

# ELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE DES PROTEINES

PROTOCOLE UTILISE A L'INRA DE PIERROTON

Contact : [plomion@pierroton.inra.fr](mailto:plomion@pierroton.inra.fr)

Cédric Pionneau  
Christian Dubos  
Paulo Costa  
Céline Lalanne  
Delphine Madur  
Jean-Marc Gion  
Nasser Bahrman  
Et Christophe Plomion

Août 1998

Révisé en Novembre 2001

## PLAN DU PROTOCOLE POUR ELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE ANALYTIQUE

*1/ Extraction des protéines totales (1<sup>er</sup> jour)\**

*2/ Préparation des plaques pour l'électrophorèse résolutive (2<sup>eme</sup> jour)*

*3/ Préparation des gels d'électrofocalisation (2<sup>eme</sup> jour)*

Préparation de la solution d'électrofocalisation  
Polymérisation des gels d'électrofocalisation

*4/ Focalisation électrique (1<sup>ere</sup> dimension) : migration selon le pI  
(2<sup>eme</sup> jour)*

Préparation de la cuve de focalisation électrique  
Introduction des échantillons  
Conditions de migration  
Extraction des gels d'électrofocalisation (3<sup>eme</sup> jour)  
**Le système IPGphor**

*5/ Préparation des gels de résolution (3<sup>eme</sup> jour)*

Préparation de la solution de résolution  
Polymérisation des gels de résolution

*6/ Electrophorèse résolutive (2<sup>eme</sup> dimension) : migration selon la  
masse moléculaire (3<sup>eme</sup> jour)*

Préparation de la cuve de migration  
Dépôt des gels d'électrofocalisation (1<sup>ere</sup> dimension) sur les gels de résolution  
Conditions de migration

*7/ Coloration et scanning des gels 2 D (4<sup>eme</sup> jour)*

Préparation des gels 2 D  
Coloration  
Scanning des gels 2 D

*8/ Séchage des gels 2 D (5<sup>eme</sup> jour)*

*9/ Quelques exemples de gels d'électrophorese bidimensionnelle*

**\*Lorsque la 1<sup>ere</sup> dimension est réalisée à l'aide du système IPGphor, 2 jours sont nécessaires pour faire migrer 20 échantillons. Il est donc utile d'extraire les protéines la semaine précédente.**

## ELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE DE PROTEINES : PROTOCOLE DETAILLE

L'électrophorèse bidimensionnelle de protéines s'effectue par série de 20 gels, soit 20 échantillons, et nécessite une semaine de travail de laboratoire : 1 jour pour l'extraction des protéines, 1 jour pour la séparation des protéines dans la première dimension (ou 2 jours avec le système IPGphor), 1 jour pour la séparation des protéines dans la deuxième dimension, 1 à 5 jour pour la coloration (selon le protocole choisi) et le scanning des gels et 1 jour pour le séchage des gels. Ce protocole suit l'ordre des manipulations mais cet ordre ne correspond pas à l'ordre chronologique, certaines manipulations pouvant être faites la veille pour le lendemain.

### 1/ Extraction des protéines totales (1<sup>er</sup> jour)

Avant toute chose, vérifier la présence d'azote liquide et mettre en marche la centrifugeuse afin qu'elle atteigne la température de -4°C.

Les différentes étapes sont récapitulées en ANNEXE 1 « EXTRACTION DES PROTEINES TOTALES DE PINUS PINASTER »

