

6. Principales techniques électrophorétiques

Il existe deux types de séparation basés sur les différences de mobilité, électrophorèse en veine liquide et celle de zone ou support. La première méthode sert notamment à déterminer les mobilités électrophorétiques, cependant, la deuxième peut être utilisée à l'échelle préparative (isoler et purifier les composés en quantité non négligeable de quelques mg à quelques centaines de mg) et analytique (déterminer la composition d'un mélange de molécules). Aussi, il existe plusieurs types nommés selon le support utilisé : électrophorèse en couche mince (papier, acétate de cellulose ou silice) et électrophorèse sur gel (agar, agarose, amidon, polyacrylamide, polyacrylamide-agarose, etc). La nature du gel, jugé favorable pour une séparation, dépend de type des composés à étudier et le type de problème à résoudre.

6.1. Electrophorèse en couche mince

L'exemple le plus utilisé est celui de séparer les protéines sériques sur support de papier ou acétate de cellulose, en vue de séparer les protéines de sérum, d'identifier des fractions obtenues et déterminer leur concentration. La méthode est faite comme suit :

- *Préparation de la cuve et mise en place des supports* : la bande électrophorétique est imprégné avec le tampon d'électrophorèse (pH = 8.6 et FI = 0.05 mol/l), l'excès du tampon va être essoré en mettant la bande entre deux feuilles de papier absorbant. La bande est mise ensuite sur un portoir en tenant compte que les deux extrémités sont suffisamment dépassées pour être trempées dans le tampon de la cuve (anode et cathode) (Fig. 10). Les deux compartiments de la cuve sont remplis avec le même volume de tampon. Le portoir portant la bande est mis dans la cuve d'électrophorèse.

- *Dépôt d'échantillon* : un certain volume de sérum (2µl) est déposé sur la bande du côté cathodique en laissant quelques millimètres du côté pour éviter l'effet de bord. La bande doit être horizontale (Fig. 10).

- *Migration des molécules*: la cuve est fermée, le courant électrique continu de tension de 150 à 250 V est appliqué de 20 minutes à une heure. Les molécules se déplacent vers l'anode ou la cathode selon leur charge qui varie en fonction du pH du milieu qui doit être fixé en utilisant des solutions tampon. La vitesse de migration dépend de la taille et la forme des molécules (Fig. 10).

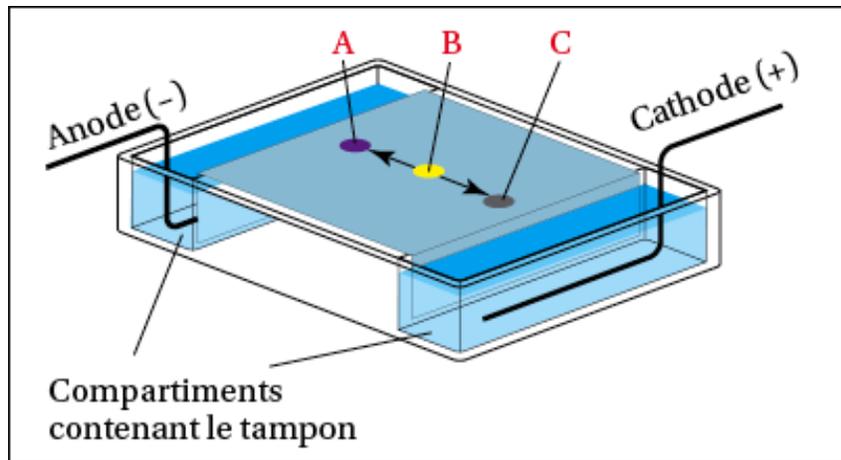


Figure 10: Préparation de la cuve, dépôt d'échantillon et migration

- *Traitement de la bande* : après le temps d'analyse, l'échantillon (protéine) est fixé avec un acide fort ou chauffage pour éviter toute perte de molécule pendant la coloration. Les bandes sont ensuite mises dans un bain de colorant (rouge Ponceau, vert de lissamine ou amidoschwartz) qui se fixe sur les protéines d'une manière non sélective. La décoloration du fond du support est faite avec une solution d'acide acétique à 5% (Fig. 11).

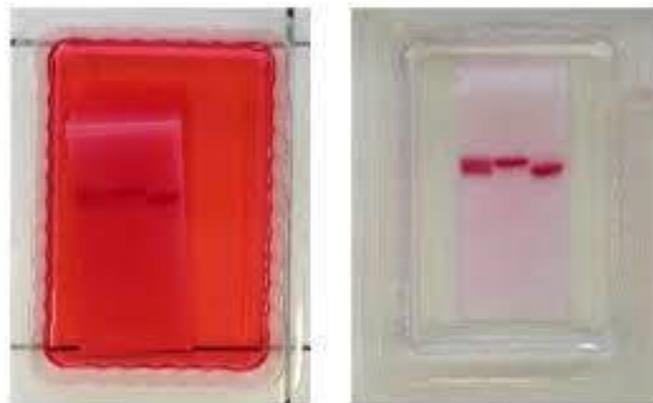


Figure 11: Révélation des taches protéiques et décoloration du papier

Une révélation spécifique des glycoprotéines est faite en utilisant le réactif de Schiff après oxydation de la partie glucidique par l'acide périodique. Les lipoprotéines sont révélées par le rouge Ciba ou le noir Soudan. Les isoenzymes de LDH ne peuvent pas être révélés chimiquement mais plutôt par une réaction enzymatique.

- *Analyse des fractions* : peut être effectuée à l'œil nu (analyse qualitative) ou en lisant les absorbances par photométrie (analyse quantitative). Au fait, les taches protéiques se découpent, puis s'éluent avec un solvant convenable et après on mesure l'absorbance des éluats. Cette méthode de routine est remplacée par la lecture densitométrique avec intégration qui consiste à mettre toute la bande dans le densitomètre où les absorbances des taches sont lues en fonction de leur position sur la bande, la courbe $DO = f(x)$ va être tracée. L'aire de pic fournit une information sur la concentration de tache protéique correspondante.