

Électrophorèse

- 1 . *Electrophorèse Capillaire*
2. *Electrophorèse PAGE-SDS*
3. *Electrophorèse sur gel d'Agarose*



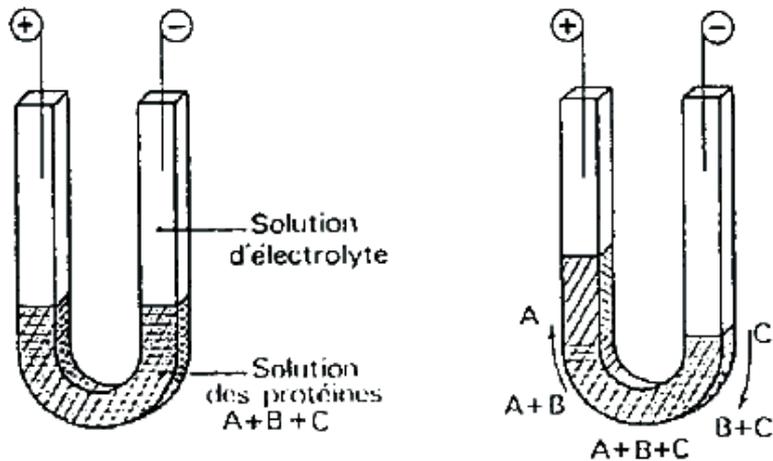
L'électrophorèse, la migration d'un ion dans un champ électrique, est utilisée dans les séparations analytiques des molécules biologiques ,

Elle constitue la technique parmi les plus puissantes et les plus faciles à utiliser dans la séparation des macromolécules

- les gels d'usage commun, l'agarose et le polyacrylamide, possèdent des pores de la taille des protéines à séparer.

UN PEU D'HISTOIRE ...

1937



**Séparation de protéines
dans le sérum humain**



The Nobel Prize in
Chemistry
1948



Arne Wilhelm Kaurin Tiselius

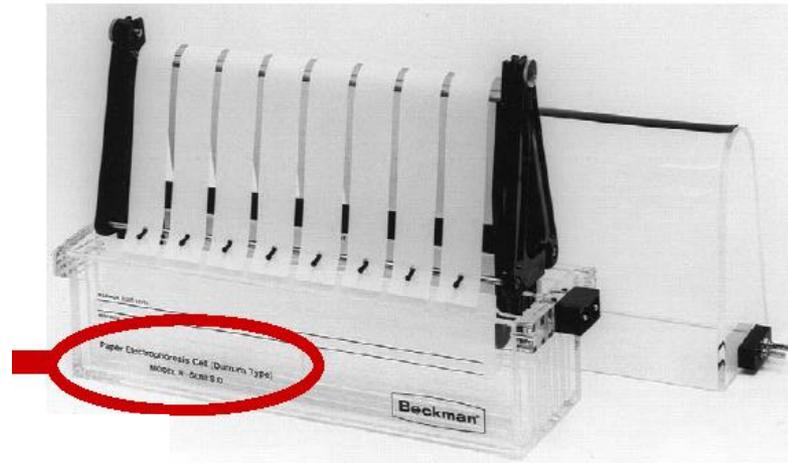
"for his research on electrophoresis and adsorption analysis, especially for his discoveries concerning the complex nature of the serum proteins"