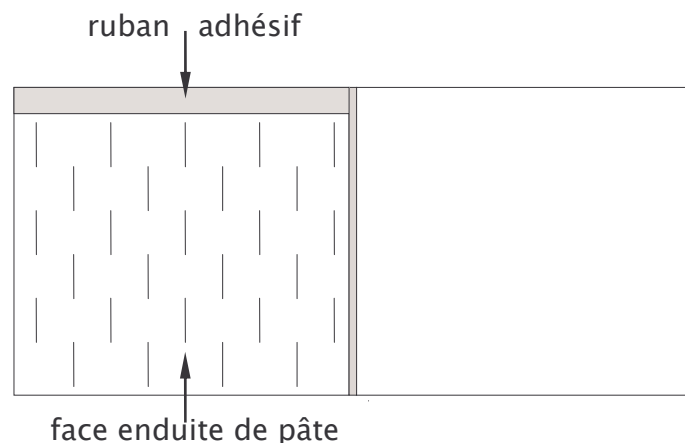
Le dosage des protéines se fera par la méthode de Bradford , voir ANNEXE 1Bis

### 2/ Préparation des plaques pour l'électrophorèse résolutive (2<sup>eme</sup> jour)

Ouvrir les plaques (dimensions : 253×230×3 mm) et nettoyer soigneusement les faces internes à l'acétone (opération à effectuer sous la hotte). Enlever les restes éventuels d'acrylamide de l'électrophorèse précédente à l'aide d'un scalpel.

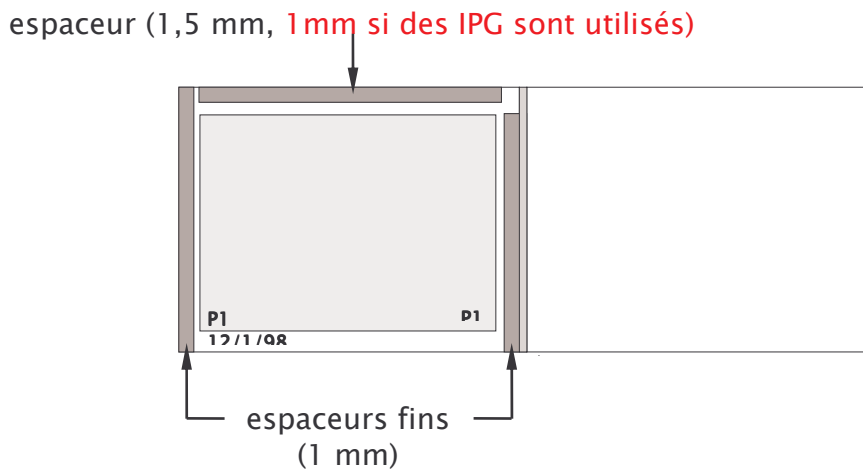
Pour une coloration au Nitrate d'Argent :

Coller en haut de la face interne gauche et sur toute la longueur du ruban adhésif. Déposer sur la même face un peu de graisse silicone (pâte 70428) puis bien l'étaler à l'aide d'une spatule : la graisse silicone doit former un film uniforme couvrant toute la face, hormis le ruban adhésif.



Mettre en place le GelBond recouvert de son papier protecteur (préalablement coupé pour avoir une largeur de 24,5 cm) en le manipulant par les bords et avec des gants, côté hydrophobe contre la face enduite de pâte et haut du GelBond au ras du ruban adhésif (on peut déterminer quel côté du GelBond est hydrophobe ou hydrophile en faisant couler un peu d'eau dessus).

Laisser le papier protecteur puis passer trois fois le rouleau à pâtisserie sur le GelBond afin qu'il adhère correctement à la plaque. Enlever le ruban adhésif ainsi que l'excès de pâte autour du GelBond. Oter le papier protecteur. Déposer les espaceurs (épaisseur : 1 mm et 1,5 mm) comme indiqué sur le schéma ci-dessous. Référencer les plaques en inscrivant sur le GelBond le numéro de la plaque (exemple : P1) et la date du lendemain (exemple : 12/1/98).



Refermer les plaques et les mettre à l'abri de la lumière sous papier aluminium.

#### Pour une coloration au bleu colloïdal :

Ne pas mettre de GelBond sur les plaques car il empêche la coloration. Mettre les espaceurs de 1mm sur les côtés des plaques et un espaceur plus large de 1 mm en haut de la plaque ( voir schéma ci-dessus ) Refermer les plaques et les disposer dans la cuve de coulage.

