

6.2. Electrophorèse sur gel polyacrylamide

6.2.1. Dans des conditions non dénaturantes

Expérimentalement, PAGE peut être préparé dans un tube cylindrique ou sur plaque (couche mince). Ce dernier peut être utilisé en montage vertical ou horizontal (le gel est mou). La procédure est faite comme suit :

- *Préparation du gel de polyacrylamide* : gel de séparation et celui de concentration. Le gel de séparation est mis entre deux plaques de verre suivi par le gel de concentration pour se polymériser, un peigne est mis au-dessus pour former les puits de dépôt d'échantillon ;

- *Dépôt d'échantillon* : il doit être mélangé avec le saccharose ou le glycérol (10-15%) pour augmenter sa concentration, et donc se déposer au fond du puits remplis avec le tampon du compartiment cathodique (éviter le mélange). Un colorant (marqueur d'électrophorèse) est souvent ajouté à l'échantillon ou déposé séparément pour contrôler la progression de la migration comme : le bleu de bromophénol (anionique) ou le bleu de méthylène (cationique) (Fig. 12).

- *Dépôt des plaques de verre dans la cuve d'électrophorèse* : contenant le gel polymérisé et l'échantillon (Fig. 12);

- *Remplissage de la cuve avec un tampon convenable*: le choix du tampon est en fonction des molécules à séparer, pH et force ionique ;

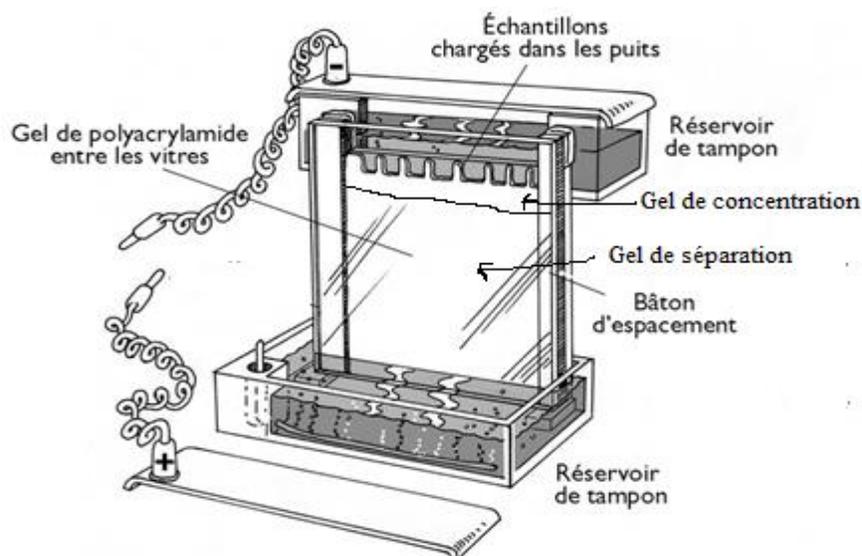


Figure 12: Cuve d'électrophorèse des protéines en gel d'acrylamide

- *Fermeture de la cuve et mise en marche du courant électrique* : l'opération est débutée avec un courant continu de 1mA pendant 30 minutes pour permettre à l'échantillon d'entrer dans le gel et donc se concentrer. L'ampérage du courant de séparation est un peu plus élevé et persiste tout le temps de séparation. La cuve peut être équipée avec un système de refroidissement pour diminuer la température lors le passage du courant ;

- Arrêter le courant et ressortir le gel de la cuve ;
- Coloration du gel (révélation des bandes protéiques) et décoloration ;
- Analyse du gel.

6.2.2. Dans des conditions dénaturantes ou SDS-PAGE

L'électrophorèse PAGE en présence de SDS s'utilise *pour séparer les protéines en fonction de leur géométrie, masse et poids moléculaire, et pas leur charge*. Le SDS (dodécylsulfate de sodium) de formule générale $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{11}-\text{SO}_3^-\text{Na}^+$ se lie fortement aux protéines en les dénaturant et cause le complexe SDS-polypeptide. Selon la concentration de SDS dans le milieu, les protéines sont transformées en macropolyanions de forme allongée et de mobilité électrophorétique uniforme, dont il détruit la structure secondaire, tertiaire (après réduction des ponts sulfure avec le mercaptoéthanol ou dithiothreitol) et quaternaire (Fig. 09). Au fait, les protéines de charge négative dans un milieu contenant un excès de SDS (1.4g de SDS = pour chaque 1g protéine) migrent seulement par effet de tamisage moléculaire. Aussi, quel que soit la molécule le rapport charge/rayon est constant. Une concentration élevée de SDS provoque la formation d'une micelle (Fig. 13).