... ET LA SUITE

1939

Séparation de protéines
par électrophorèse sur papier

1954



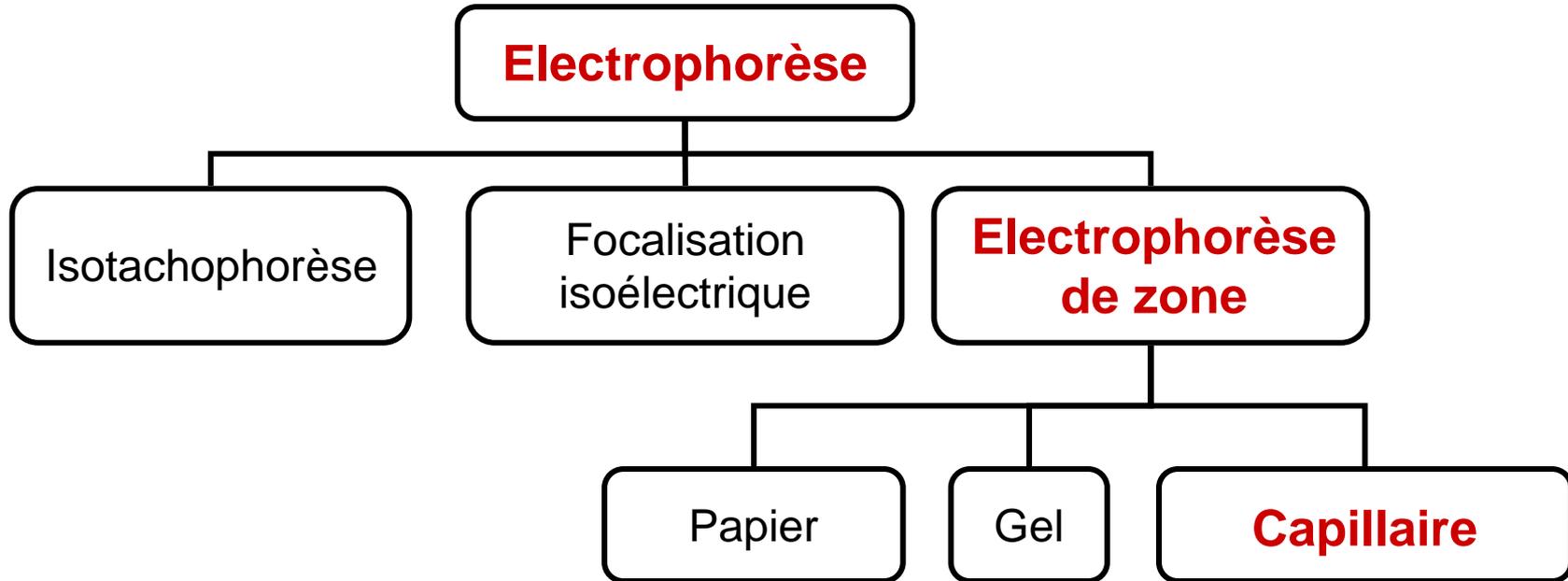
1967

