

ELECTROPHORESE SDS PAGE

Solutions stocks

- **Ammonium persulfate 10%** (Sigma-Aldrich – A9164)

Peser 0,5 g d'ammonium persulfate. Ajuster le volume à 5 ml avec ΔH_2O . Stable plusieurs mois au réfrigérateur.

- **Butanol saturé en eau**

Butanol + ΔH_2O . Conserver à température ambiante.

- **β -mercaptoéthanol** (Sigma-Aldrich – M7154)

Conserver sous la hotte, à température ambiante.

- **Glycérol 50%**

Chauffer le glycérol à 50°C pendant 30 minutes.

20 ml de glycérol 100%

20 ml ΔH_2O

Conserver à température ambiante.

NB : préparer 200 ml si plusieurs WB sont en perspective (il se garde longtemps).

- **SDS 10%**

Peser 10 g de SDS. Ajuster le volume final avec 100 ml ΔH_2O dans une éprouvette graduée. Conserver à température ambiante.

NB : préparer 250 ml pour préparation du tampon d'électrophorèse x10

- **Solution A : acrylamide/bis-acrylamide 40% (29:1)** (Sigma-Aldrich - A7802)

38,7% (w/v) acrylamide

1,3% (w/v) bis-acrylamide

Conserver à 4°C au réfrigérateur à l'abri de la lumière. **(substance cancérigène)**

- **TEMED ou Tétraméthyléthyléthylènediamine** (Sigma-Aldrich - T9281)

Conserver sous la hotte, à température ambiante.

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 |

| | Gel 4% | Gel 7% | Gel 8% | Gel 10% | Gel 12,5% | Gel 15% | Gel 16% |
|------------------------|--------------------------|---------------|---------------|----------------|------------------|----------------|----------------|
| 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% | | | | | | |

Compléter à 45 ml avec ΔH_2O . Ajuster le pH à 8,8. Compléter le volume final à 50 ml avec ΔH_2O dans une éprouvette graduée. Stable pendant au moins un mois au réfrigérateur à l'abri de la lumière.

[Pour ajuster le pH, ajouter à l'aide d'une pipette pasteur du HCl (pour baisser le pH) ou du NaOH (pour augmenter le pH).]

- **Solution du gel de concentration 3%**

| | | |
|---------------|--------------------------|--------------------------|
| Tris 0,125 M | 757 mg Tris (PM = 121,1) | |
| Acrylamide 3% | | 3,75 ml solution A (40%) |
| SDS 0,2% | 1 ml SDS 10% | |
| Glycérol 3% | 3 ml glycérol 50% | |

Compléter à 45 ml avec ΔH_2O . Ajuster le pH à 6,8. Compléter le volume final à 50 ml avec ΔH_2O dans une éprouvette graduée. Ajouter une spatule de bleu de bromophénol. Stable pendant au moins un mois au réfrigérateur.

- **Tampon d'électrophorèse**

| | 1x | 10x |
|----------------|------------------------------|------------|
| Tris 25 mM | 3 g Tris (PM = 121,1) | 30 g |
| Glycine 192 mM | 14,41 g glycine (PM = 75,07) | 144,1 g |
| SDS 0,2% | 20 ml SDS 10% | 200 ml |

Ajouter 950 ml ΔH_2O . Vérifier le pH qui doit être compris entre 8,1 et 8,4 **SANS AJUSTEMENT**. Ajuster le volume final à 1 litre dans une éprouvette graduée. Conserver à 4°C.

NB : Le tampon électrophorèse peut également être préparé 10x.

On obtient un pH de 8.7-8.8 en général sans ajustement.

- **Tampon d'échantillon 4x**

| | | |
|--------------|--------------------------|--------------------|
| 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. Compléter le volume final à 45 ml avec ΔH_2O dans une éprouvette graduée. Ajouter une spatule de bleu de bromophénol. Solution stable plusieurs mois à température ambiante.

Le jour de l'expérimentation, ajouter 10% (v/v) de β -mercaptoéthanol (50 μ l de β -mercaptoéthanol pour 450 μ l de tampon). Si le β -mercaptoéthanol n'est pas requis (voir fiche technique des anticorps primaires), compléter alors avec ΔH_2O (50 μ l ΔH_2O pour 450 μ l de tampon).