### *3/ Préparation des gels d'électrofocalisation (2<sup>eme</sup> jour)*

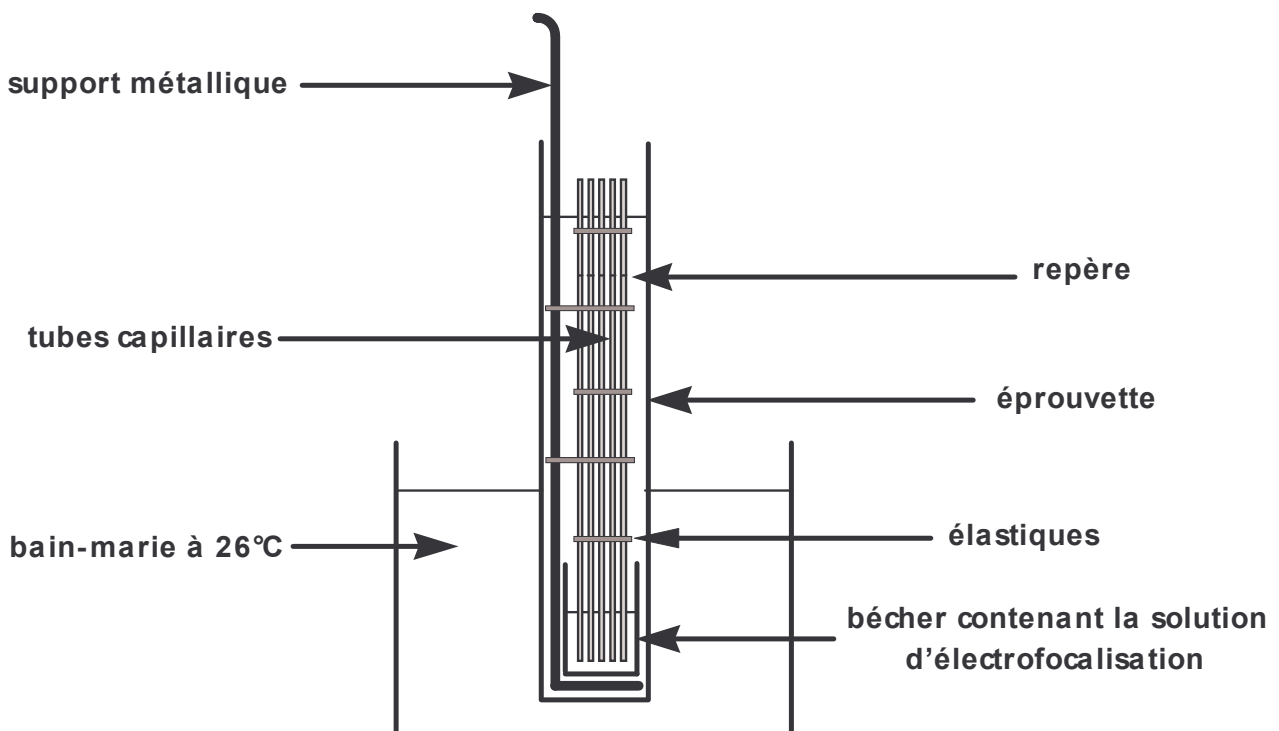
Rincer 22 tubes capillaires de diamètre intérieur 1,5 mm (mis à tremper dans du détergent) à l'eau déminéralisée pendant 5 minutes. Les rincer ensuite à l'alcool puis à l'acétone. Laisser sécher. Mettre en marche le thermoplongeur pour que la température du bain-marie soit de 26°C. Placer dans le bain une éprouvette de 1 l contenant environ 600 ml d'eau déminéralisée. Préparer 12 ml d'une solution de persulfate d'ammonium à 10% (1,2 g de persulfate d'ammonium + eau déminéralisée qsp 12 ml).