S. Hjerten : capillaires de 300 μm i.d.

1981

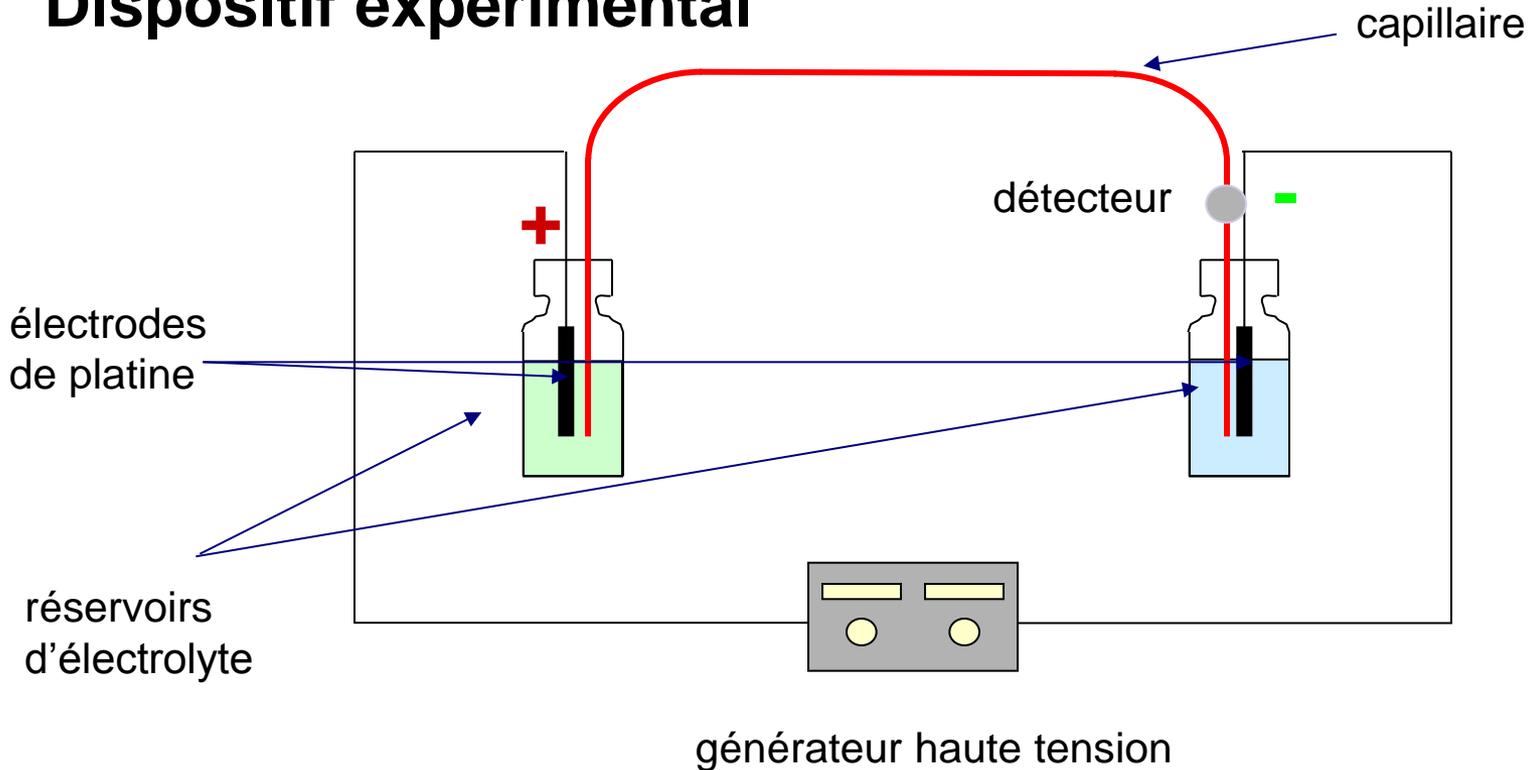
J. Jorgenson : capillaires de 75 μm i.d.