- **Solution de coloration au bleu de Coomassie**

| |
|--|
| 1 g Brilliant Blue G (Sigma-Aldrich - B0770) |
| 450 ml méthanol |
| 450 ml ΔH_2O |
| 100 ml acide acétique glacial |

Agiter toute la nuit, puis filtrer pour enlever les particules de colorant non dissoutes. Stable plusieurs mois à température ambiante.

- **Solution de décoloration**

| |
|-------------------------------|
| 100 ml méthanol |
| 100 ml acide acétique glacial |
| 800 ml ΔH_2O |

Stable plusieurs mois à température ambiante.

1. Préparation du gel (2 heures)

1.1 Mise en place des plaques d'électrophorèse

Porter des gants pour l'ensemble de la préparation.

- ✓ Nettoyer les plaques au micro 90 en vérifiant l'absence d'impuretés à leurs surfaces.
- ✓ Rincer abondamment avec ΔH_2O .

- ✓ Nettoyer ensuite les plaques avec de l'alcool à 95°.
- ✓ Mettre la mousse (grise) sur le support puis mettre en place les plaques en suivant les indications du fournisseur (Bio-Rad).
- ✓ Vérifier l'ajustement des plaques et des spacers afin d'éviter les fuites lors du coulage.

1.2 Préparation et coulage du gel de séparation

La copolymérisation de l'acrylamide et du bis-acrylamide est initiée par l'addition d'ammonium persulfate (APS) au 1/100 (v/v) et d'un accélérateur le tétraméthyléthyléthylènediamine (TEMED) au 1/2000 (v/v).

Attendre que les réactifs soient à température ambiante, puis préparer le gel comme indiqué ci-dessous :

- ✓ Mettre dans un bécher avec un agitateur :

Pour mini gel protean III avec espacement de 1,5 mm :

| Solutions | 1 mini-gel | 2 mini-gels |
|-------------------------------|------------|-------------|
| Solution du gel de séparation | 8 ml | 16 ml |
| APS | 80 µl | 160 µl |
| TEMED | 4 µl | 8 µl |

- ✓ Couler à l'aide d'une pipette. Le niveau doit être ajusté de telle sorte que le niveau soit à 1-1,5 cm environ en dessus du bord supérieur de la plus petite plaque.
 - ✓ Si des bulles se forment, ajouter à l'aide d'une pipette Pasteur du butanol saturé en eau ([prélever la phase supérieure](#)).
 - ✓ La polymérisation complète nécessite **environ 45 minutes**.
 - ✓ Enlever le butanol et rincer avec ΔH_2O . Le gel peut être conservé plusieurs jours à 4°C. Dans ce cas, chasser le butanol puis ajouter quelques millilitres ΔH_2O afin d'éviter que le gel ne sèche.
- NB : Attention : au delà d'une heure le butanol dessèche la partie supérieure du gel.

1.3 Préparation et coulage du gel de concentration

La copolymérisation de l'acrylamide et du bis-acrylamide est initiée par l'addition d'ammonium persulfate (APS) au 1/100 (v/v) et d'un accélérateur le tétraméthyléthyléthylènediamine (TEMED) au 1/666 (v/v).

Attendre que les réactifs soient à température ambiante, puis préparer le gel comme indiqué ci-dessous :

- ✓ Mettre dans un bécher avec un agitateur :

| Solutions | 1 mini-gel | 2 mini-gels |
|----------------------------------|------------|-------------|
| Solution du gel de concentration | 2,5 ml | 5 ml |
| APS | 25 µl | 50 µl |
| TEMED | 3,75 µl | 7,5 µl |

- ✓ Verser le gel de concentration avec une pipette.
- ✓ Mettre le peigne en position.
- ✓ Laisser polymériser **au moins 30 minutes**.

