

Centre universitaire Abdelhafid Boussouf, Mila  
Faculté des Sciences de la  
Nature et de la Vie

# Instrumentation et Maintenance en Biotechnologie

1<sup>ère</sup> Année Master Biotechnologies Et Amélioration des Plantes

2021-2022

Dr. Bouchekrit M.



# Les techniques électrophorétiques

électrophorétiques  
Les techniques

# Techniques électrophorétiques

1. Électrophorèse sur couche mince

2. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide

**SDS-PAGE**

**IEF**

**Electrophorèse bi-dimensionnelle**

3. Électrophorèse sur gel d'agarose

**Electrophorèse en champ pulsé**

4. Électrophorèse capillaire

5. Immunoélectrophorèses

**Electro-immunodiffusion  
monodimensionnelle**

**Electro-immunodiffusion  
bidimensionnelle**

**Immunoélectrophorèse de Grabar et  
Williams**

6. Immunoblotting (Transfert des protéines)

# Techniques électrophorétiques

1. Électrophorèse sur couche mince

2. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide

**Electrophorèse bi-dimensionnelle**

3. Électrophorèse sur gel d'agarose

**Electrophorèse en champ pulsé**

4. Électrophorèse capillaire

5. Immunoélectrophorès

**Immunoélectrophorèse de Grabar et  
Williams**

5. Immunoblotting (Transfert des protéines)

## Électrophorèse sur couche mince

tremper les bandes d'acétate de cellulose dans le tampon d'électro-phorèse.



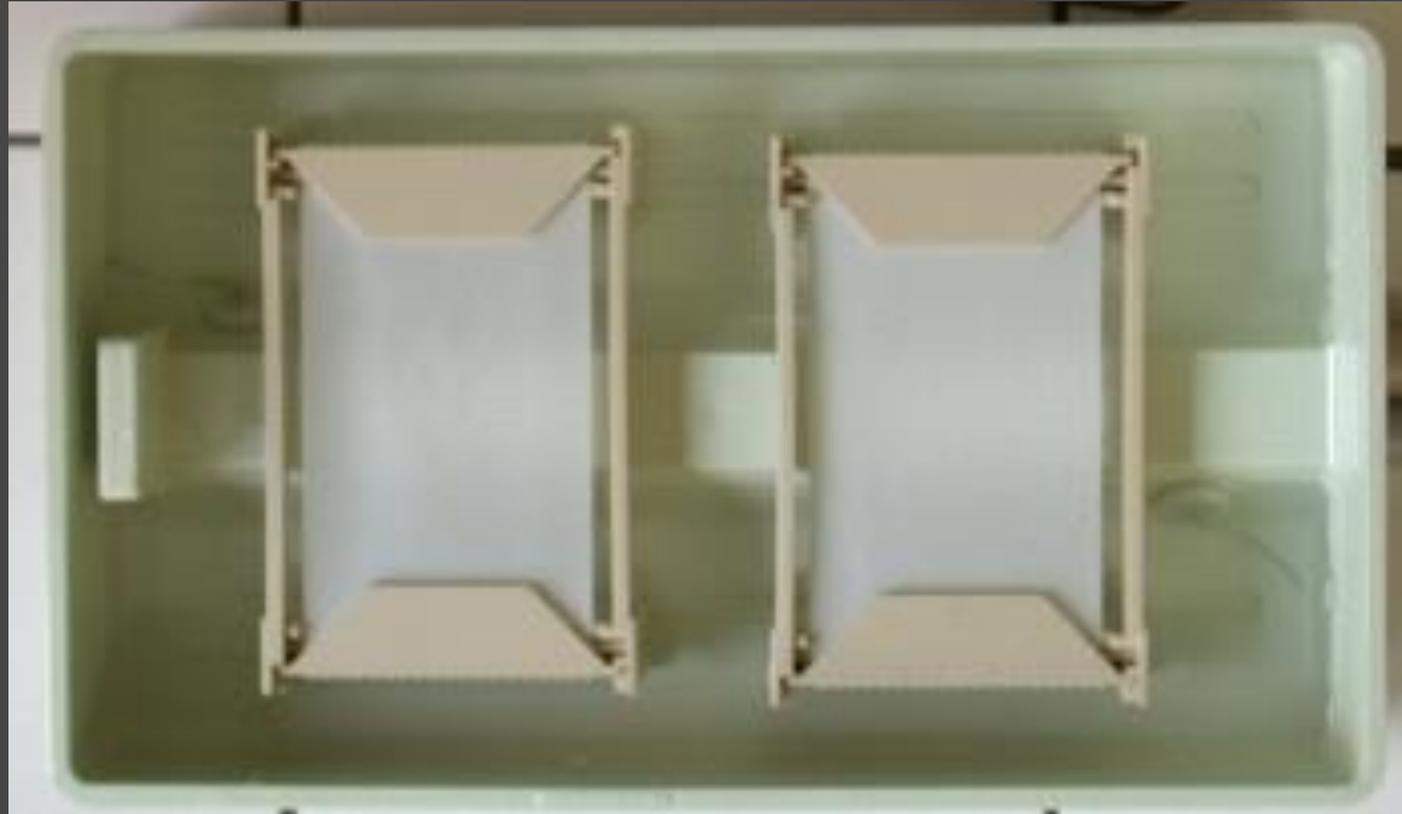
**Essorer l'excès de tampon en plaçant les bandes entre deux feuilles de papier absorbant.**



