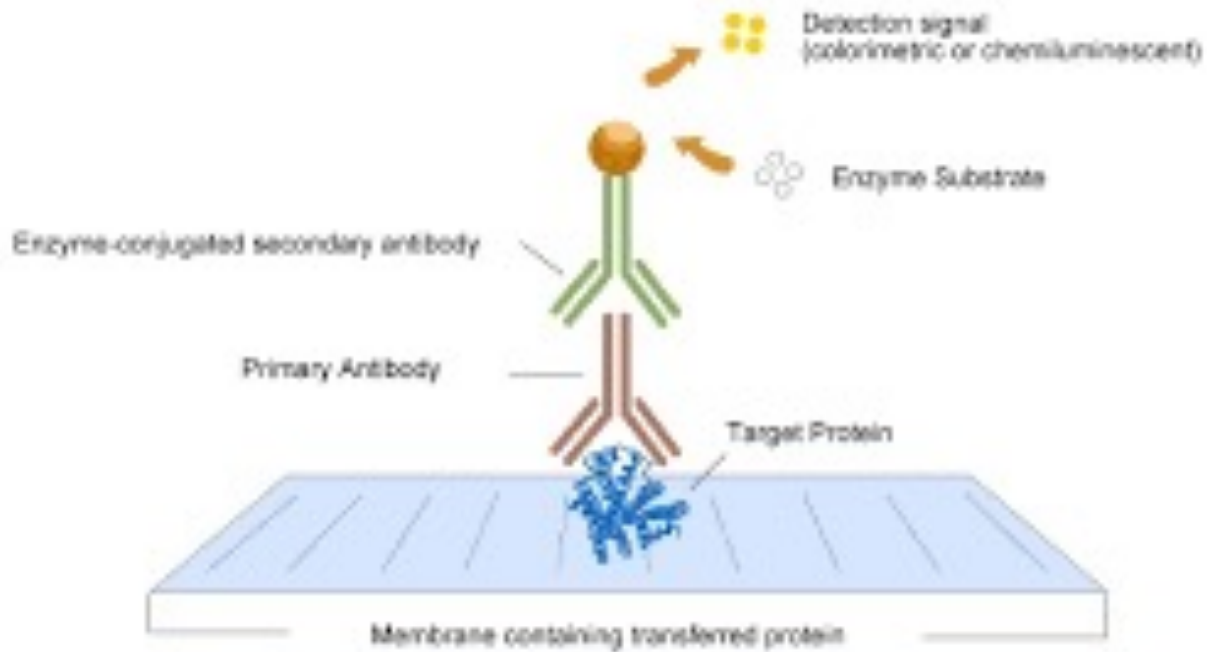
Mixture of macromolecules

Electrophoresis

Porous gel

Tests d'expression de la protéine recombinante

Detection in Western Blots

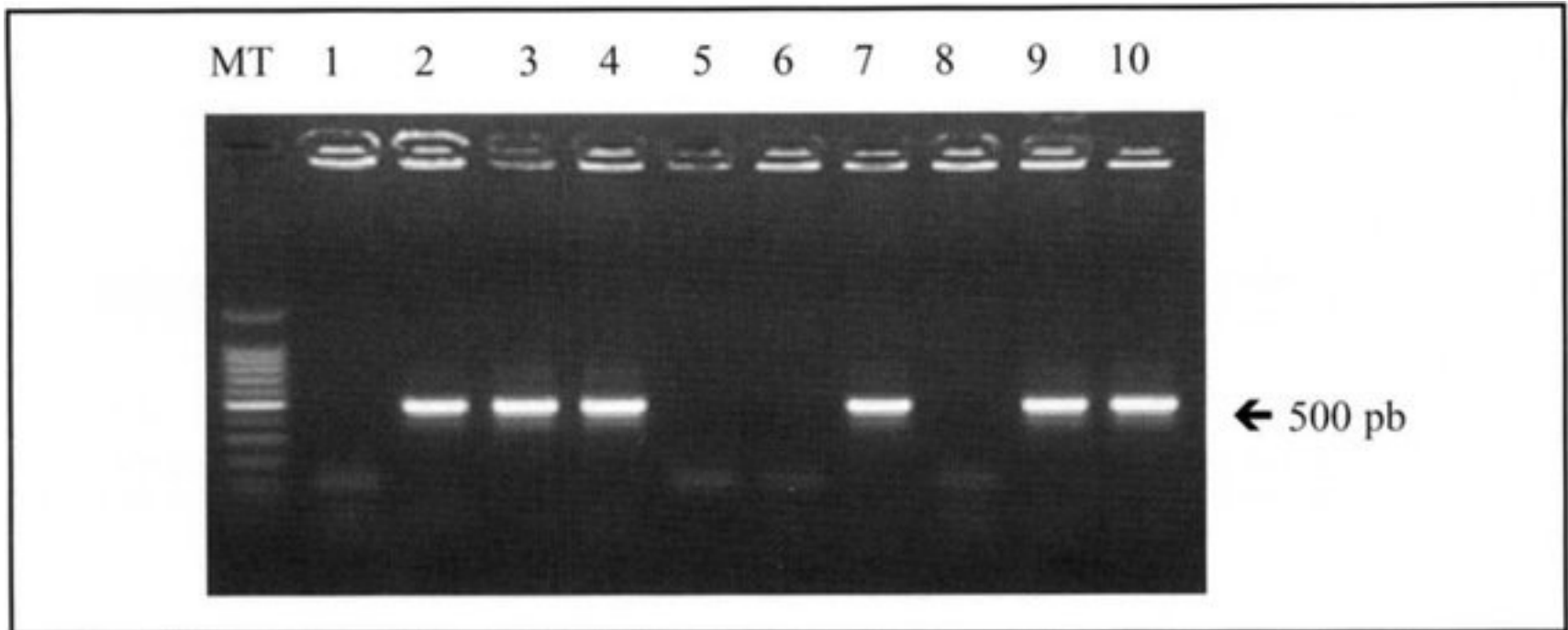


II- Electrophorèse Gel Agarose

Détection et analyse des produits PCR

Le produit d'une PCR est constitué d'un ou de plusieurs fragments d'ADN (la ou les séquences d'intérêt). La détection et l'analyse des produits peuvent être très rapidement réalisées par électrophorèse sur gel d'agarose (ou d'acrylamide). L'ADN est révélé par une coloration au bromure d'éthidium. Ainsi, les produits sont-ils visibles instantanément par transillumination aux ultraviolets (280 – 320 nm).

Exemple : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits d'amplification de 500 pb obtenus par PCR classique



• Mise en pratique de l'électrophorèse d'ADN sur gel d'agarose.

• Préparation du matériel

Gel d'agarose

