

BROCHURE DE TRAVAUX PRATIQUES

Séparation des protéines du blanc d'œuf par électrophorèse sur gel d'agarose dans les conditions natives



I- Préparation du tampon de migration Tris-Hcl 0,1M pH 8,6

- Dissoudre 12,11g de Tris base dans 1000 mL d'H₂O sous agitation.
- Régler le pH à 8,6 à l'aide d'un pH mètre et d'une solution de Hcl concentrée.
- La solution obtenue Tris-Hcl 0,1M pH 8,6 peut être conservée jusqu'à 1mois à température ambiante.

II- Préparation du gel d'agarose à 1%

La concentration du gel est fonction du poids moléculaire des protéines à séparer

- Préparer une solution d'agarose à 1% (p/v) dans du Tris-Hcl 0,1M pH 8,6.
- Porter le mélange à ébullition sur une plaque chauffante à haute température 340°C pour obtenir un gel en fusion parfaitement homogène.
- Couler 20ml de gel sur le support de coulage (20ml donnent un gel épais de 4mm).
- Placer le peigne dans une fente de façon à partager le gel en deux parties égales.
- La solidification du gel dure 20min environ.
- Enlever le peigne en prenant soin de ne pas endommager les puits.
- Placer le gel dans la cuve d'électrophorèse.
- Remplir les deux réservoirs avec la solution de Tris-Hcl 0,1M pH 8,6 à raison d'environ 110ml dans chaque compartiment afin de couvrir le gel.

Pendant la solidification du gel, préparer les solutions suivantes :

a) Solution de coloration au rouge ponceau

- Préparer une solution mère de 5% (p/v) d'acide Trichloracétique (TCA) dans l'H₂O.
- Préparer une solution mère 0,1% (P/V) de rouge ponceau dans l'H₂O.
- Préparer 50 ml de solution de coloration en mélangeant 20ml de rouge ponceau et 30ml de TCA 5% précédemment préparés.

b) Solution de décoloration

- Préparer une solution d'acide acétique 10% (v/v) dans l'H₂O.

c) Solution de Bleu de bromophénol (BBP)

- Dans l'électrophorèse, le BBP est un indicateur du front de migration et facilite également le dépôt des échantillons dans les puits.
- Préparer une solution concentrée 10X pour 10ml de volume final :
- 25mg de BBP (0,25% final),
- 0,2ml EDTA 0,5M (10mM final),
- 0,2ml Tris Hcl 0,1M pH 8,6 (20mM final),
- 5ml glycérol 80%.
- Complétez jusqu'à 10ml avec l'H₂O.
- Diluer la solution au 10^{ème} dans un volume total de 100ml et mettre sous agitation pendant 4 heures.
- Filtrer la solution, elle peut être conservée plusieurs mois à 4°C.

III- Préparation des échantillons

- Le blanc d'œuf est dilué au ½ avec la solution tampon Tris Hcl 0,1M pH 8,6.
- Mélanger 40µl de la solution BBP avec 500µl de solution de blanc d'œuf diluée.
- L'échantillon est prêt pour le dépôt.

IV- Dépôt des échantillons et migration

- 10µl d'échantillon sont déposés dans chaque puits à l'aide d'une micropipette (1-10µl).
- Fermer la cuve avec le couvercle de sécurité.
- Brancher la cuve à un générateur de courant à 100V pendant 1h.

- Pendant le temps de migration, remplir le tableau de la dernière page.