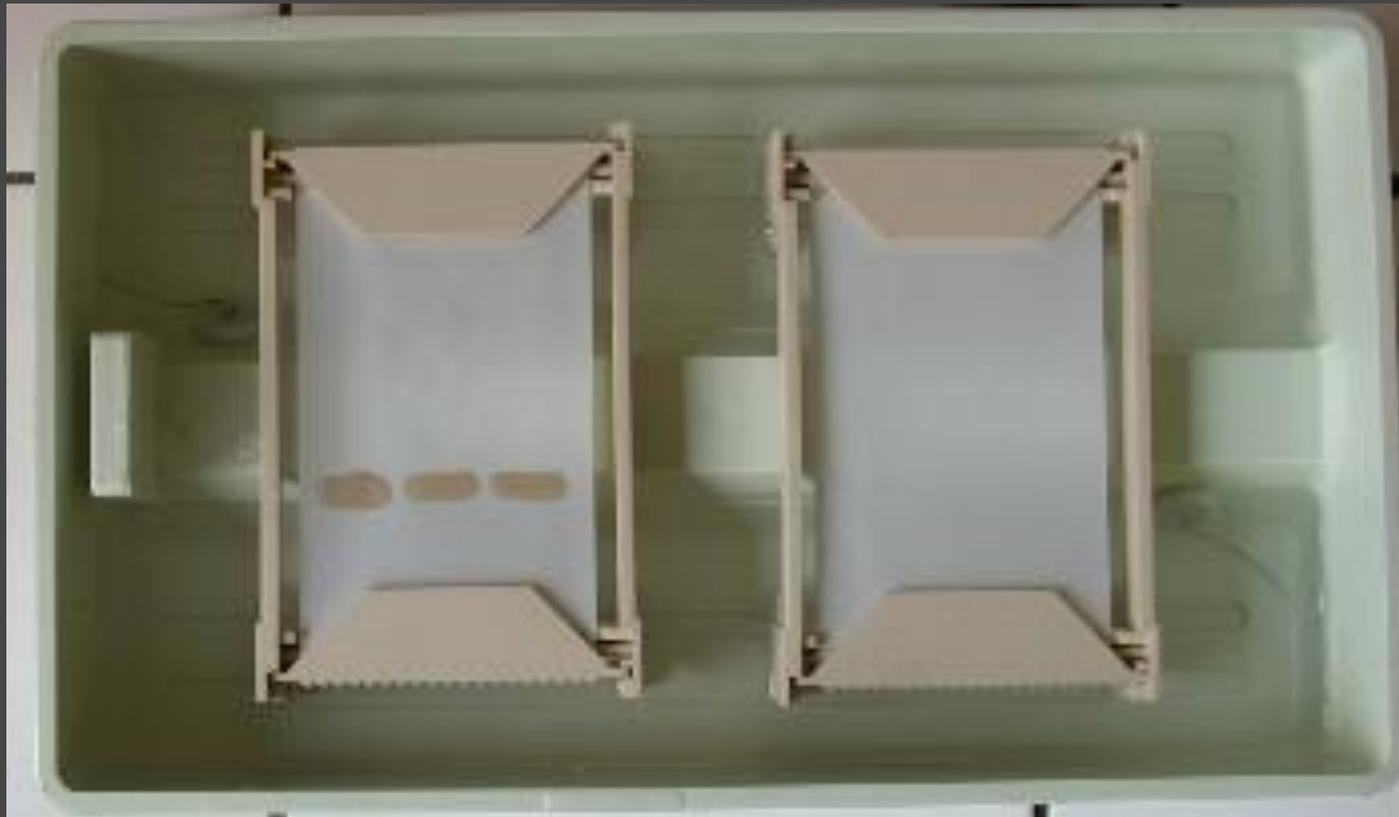
**Placer la bande sur le portoir en veillant à disposer la face absorbante vers le haut.  
La bande doit être tendue et ses extrémités doivent dépasser suffisamment pour  
tremper dans le tampon une fois le support placé dans la cuve.**