1- Mélanger tampon TBE et agarose à raison de 0,8 g d'agarose pour 100 mL de tampon (la proportion d'agarose dépend de la taille des molécules d'ADN à séparer).

2- Faire fondre l'agarose au four à micro-ondes en surveillant pour éviter les projections ou au bain marie. Agiter de temps à autre pour homogénéiser le mélange.

3- Laisser refroidir jusqu'à ce qu'il devienne possible de saisir le flacon à main nue (environ 60 °C).

4- Placer les joints fournis avec la cuve pour fermer le support de gel et positionner le peigne à 1 mm du fond et à environ 1 cm de l'extrémité du support. Régler le niveau pour que le support de gel soit horizontal.

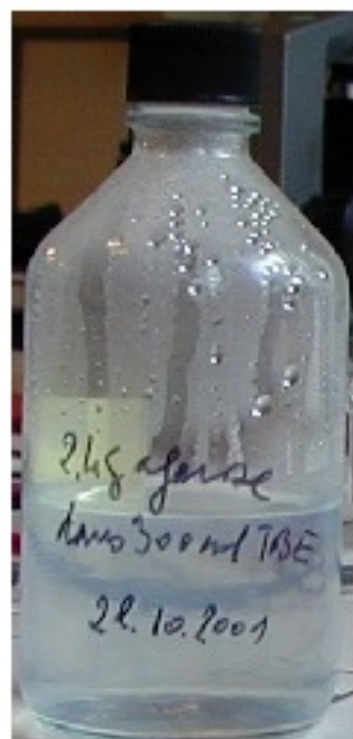
Certains peignes sont réglables avec une vis : il y a alors une cale pour régler leur hauteur.

D'autres sont préadaptés au support et ne nécessitent pas de cale.

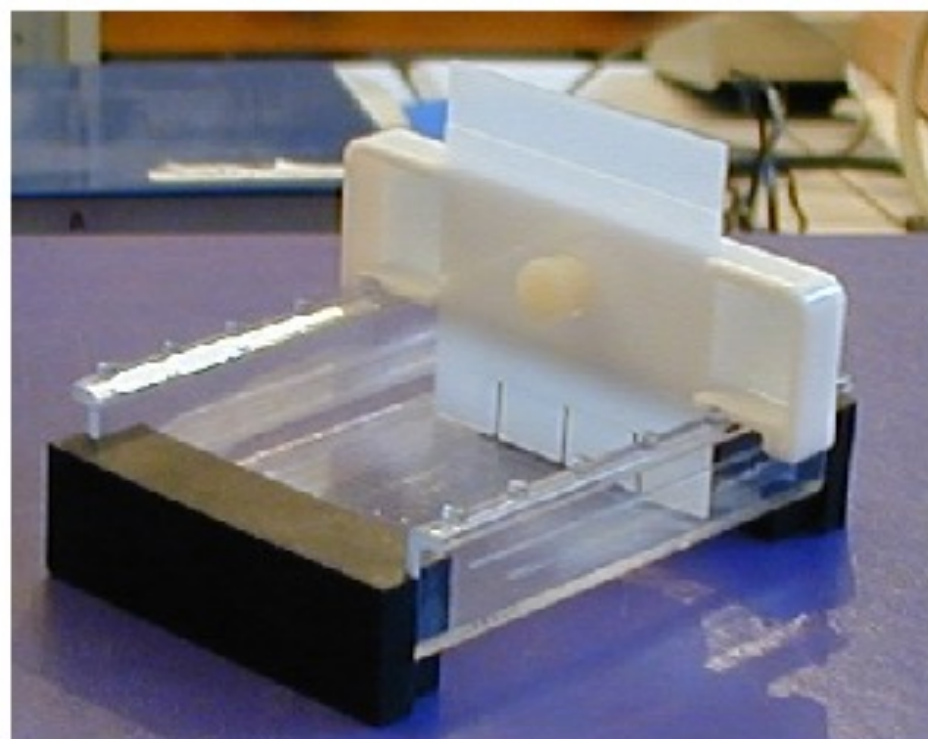
5- Couler lentement le gel sur 3 à 5 mm d'épaisseur en veillant à ce qu'il entoure bien les dents du peigne.