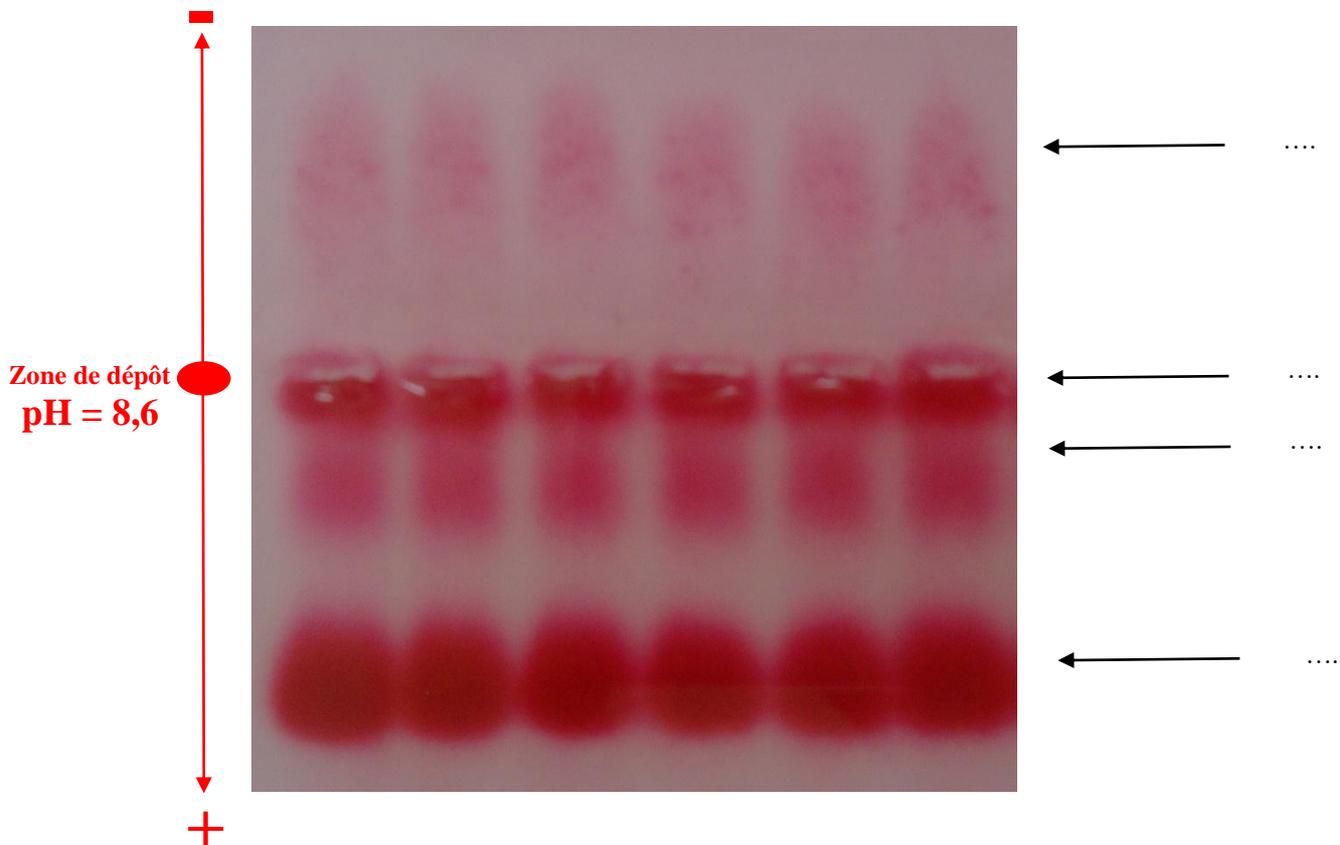
V- Coloration

- Après la migration, le gel est immédiatement immergé dans 50ml de solution de coloration pendant 10min sous agitation.

VI- Décoloration

- Le gel est immergé dans 50ml de solution de décoloration pendant 5min sous agitation. L'opération est répétée à trois reprises jusqu'à obtention d'un fond clair permettant la visualisation des bandes correspondant aux protéines.
- Comptez et identifiez les bandes protéiques.

VII- Résultat attendu



Rapport de TP :

- I. Identifier les protéines séparées,**
- II. Définir leurs propriétés (PM) et leurs intérêts dans l'œuf.**
- III. Répondre aux questions techniques ci-dessous :**
 - 1- Pourquoi le pH du tampon de migration est-il de 8,6 ? que pouvez vous déduire au sujet des pHi des protéines séparées ?**
 - 2- Comment le rouge ponceau colore t'il les protéines ? pourquoi est ce qu'on y rajoute du TCA ?**
 - 3- Quels sont les rôles de : BBP / EDTA / glycérol, dans la solution BBP**
 - 4- Pourquoi l'acide acétique décolore t'il le gel ?**

Remarque : Le rapport de TP doit être entièrement tapé à l'ordinateur, **et ne doit pas dépasser trois pages** (Inutile de réécrire le protocole !).

Note de TP : Rapport de TP / 16 points

Remise du rapport : tous les rapports doivent être envoyés par e mail **par la déléguée** de la promo au plus tard le Jeudi 24 Avril (**format PDF obligatoire**).