**Remplir les deux compartiments de la cuve avec un même volume de tampon d'électrophorèse. Mettre en place le(s) support(s) dans la cuve.**



**Déposer un échantillon sur la bande en prenant garde que la bande soit bien horizontale et que l'échantillon ne coule pas.**



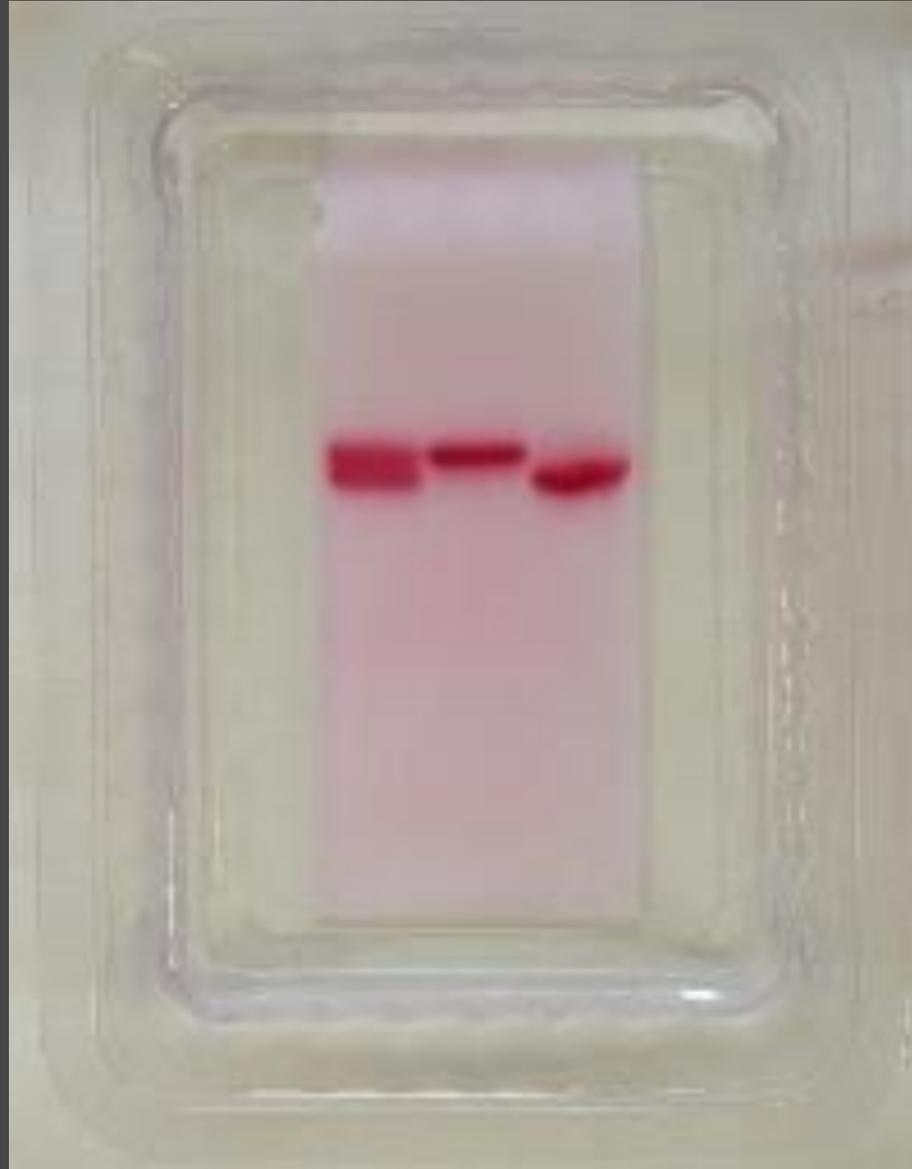
**Fermer la cuve et mettre sous tension (environ 1 h de migration à 150 V).**