6- Laisser refroidir, enlever le peigne et les joints. Le gel est prêt pour le dépôt des échantillons.

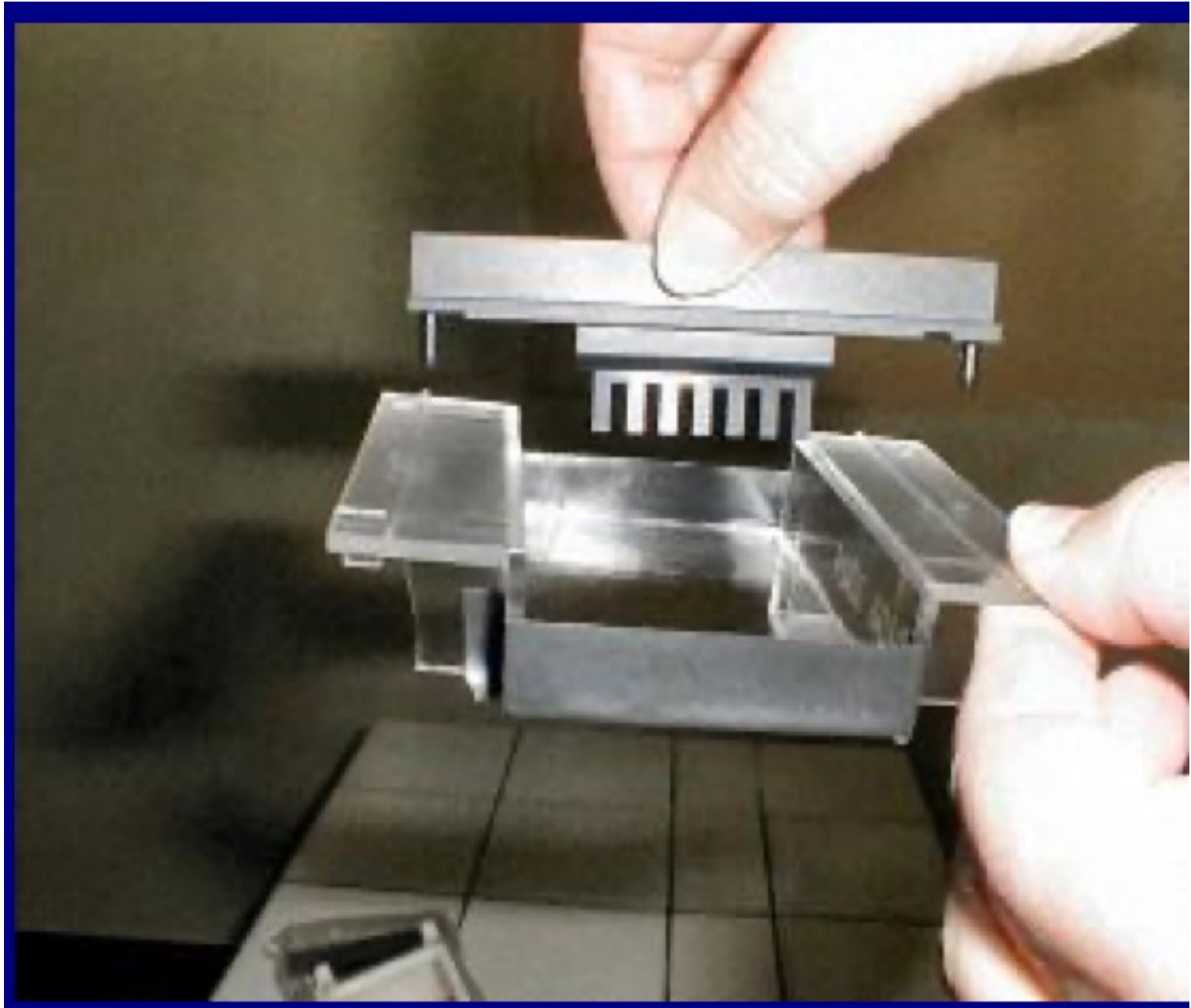
NB On peut préparer du gel à l'avance et le conserver solide au réfrigérateur dans un flacon en verre (rempli aux 2/3 maximum). Au moment de l'emploi, refondre le gel au four à micro-ondes (ouvrir le bouchon et surveiller pour éviter les projections) ou au bain-marie bouillant (ouvrir le bouchon).