## Préparation de la solution d'électrofocalisation

Voir l'ANNEXE 2 « SOLUTIONS POUR ELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE AVEC BOUDINS » pour les différents constituants et leurs quantités. Peser l'urée puis ajouter toutes les solutions. Compléter à 20 ml avec de l'eau déminéralisée. Utiliser les ultrasons pour dissoudre complètement l'urée (la température du bain ne doit pas dépasser les 28°C : ajouter de la glace pour abaisser la température). Compléter à nouveau à 20 ml. Filtrer la solution à l'aide d'une seringue et d'un embout filtrant (porosité : 0,22 µm) puis mettre la solution à dégazer (en utilisant une fiole à vide et une pompe à vide).

## Polymérisation des gels d'électrofocalisation

Regrouper les 22 tubes capillaires à l'aide de 3 élastiques. Marquer un repère au feutre noir à 24 cm de la base des tubes. Placer l'ensemble dans un bécher de 50 ml relié à un support métallique. Laisser un espace de 1 mm entre le fond du bécher et la base des tubes. Lier les tubes au support métallique avec 3 élastiques. Ajouter à la solution électrofocalisation préalablement préparée et dégazée 30 µl d'une solution de persulfate à 10 %. Agiter doucement puis verser la solution dans le bécher que l'on maintient au chaud dans les mains afin que l'urée ne recristallise pas. Compléter délicatement avec de l'eau déminéralisée jusqu'au ras du bécher puis immerger doucement l'ensemble support-bécher-tubes dans l'éprouvette remplie d'eau déminéralisée et thermostatée. Ajouter de l'eau déminéralisée dans l'éprouvette jusqu'à ce que le niveau de la solution dans les tubes atteigne le repère à 24 cm tracé auparavant (la solution d'électrofocalisation monte dans les tubes grâce au poids de l'eau se trouvant au-dessus d'elle). Laisser polymériser 3 heures.



Après polymérisation, sortir les tubes capillaires délicatement du bécher. Dégager les tubes du reste d'acrylamide à l'aide d'un scalpel, en coupant au ras de la base des tubes et sur les bords

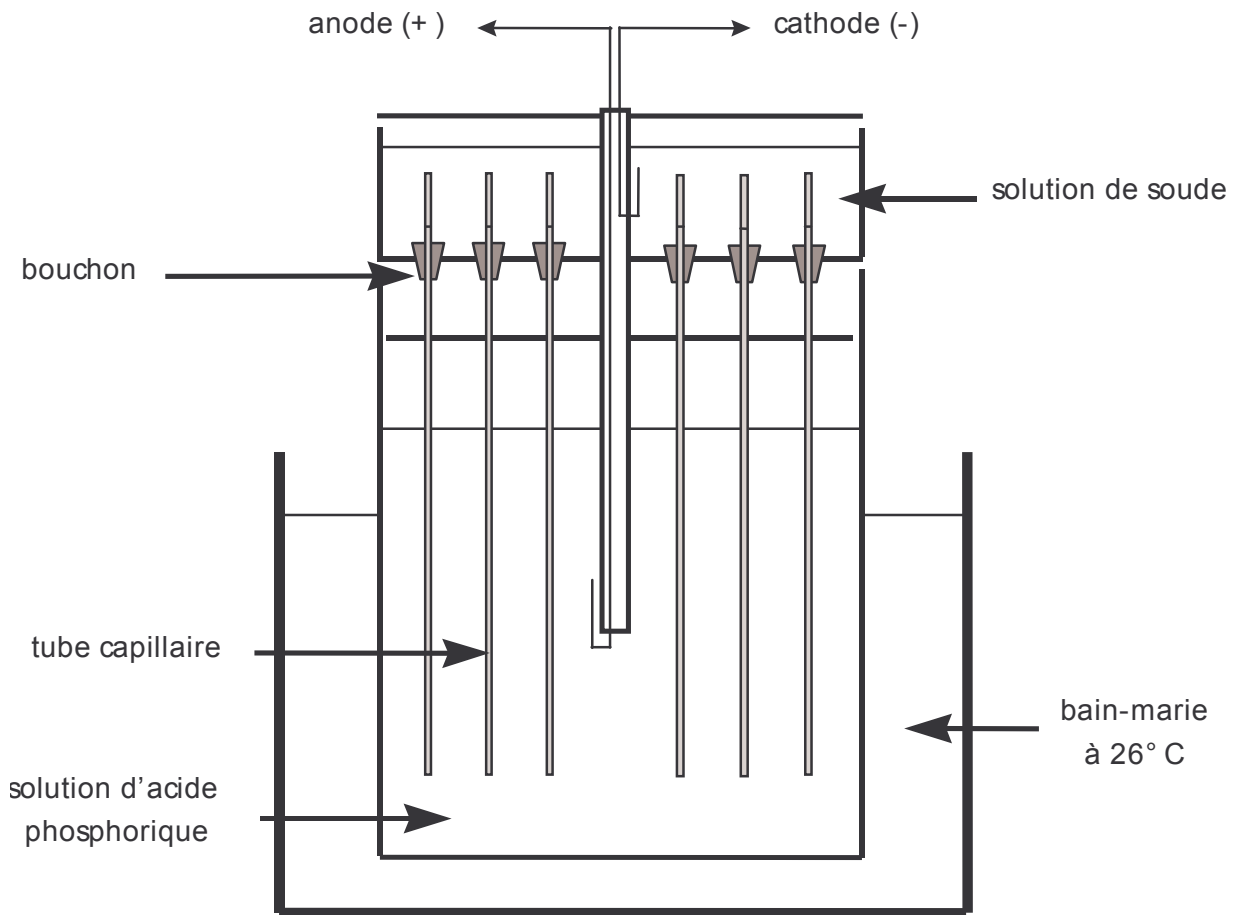
#### 4/ Focalisation électrique (1<sup>ère</sup> dimension) : migration selon le pI (2<sup>ème</sup> jour)