**Après migration, placer les bandes dans la solution de rouge ponceau pendant 10 minutes.**



**Décolorer le fond dans des bains successifs d'acide acétique et agiter pour accélérer la décoloration.**



## Électrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse en gel d'agarose est utilisée pour séparer les acides nucléiques ou des protéines en fonction de leur poids moléculaire

Les gels d'agarose ont de grands « pores » et sont utilisés pour séparer les grandes molécules d'une masse moléculaire supérieure à 200 kD

L'ADN est chargé négativement, lorsqu'il est placé dans un champ électrique, et donc migre vers le Pôle positif (anode).

- ✓ Préparation du gel d'agarose : peser la quantité nécessaire d'agarose, y ajouter le tampon et porté ensuite à ébullition (microonde) jusqu'à ce que l'agarose soit complètement dissous.



✓ Ajouter l'agent d'intercalation.



- ✓ **Remplir le support avec le gel d'agarose en évitant la formation des bulles d'air. Laisser le gel polymériser à température ambiante pendant environ 20 min.**



- ✓ **Préparation des échantillons : il est nécessaire de se munir un tampon de chargement, des standards et l'ADN. Mélanger l'ADN avec le tampon de chargement.**



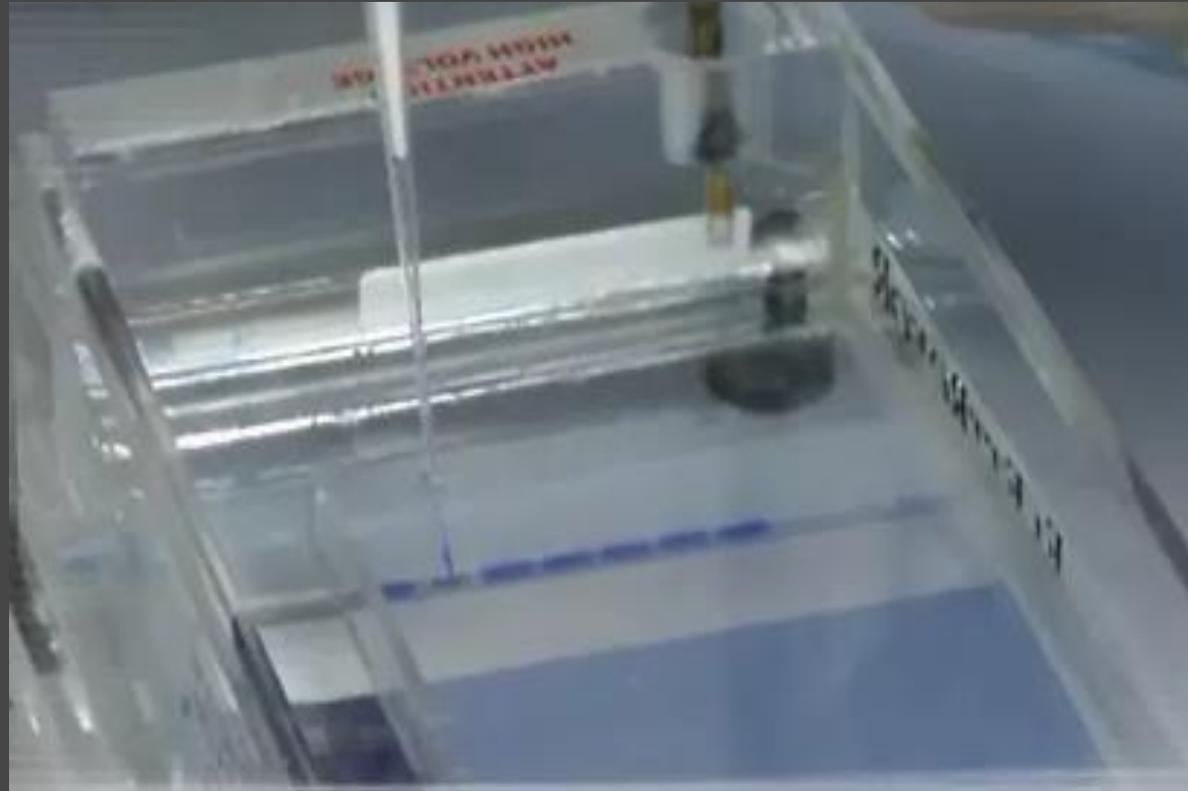
- ✓ Lorsque le gel s'est solidifié, retiré délicatement le peigne du gel.