Gel d'agarose
(0,8 g/100 mL)

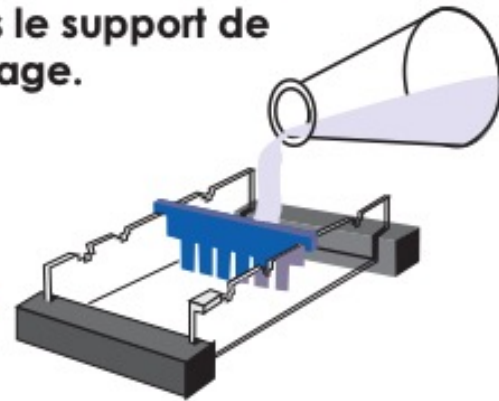


Mise en place du peigne et des joints de coulage
(minicuve pour gel 8 x 6,5 cm)

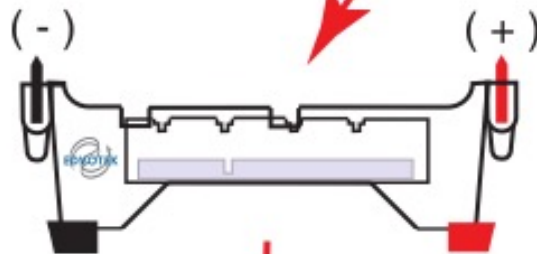




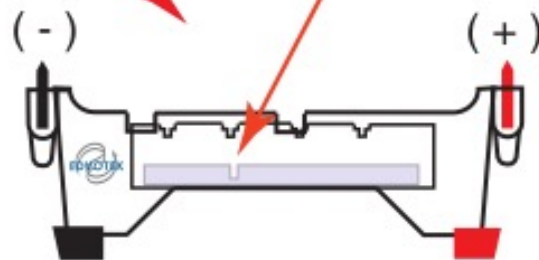
1 Préparer le gel d'agarose dans le support de coulage.



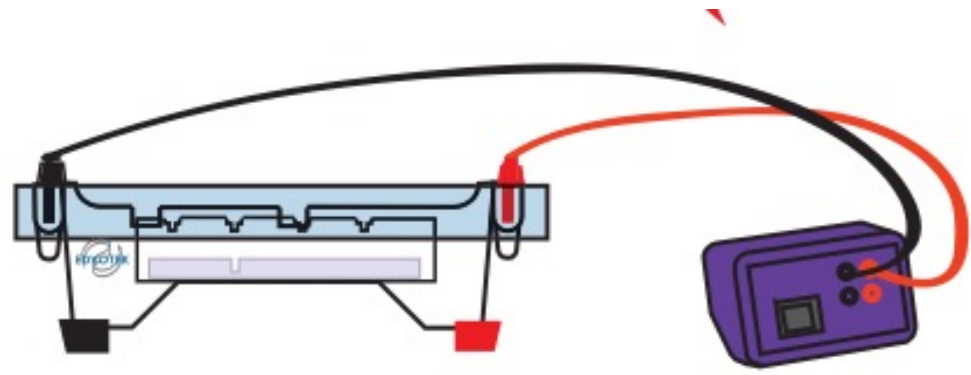
2 Enlever les vis de jointure et le peigne, puis submerger le gel dans le tampon à l'intérieur de la cassette d'électrophorèse.



