

ELECTROPHORESE DES PROTEINES SUR CELLOGEL

Proposé par Mireille JOSEPH

à l'intention des collègues de lycée qui m'en ont fait la demande

PRINCIPE

L'électrophorèse de zone est une technique très employée pour séparer les protéines d'après leur charge électrique. Les protéines, molécules amphotères, sont placées dans un milieu basique, elles acquièrent ainsi une charge globale négative et migrent de la **cathode (-)** vers l'**anode (+)**. Habituellement on obtient 5 zones correspondant à différentes globulines ayant des charges négatives décroissantes :

- l'albumine (la plus négative)
- les alpha 1 globulines
- les alpha 2 globulines
- les bêta globulines
- les gamma globulines (les moins négatives)

Les protéines se déplacent dans le cellogel sous l'influence du champ électrique, la migration est arrêtée dès que la séparation est suffisante. On effectue alors une fixation par colorant.

MATERIEL

- Un générateur de courant
- Une cuve électrophorèse
- Un applicateur simple
- Cellogel : 5,7x14 ou 2,5x15 (semi micro méthode)
2,5x17 (macrométhode)

REACTIFS

a) Tampon véronal-Tris pH 9,2

- Véronal Na 10,30 g (acide diéthylbarbiturique)
 - Véronal 1,84 g (diéthylbarbiturate de sodium)
 - Tris 7,20 g (trihydroxyméthylaminométhane)
 - Mélanger avec un peu d'eau et ajuster à 1000 ml H₂O

b) Colorant rouge ponceau

- 5 g pour 1 litre d'acide trichloracétique à 5%

c) Décolorant

- Solution H₃COOH à 5%

d) Solution de transparence

- **A froid (préparer au moment de l'emploi)**
 - 75 ml de méthanol + 20 ml acide acétique + 5 ml diacétonalcool
(100 ml suffisent pour 6 cellogel de 2,5x17)

(Personnellement c'est la méthode la mieux)

La transparence n'est pas obligatoire, mais elle est utile pour projeter sur rétroprojecteur

- **A chaud (préparer extemporanément)**

85 ml de méthanol + 15 ml d'acide acétique + 0,5 ml de glycérol

TECHNIQUE

Conserver le cellogel dans une solution de méthanol à 35%.

- 1) – Immerger le cellogel dans le tampon véronal (200 ml pour 6 cellogel de 2,5x14) pendant 15 mn minimum.
- 2) – Sécher légèrement chaque membrane entre deux feuilles de papier filtre pour éliminer l'excès de tampon.
- 3) – Repérer la face absorbante (face mate)
- 4) – Placer la bande sur le portoir face mate vers le haut

5) – Migration :

Macro-électrophorèse : migration 90 mn à 160 volts

Semi-micro électrophorèse : migration 32 mn à 200 volts

Effectuer un dépôt à 15 mm du bord du portoir (**coté cathodique**) avec un applicateur (lamelle ou micro-pipette)

6) – Fin de migration

- Arrêter le générateur
- Déconnecter la cuve
- Numéroter les bandes en utilisant le sérum comme marqueur

7) – Coloration

- Présenter la bande face mate (très important) contre le colorant
- Immerger et agiter immédiatement pendant 5 mn

8) – Décoloration

- 3 ou 4 bains jusqu'à obtention d'un fond **parfaitement blanc**

9) – Transparence à froid

- a) – Déshydrater le cellogel dans un bain de **méthanol pur** 3 à 5 mn
- b) – Immerger ensuite dans la solution de transparent 1 mn à 1mn 30, en agitant. Etendre la bande sur une plaque de verre très propre (face mate coté le verre). Éliminer très rapidement les bulles d'air et laisser sécher 1 heure à température ambiante.

On peut accélérer le séchage, seulement après transparence totale, en soufflant sous la plaque de verre avec un sèche cheveux. **Laisser refroidir avant de détacher les bandes.**

RESULTATS

Protéinogramme normal sur cellogel

Lecture au densitomètre Cellomatic, Super-cellomatic ou Cellomatic II

Albumine	61%	± 4
Alpha 1-globulines	2,5%	± 1,5
Alpha 2-globulines	8%	± 2
Bêta globulines	10%	± 2
Gamma globulines	16%	± 3,5

INTERET DU PROTEINOGRAMME

pour le dépistage de :

- **l'hypergammaglobulinémie** (augmentation de toutes les classes d'immunoglobulines)
- **l'hypogammaglobulinémie** (diminution de toutes les classes d'immunoglobulines)
- **le myélome ou macroglobulinémie de Waldenström** (apparition d'une bande très homogène signifiant la présence d'une protéine monoclonale)
- **le syndrome néphrotique** (hyper Alpha 2 et Bêta globuline avec diminution de l'albumine et des gammaglobulines)
- **l'athérosclérose** (augmentation des Bêta globulines)