- ✓ Placer le gel dans la cuve et ajouter le tampon jusqu'à ce qu'il recouvre complètement le gel.



✓ **Charger les échantillons et le standard.**



✓ Fermer la cuve et la connecté à un générateur.

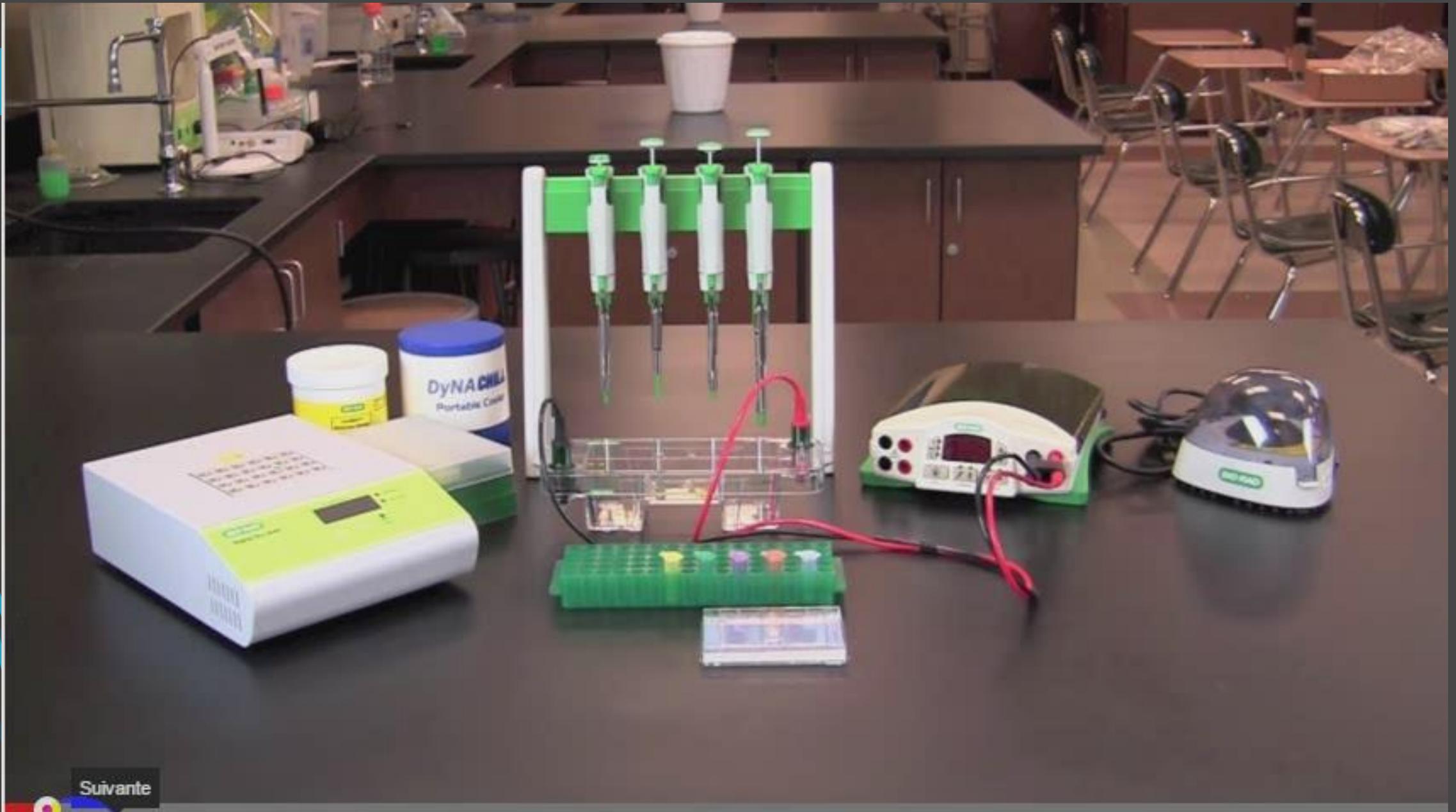


- ✓ **Exposer le gel aux rayonnements ultraviolets afin de visualiser les différentes bandes d'ADN.**



- ✓ Les résultats positifs sont caractérisés par la présence de bandes, ce qui témoigne l'obtention des fragements.





Suivante

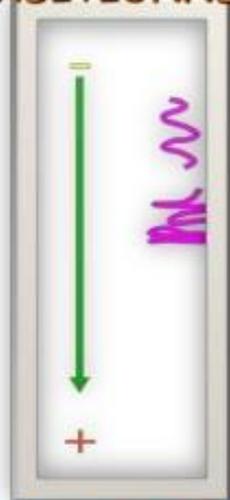
# Électrophorèse en champ pulsé

- Pour séparer des fragments de haut PM (taille supérieure à 20 kb).

## PRINCIPE

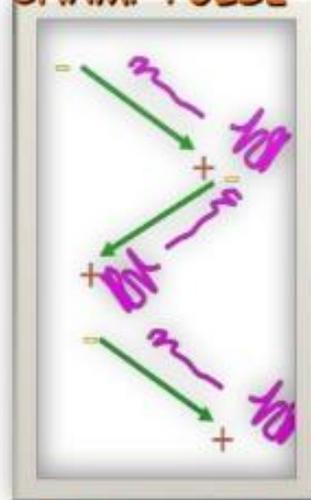
Migration des fragments de haut poids moléculaires