3 Déposer chaque échantillon dans un puits consécutif.

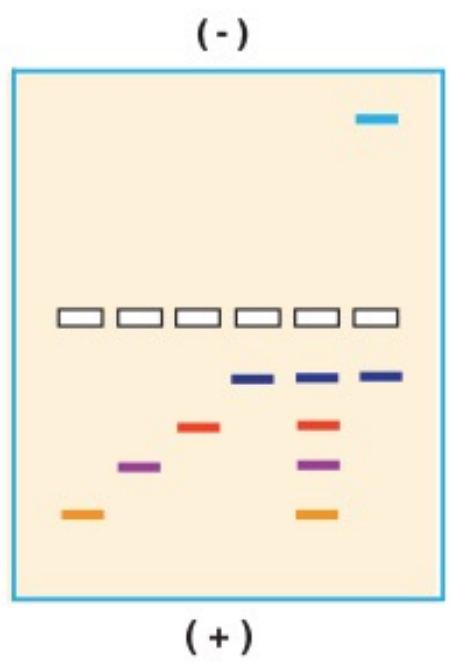


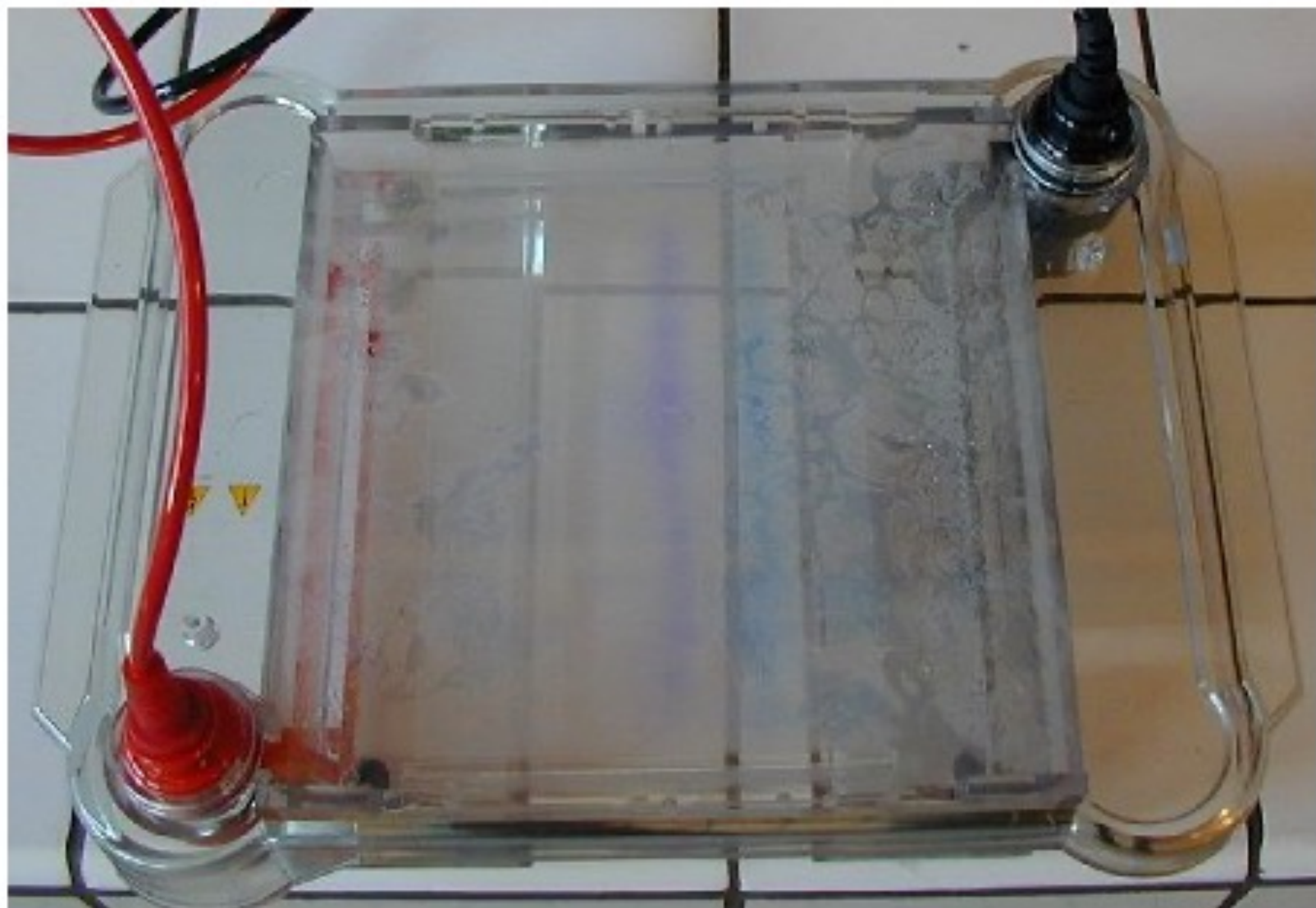
4 Fermer le couvercle, brancher les prises à la source de courant et réaliser l'électrophorèse.



5 Après l'électrophorèse, transférer le gel pour visualisation.

6 Analyser à la plaque lumière blanche.





Electrophorèse d'ADN sur gel d'agarose 15 x 10 cm (15 puits)
Noter la migration du colorant de charge de la cathode vers l'anode

Les facteurs de la migration électrophorétique

A pH neutre les molécules d'ADN sont chargées négativement du fait de la présence des phosphates et migrent donc vers l'anode quand elles sont soumises à un champ électrique. Leur rapport charge/taille étant constant, ces molécules se séparent essentiellement en fonction de la facilité avec laquelle elles progressent à travers le réseau d'agarose. La séparation est ainsi assurée par l'effet de filtration du gel.

Taille et conformation de l'ADN

Taille

Les molécules d'ADN bicaténaires linéaires migrent en fonction de leur longueur: La vitesse de migration est inversement proportionnelle au logarithme du nombre de paires de bases.

Conformation

Les molécules d'ADN plasmidiques circulaires se présentent sous trois conformations de taille identique:

- la forme surenroulée (forme 1 ou circulaire contrainte),
- la forme relâchée (forme 2), résultant d'une coupure d'un des brins qui entraîne la disparition du surenroulement,
- la forme linéaire (forme 3) résultant d'une coupure des deux brins.

La forme 1 migre le plus rapidement puis ensuite la forme 3, la plus retardée étant la forme 2.

3.2. Concentration en agarose

La concentration en agarose est exprimée en % masse d'agarose/volume de gel.

Un fragment d'ADN d'une taille donnée migre d'autant plus vite que le pourcentage d'agarose est plus faible.