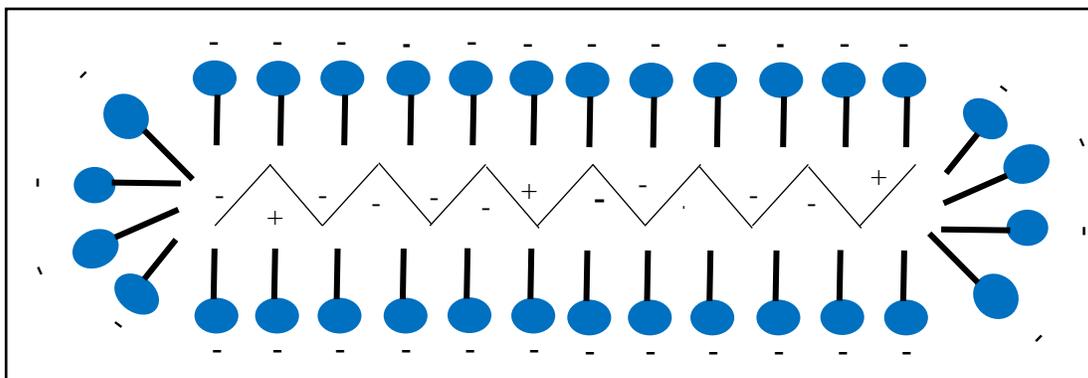


Figure 13: Une micelle de chaîne peptidique entourée avec les molécules de SDS.

Ainsi, cette technique peut déterminer le poids moléculaire des protéines séparées car il existe une relation linéaire entre $\log(\text{PM})$ et la distance parcourue dans le gel (Fig. 14), une courbe d'étalonnage est tracée $\text{Log}(\text{PM}) = f(d)$ par le biais d'un marqueur électrophorétique (protéine pure de poids moléculaire connu), interpolation du PM inconnu. Le SDS-PAGE utilise les deux types de gel, de concentration (*Stacking gel*) et de séparation, et un système de tampon discontinu.

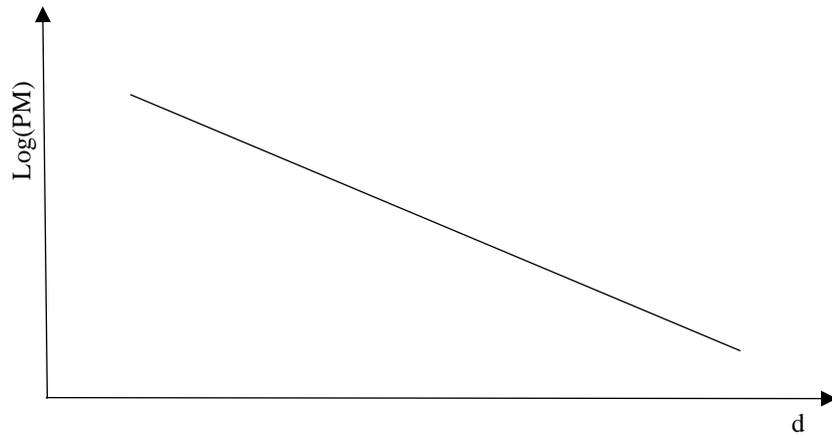


Figure 14: Courbe représente la variation de $\log \text{PM}$ en fonction de la distance parcourue.

La réalisation d'électrophorèse en condition dénaturante, SDS-PAGE, passe par les mêmes étapes que celle ordinaire mais possède des caractéristiques différentes:

- Dissocier les protéines agrégées, peu solubles ou hydrophobes, qui peuvent bloquer les pores du gel :
- Séparer les protéines en fonction de leur géométrie, et donc déterminer leur PM ;
- Simple, rapide et utilise des microquantités.