ELECTROPHORÈSE TRADITIONNELLE



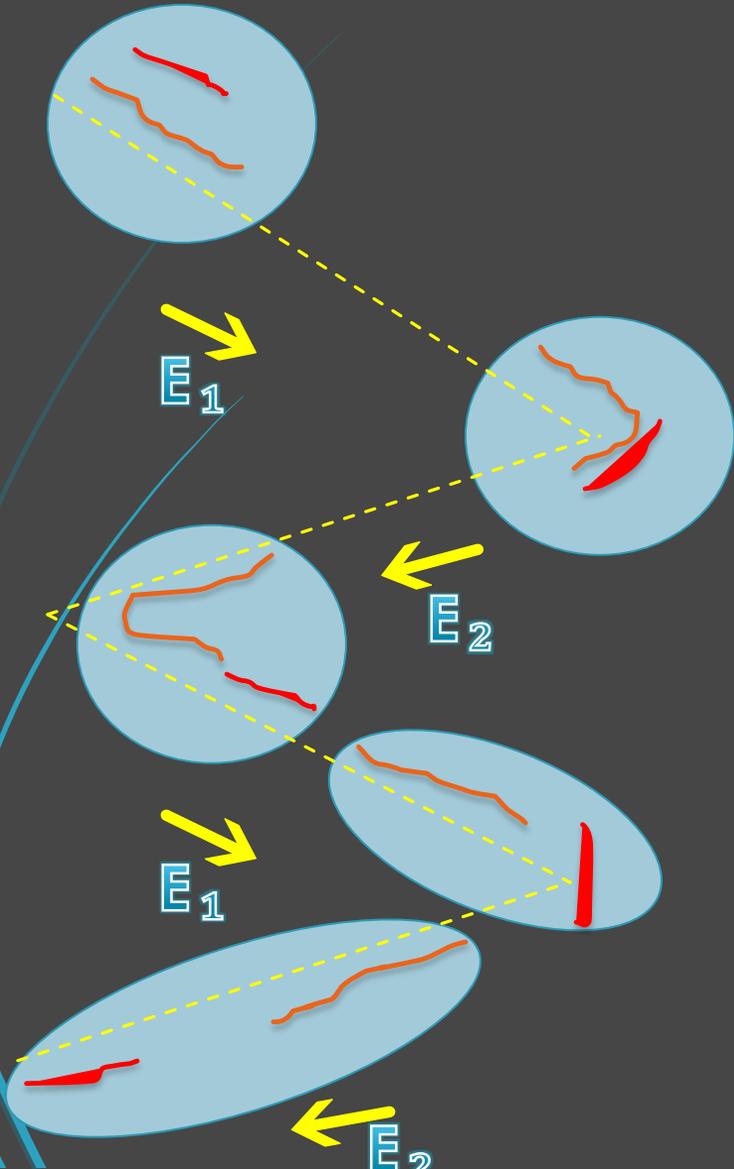
Blocage des gros fragments d'ADN en début de gel

ELECTROPHORÈSE EN CHAMP PULSÉ



Déroutement des gros fragments d'ADN par réorientation du champ électrique

## Électrophorèse en champ pulsé



➤ Le principe de cette électrophorèse consiste à changer l'orientation et/ou la polarité du champ électrique alternativement au cours du temps. A chaque modification du champ, la molécule d'ADN doit se réorienter parallèlement au nouveau champ.

➤ Ces temps de réorientation provoquent un retardement de la migration nette qui est proportionnel à la taille de la molécule.

## Électrophorèse capillaire

C'est une technique récente qui commence à se développer et qui offre essentiellement les avantages de la **rapidité**, de la très grande **résolution** et, partant, de la très grande **sensibilité** de la détection, faible consommation d'échantillons et de tampons de séparation, compatibilité avec de nombreux détecteurs.

la CE a été conçue pour séparer des espèces chimiques selon leur rapport charge / taille à l'intérieur d'un petit tube capillaire rempli d'un électrolyte.