Un gel de concentration donnée permet donc de séparer une fourchette donnée de fragments d'ADN, comme le montre le tableau ci-dessous.

concentration en agarose	domaines de séparation de molécules d'ADN bicaténaire linéaire (taille en kb)
0.3	5-60
0.6	1-20
0.7	0.8-10
0.9	0.5-7
1.2	0.4-6
1.5	0.2-3
2.0	0.1-2

Cliquez pour un agrandissement

Générateur de
courant électrique

Agarose

Peigne

Règle fluorescente

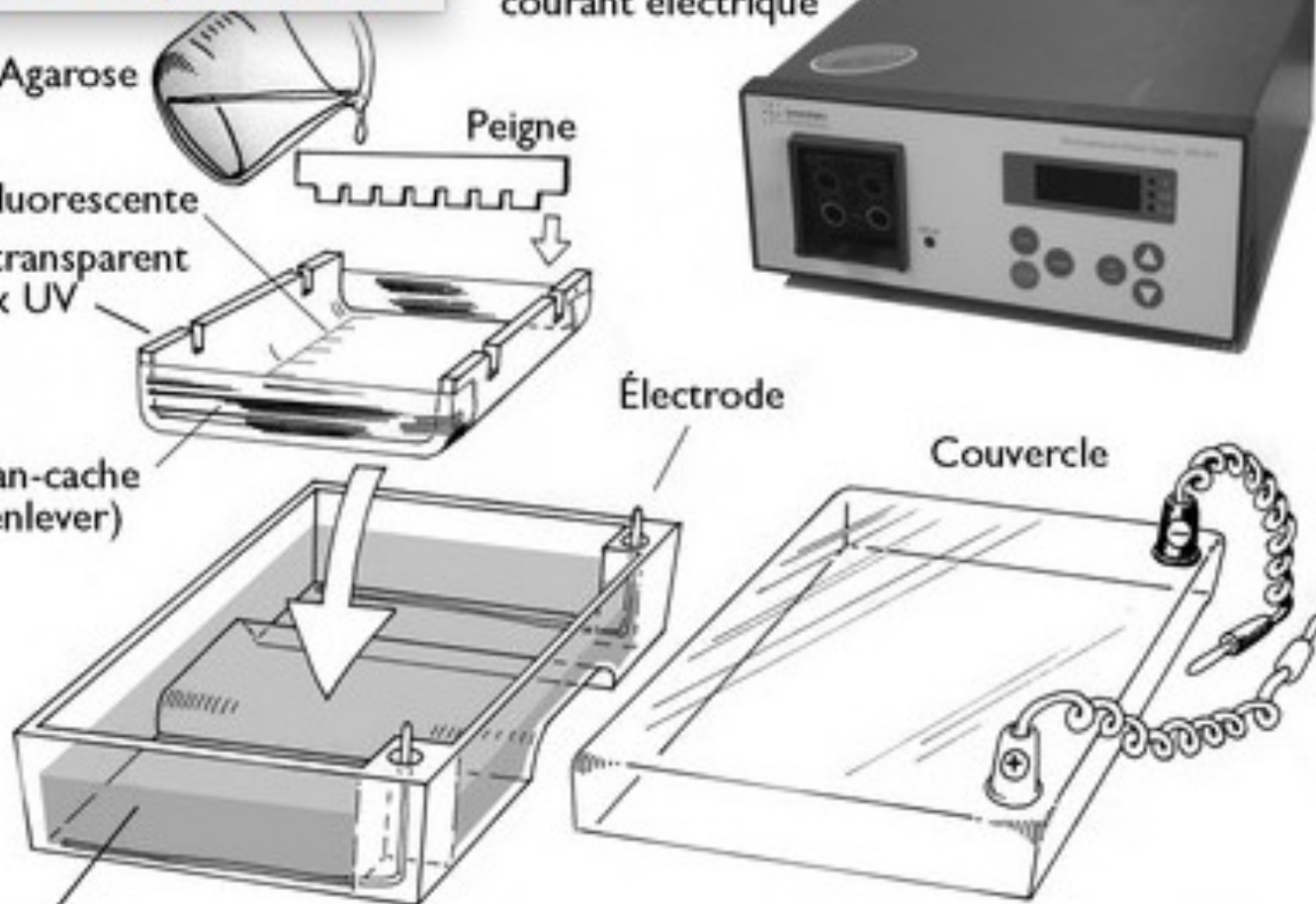
Support transparent
aux UV

Ruban-cache
(à enlever)

Électrode

Couvercle

Chambre à électrophorèse
contenant du tampon
de migration



Solutions à utiliser

Tampon de migration :