1.4 Mise en place des plaques d'électrophorèse dans la cuve

- ✓ Dégager le cadre de coulage.
- ✓ Avec une feuille de papier enlever les débris polymérisés au bas du gel.
- ✓ Mettre en place les plaques avec leurs supports dans la cuve d'électrophorèse ([les petites plaques vers l'intérieur](#)).
- ✓ Verser le tampon d'électrophorèse de façon à égaliser les niveaux de part et d'autre des plaques. (Lors de cette étape, il est possible de laisser les plaques d'électrophorèse toute la nuit à 4°C.)
- ✓ Enlever délicatement les peignes.
- ✓ Nettoyer les puits à l'aide d'une seringue de façon à enlever les débris de gel qui pourraient affecter la migration (flusher délicatement chaque puits avec le tampon d'électrophorèse, à l'aide d'une pipette).

2. Préparation, chargement et migration des échantillons (± 4 heures)

2.1 Préparation

- ✓ Dans un tube Eppendorf 0,5 ml, combiner 3 volumes d'échantillon protéique à 1 volume de tampon d'échantillon 4x contenant du β -mercaptoéthanol 10% (v/v). Il est préférable de préparer à part 200 μ l de tampon : avec 180 μ l de tampon d'échantillon 4x et 20 μ l de β -mercaptoéthanol.

NB : attention, certains anticorps primaires ne nécessitent pas de β -mercaptoéthanol (voir la fiche technique de l'anticorps). Dans ce cas, ajouter 10% (v/v) Δ H₂O.

Le choix du volume d'extrait protéique dépend de sa concentration. En général, 30 μ g par puits sont largement suffisants.

Exemple :

| Akt (Thr308) / rpS6-P | Gastrocnemius - Manipe Cachexia Doc 2 | | | | | | | | | |
|--------------------------|--|--|--|--|--|--|--|----|--|--|
| 12/04/2011 | GYS 080 | GYS 081 | GYS 090 | GYS 091 | GYS 105 | GYS 107 | GYS 113 | PM | GYS 115 | GYS 116 |
| Gel-GYS 01 10% | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| | WT-Sham | WT-Sham | WT-LLC | WT-LLC | KO-Sham | KO-Sham | KO-LLC | PM | KO-LLC | KO-LLC |
| | tampon complet sans inhibiteurs de protéases | | tampon complet sans inhibiteurs de protéases | tampon complet sans inhibiteurs de protéases |
| Qté prot. μ g | 30 à 50 | | 30 à 50 | 30 à 50 |
| [Prot], μ g/ μ l | x | x | x | x | x | x | x | | x | x |
| Vol extrait, μ l | Qté prot / [Prot] | | Qté prot / [Prot] | Qté prot / [Prot] |
| Tampon X 4, μ l | Vol extrait / 3 | | Vol extrait / 3 | Vol extrait / 3 |
| Volume total | Vol extrait + Tampon X 4 | 4 | Vol extrait + Tampon X 4 | Vol extrait + Tampon X 4 |

- ✓ Chauffer à 100°C pendant **3 minutes**.
- ✓ Centrifuger brièvement (3 secondes) dans une centrifugeuse Eppendorf pour récupérer le volume.

2.2 Chargement

- ✓ Charger délicatement l'échantillon dans le puits en utilisant les cônes prévus à cet effet. Faire attention à ne pas introduire de bulles d'air. Prévoir un puits pour le marqueur de poids moléculaire (6 à 10 μ l).
- ✓ Mettre en place la cuve d'électrophorèse dans le bac de glace.

2.3 Migration

- ✓ Fixer les électrodes. Des bulles d'air doivent se former lorsque le courant passe. Le front de migration est indiqué par le bleu de bromophénol contenu dans le tampon d'échantillon 4x.
- ✓ Faire migrer à 80 V pendant **15 minutes** (puis augmenter la tension à 90 V pendant **30 minutes**) et laisser **minimum 2h** à 110 V (à adapter à la protéine d'intérêt).
- ✓ Couper l'alimentation.
- ✓ Enlever les plaques délicatement.
- ✓ Préparer 3 bacs de tampon de transfert (cf. solutions Western ne pas oublier de rajouter du méthanol au tampon de transfert) : 1 bac pour les mousses et les papiers de transfert, 1 bac pour les membranes et 1 pour les gels. Une partie du tampon peut être utilisée pour décoller le gel de la plaque.
- ✓ Couper le coin gauche en haut du gel afin de garder l'orientation.

Le tampon d'électrophorèse peut être réutilisé une seconde fois.