Une grande famille



1. *Électrophorèse Capillaire*

Dispositif expérimental



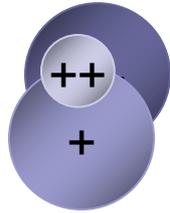
Capillaires conventionnels : silice

longueur : 20 - 100 cm

diamètre interne : 20 - 100 μm

Différences de potentiel : 10 - 40 kV

+



-

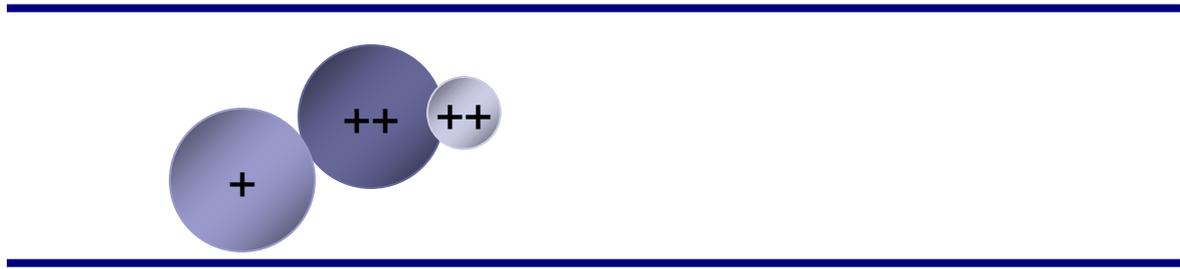
+



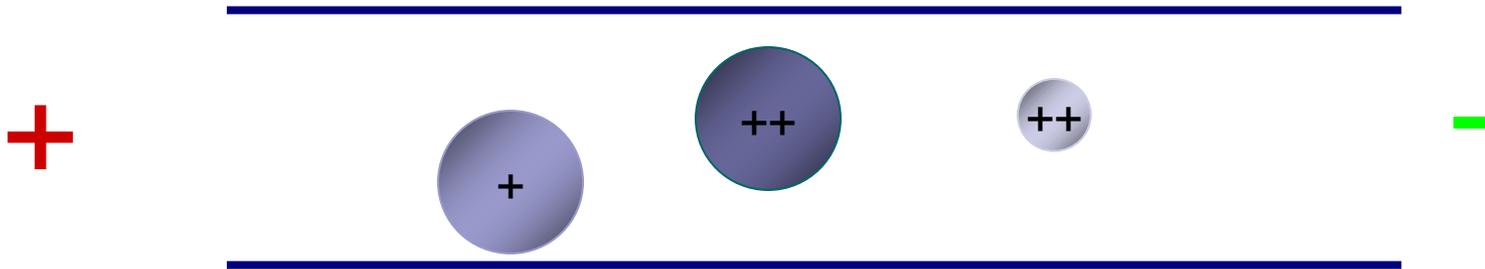
-



+



-



L'ELECTROPHORESE peut donc séparer :

- **des molécules portant des CHARGES DIFFERENTES,**
- **des molécules portant des CHARGES IDENTIQUES mais de TAILLES DIFFERENTES.**

Électrophorèse

2. Électrophorèse PAGE-SDS

- Aussi appelé PAGE (pour PolyAcrylamide Gel Electrophoresis), - les gels sont fabriqués à partir d'une polymérisation radicalaire d'acrylamide et N,N'-méthylènebisacrylamide dans un tampon ,