2 M Tris

50 mM EDTA

Ajuster le pH à 7,2 avec de l'acide acétique

Tampon de charge 6 X : à conserver à 4°C

0,25 % Bleu de bromophénol

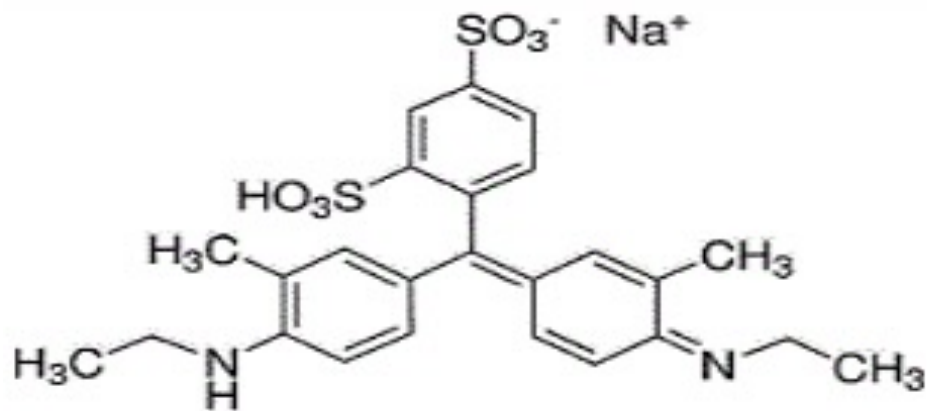
0,25 % Bleu de xylène cyanol

30 % Glycérol

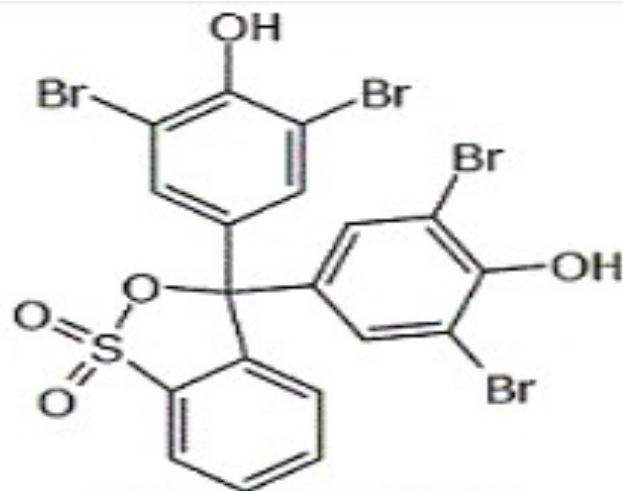
Gel d'agarose, 1 % agarose dissout dans du tampon de migration.

Les 2 colorants permettent de suivre la migration des fragments d'ADN :

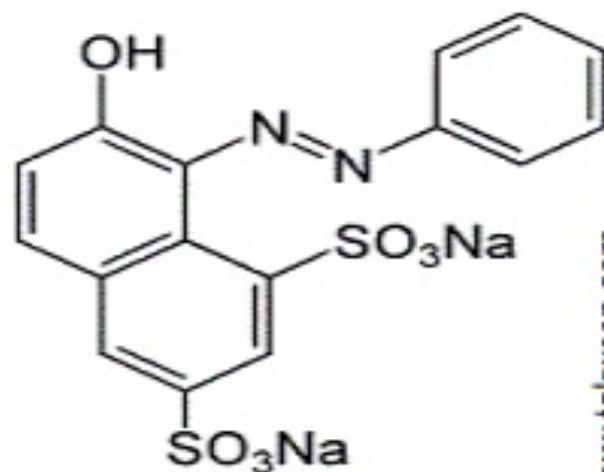
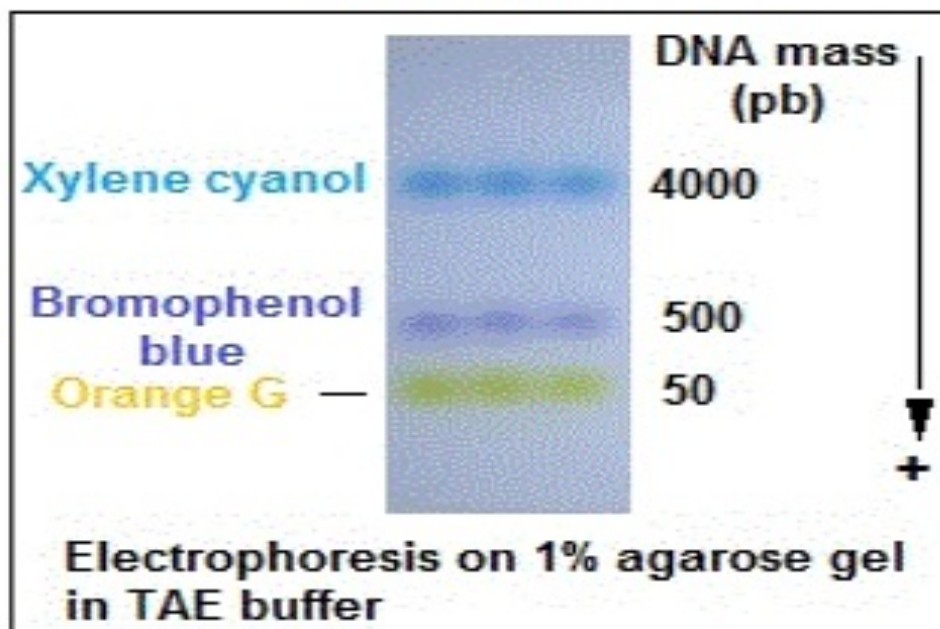
la migration du bleu de bromophénol est "comparable" à celle d'un fragment d'ADN de 300 paires de base la migration du Xylène cyanol est "comparable" à celle d'un fragment d'ADN de 4000 paires de base.