##### Préparation de la cuve de focalisation électrique

Préparer la solution de soude (voir l'ANNEXE 2 : « SOLUTIONS POUR ELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE AVEC BOUDINS ») puis la mettre à dégazer jusqu'à utilisation. Remplir la partie inférieure de la cuve d'une solution d'acide phosphorique (voir l'ANNEXE 2 : « SOLUTIONS POUR ELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE AVEC BOUDINS »). Placer la cuve dans le bain-marie à 26°C. Sur la partie supérieure de la cuve, déposer, sans les enfoncer, les bouchons préalablement immergés dans de l'eau déminéralisée. Insérer chaque tube dans un bouchon (la base du tube est préalablement mouillée pour faciliter son insertion). 21 tubes peuvent être placés dans la cuve.

##### Introduction des échantillons

A l'aide d'une seringue Hamilton à aiguille longue, ôter la fine couche d'acrylamide non polymérisée au-dessus des gels. Déposer l'extrait protéique (40 µl d'une solution à 30 µl/mg) sur le gel et compléter jusqu'au ras des tubes avec la solution de soude. Verser la solution de soude dans la cuve supérieure, jusqu'à immerger complètement les bouchons. Après avoir vérifié qu'il n'y pas de fuites au niveau de ces derniers, remplir la cuve supérieure jusqu'au trait indiqué (le niveau de la solution de soude doit dépasser les tubes capillaires d'au moins 1 cm).



### Conditions de migration

Relier la partie supérieure de la cuve au pôle négatif du générateur et la partie inférieure de la cuve au pôle positif. Régler le générateur sur 40 000 Vh, mettre l'ampérage et la puissance au maximum. Eteindre puis rallumer le générateur pour remettre l'intégrateur à zéro. Appliquer 500 V pour la première ½ heure puis 1000 V pour la deuxième ½ heure. Augmenter à 2200 V et laisser migrer toute la nuit. Appliquer 2500 V (maximum 2900 V) le lendemain matin pour terminer plus rapidement la migration.