## Instrumentation

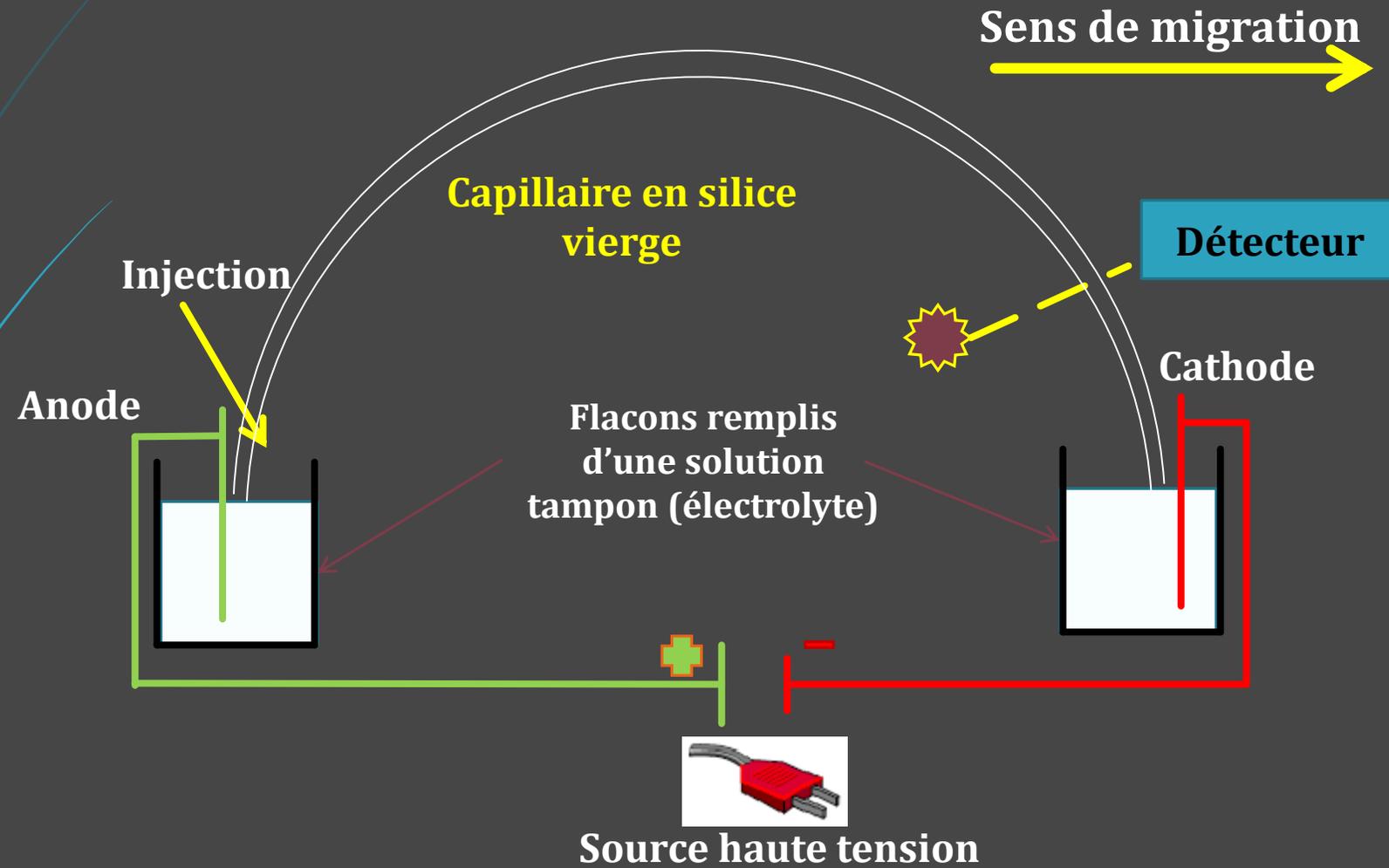
L'appareillage nécessaire pour réaliser des électrophorèses capillaires est relativement simple. Les principaux composants du système sont un flacon d'échantillon, deux flacons source et destination, un capillaire, des électrodes, une source de courant haute tension, un détecteur et un appareil de récupération et de traitement des données.

Les flacons source et destination ainsi que le capillaire sont remplis avec un électrolyte tel qu'une solution aqueuse tampon. Pour introduire l'échantillon, l'extrémité du capillaire est placée dans le flacon contenant l'échantillon, puis est replacée dans le flacon source (l'échantillon est injecté dans le capillaire par capillarité, pression et électro-injection).

## Instrumentation

**L'électrophorèse utilise un capillaire de silice de diamètre d'environ 50  $\mu\text{m}$  et de longueur 1 m (rempli de tampon ou de gel), et des voltages élevés (15 -30 kV). Ceci aboutit à des vitesses de migration très rapides des composés dans les capillaires et ceux-ci sont détectés par détecteur.**

# Électrophorèse capillaire



## Instrumentation

**La migration des analytes se met alors en place grâce à un champ électrique appliqué entre les flacons source et destination, et fourni aux électrodes par le générateur haute tension. Tous les ions, positifs ou négatifs, sont attirés à travers le capillaire dans le même sens par le flux électroosmotique.**

## Instrumentation

**Les analytes sont séparés pendant leur migration du fait de leurs mobilités électrophorétiques différentes, et sont détectés à proximité de la sortie du capillaire.**

**Le signal du détecteur est envoyé à un appareil qui reçoit et traite ces données, tel qu'un intégrateur ou un ordinateur.**

**Les données sont affichées sous la forme d'un électrophorégramme, qui donne la réponse du détecteur en fonction du temps. Les composés chimiques séparés apparaissent comme des pics avec des temps de rétention différents sur l'électrophorégramme.**