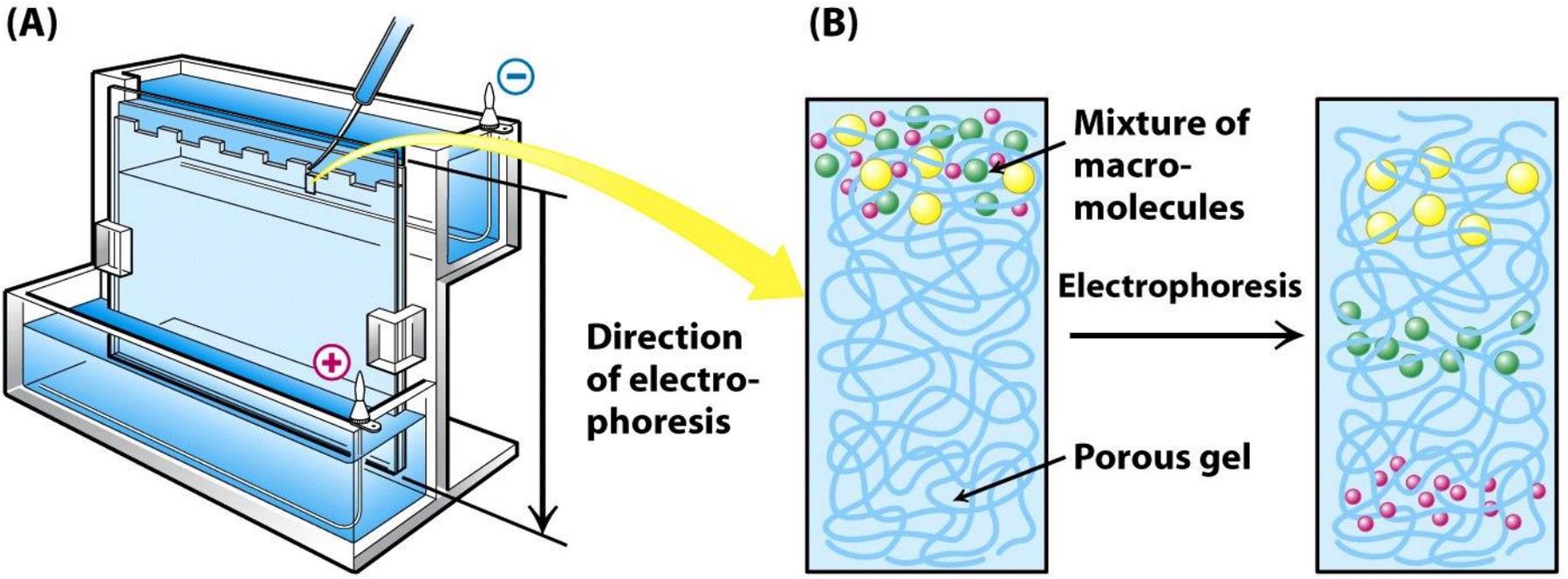


Figure 3-7
Biochemistry, Sixth Edition

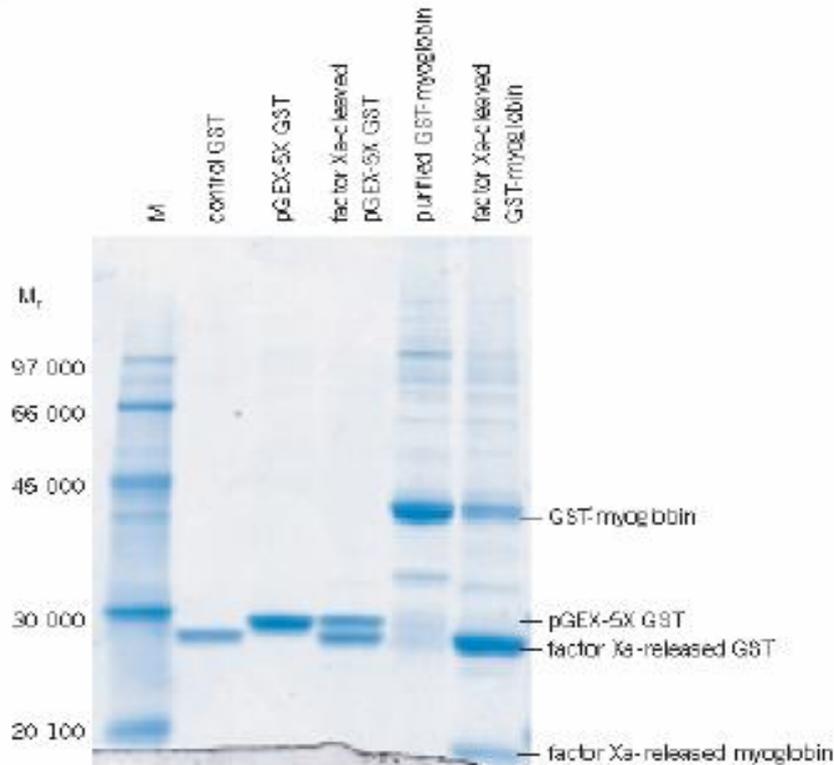
La séparation moléculaire est basée non seulement sur la mobilité électrophorétique des molécules, mais aussi sur le principe de filtration sur gel

Visualisation des protéines dans les gels

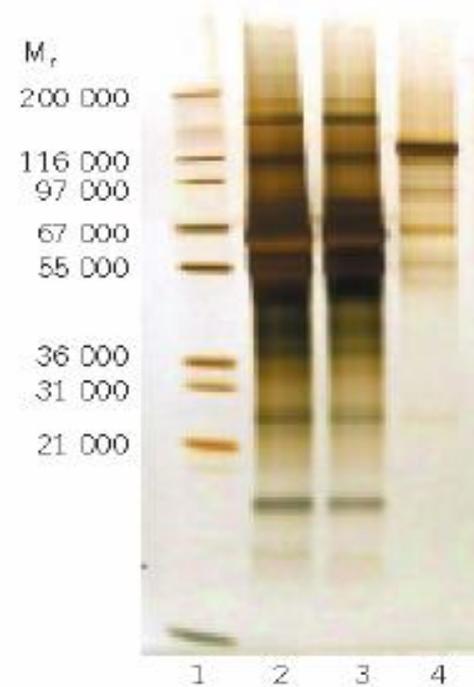
- une fois que la migration des protéines dans le gel est terminée, il faut visualiser les bandes obtenues par les protéines
- les différentes approches sont:
 - la coloration avec **le bleu de Coomassie** brillant (Figure A)
 - la coloration au **nitrate d'argent** (Figure B)
 - autoradiographie (si les protéines sont marquées avec **un isotope radioactif** comme le S35 ou le C14)
- ces approches vont cependant détecter toutes les protéines sur le gel.