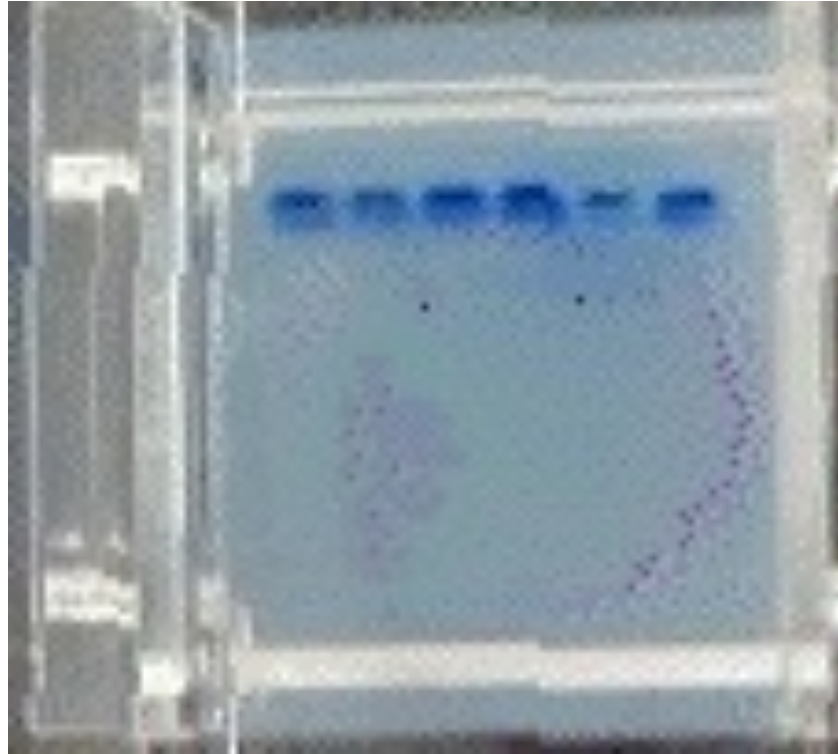
Xylene cyanol



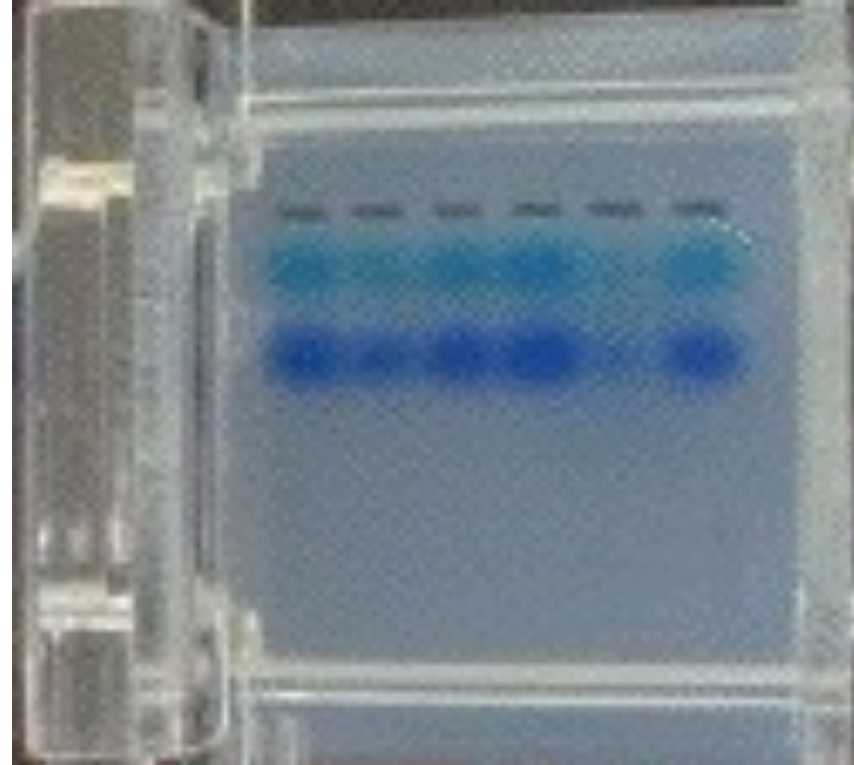
Bromophenol blue



Orange G



Avant la migration



Pendant la migration

Questions d'étude

1. En fonction de quels paramètres l'électrophorèse sur gel d'agarose sépare-t-elle les molécules ?
2. Expliquez la migration en fonction des charges.
3. Pourquoi ajoutons-nous du glycérol aux solutions d'échantillon avant de les déposer dans les puits ?
4. Que se passerait-il si l'on mettait du tampon au lieu d'eau distillée dans la solution de la cuvette ou dans celle du gel ?