Coloration de gels de protéines

A



B



Coloration au Bleu de Coomassie brillant

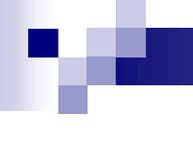
Coloration au nitrate d'argent

Électrophorèse

3. *Électrophorèse sur gel d'agarose*

[Animation](#)

[https://www.canal-u.tv/video/science en cours/la technique d electrophorese sur gel d a garose 2003.110](https://www.canal-u.tv/video/science_en_cours/la_technique_d_electrophorese_sur_gel_d_agarose_2003.110)



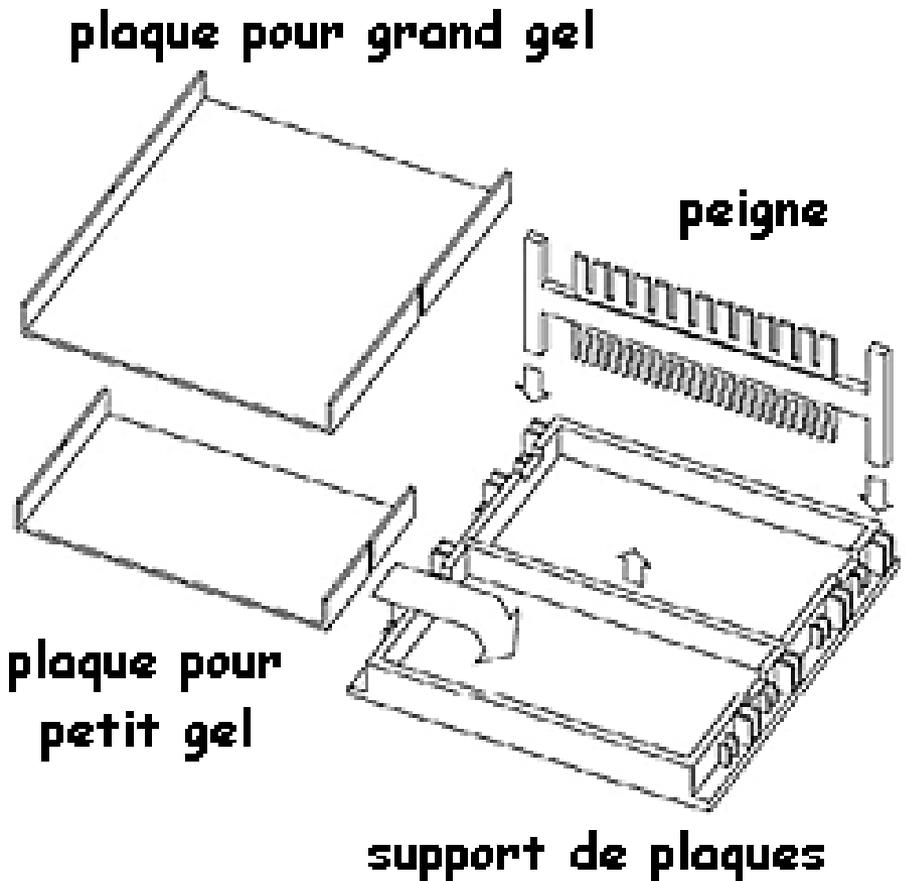
L'électrophorèse sur gel d'agarose est une méthode utilisée en biochimie et en biologie moléculaire pour séparer l'ADN, l'ARN en fonction de leur masse moléculaire.

La technique de l'électrophorèse sur gel d'agarose est basée sur la séparation des acides nucléiques chargés négativement sous l'effet d'un champ électrique.

Cette séparation s'effectue à travers la matrice du gel d'agarose : les molécules de plus petites tailles se déplacent plus rapidement et migreront plus loin que les molécules de tailles supérieures

Tampon d'électrophorèse :

- **TAE : Tris/Acétate 40mM - EDTA 1 mM - pH 8**
- **TBE : Tris/Borate 40mM - EDTA 1 mM - pH 8**
- **Tampon de charge : bleu de bromophénol 0,02% - xylène cyanol 0,02% - glycérol 3% - tampon TBE.**



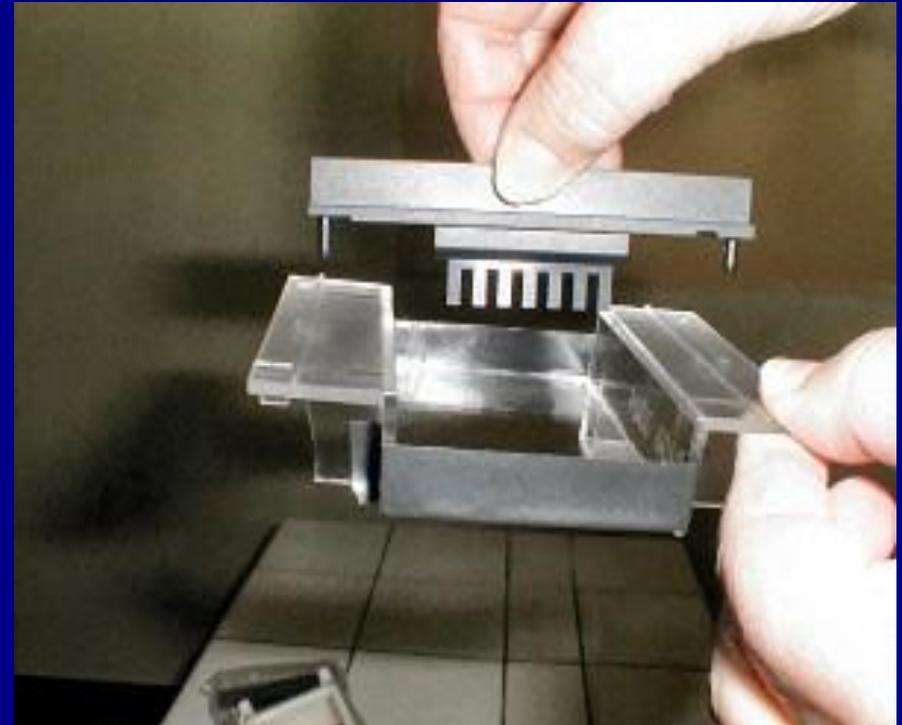
Préparation du gel

Réalisation du gel
d'agarose par dissolution à
chaud de poudre d'agarose
dans un tampon TBE à pH
8.2 et refroidissement
jusqu'à une température
voisine de 50°C.



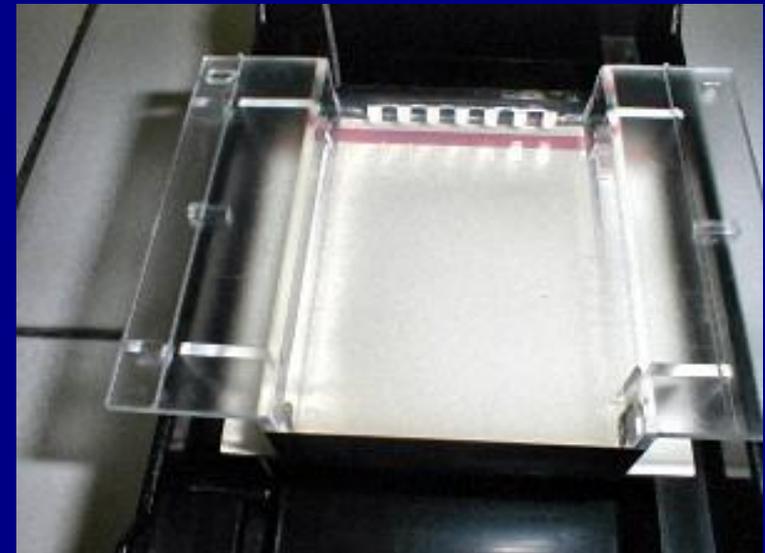
Préparation du moule
pour couler le gel :

après avoir obturé les deux extrémités du moule avec un scotch fort, placer le moule sur une surface bien horizontale et disposer dans les encoches prévues à cet effet le peigne nécessaire à la réalisation des puits dans le gel.



Coulage du gel :

verser lentement le gel dans la cuve sans dépasser le niveau supérieur des dents du peigne.



■ Dépôt de l'ADN dans les puits et la migration se fait dans le gel.

■ la cuve est mise sous tension pendant une heure environ.