### Extraction des gels d'électrofocalisation (3<sup>ème</sup> jour)

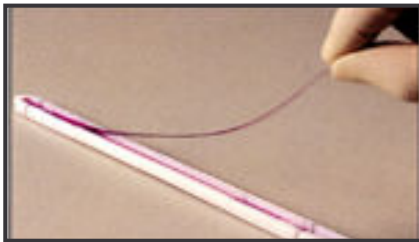
Extraire les gels des tubes à l'aide d'une seringue remplie d'eau sur laquelle est placé un cône jaune coupé à sa base. Les gels sont déposés sur des baguettes rigides puis stockés à -20° C jusqu'à utilisation (on peut les stocker pendant une semaine maximum). Mettre les 22 tubes capillaires à tremper pendant 3 jours dans de l'eau contenant un bouchon de détergent type TFD 7 de FRANKLAB.

## *Focalisation électrique avec le système IPGphor : migration selon le pI*

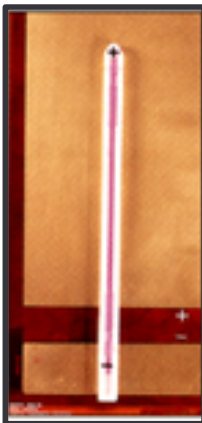
Les gels ou strips sont commercialisés prêts à l'emploi, sous forme déshydratée, avec un gradient de pH établi. Différentes longueurs de strips et différentes gammes de pH sont disponibles. Nous utilisons des strips de 24 cm avec un gradient de pH 4-7.



Mélanger le volume choisi d'échantillon protéique avec le tampon de réhydratation des strips (T.C.T.) Le volume maximal des strips est de 470  $\mu$ l. Déposer le mélange au centre du sarcophage. Eliminer les bulles éventuelles. Le volume d'échantillon déposé correspond à 50  $\mu$ g de protéines pour une coloration au Nitrate d'Argent ou 250 à 300  $\mu$ g de protéines pour une coloration au bleu colloïdal. Il est également possible de charger l'échantillon protéique dans les puits du sarcophage, à la fin de la réhydratation (7,5  $\mu$ l/puits).



Enlever le film protecteur du strip, puis installer le strip, gel vers le bas, extrémité pointue vers extrémité pointue du sarcophage, en prenant soin de répartir la solution tout le long du sarcophage et de ne pas faire de bulles. Le gel doit être en contact avec les 2 électrodes du sarcophage.



Recouvrir le strip d'huile Amersham pour minimiser l'évaporation et la cristallisation de l'urée. (~2 ml). Placer le couvercle et installer le sarcophage dans l'IPGphor, côté pointu vers l'anode (+).



Programmation de l'IPGphor : 50  $\mu$ A/strip, 20°C

30 V	~12 h	Réhydratation active	} IEF
200 V	1 h	Step-n-hold	
500 V	1 h	Step-n-hold	
1000 V	1 h	Step-n-hold*	
8000 V	30 min	Gradient	
8000 V	qsp 50 000 VHR (AgNO <sub>3</sub> ) qsp 74 000 VHR (Bleu colloïdal)		

\*A la fin des 1000V, rajouter des petits papiers filtres imbibés d'eau (mais non détremés) au niveau des électrodes, pour éviter le dessèchement du strip. Rajouter de l'huile si nécessaire.

Le système IPGphor peut contenir jusqu'à 12 sarcophages. 2 jours sont donc nécessaires pour réaliser la focalisation de 20 échantillons.

L'IEF étant lancée à 17h, l'ajout des papiers filtres se fera à 8h00 le lendemain matin, la fin de la migration étant prévue aux alentours de 15h pour une migration jusqu'à 50 000 VHR et vers 18h00 pour une migration allant jusqu'à 74 000 VHR.

Equilibration des strips ( voir ANNEXE 2 BIS )

Cette étape permet notamment de saturer le strip en SDS, ce qui est nécessaire pour la migration en 2<sup>nde</sup> dimension.

Retirer les strips du sarcophage à l'aide de pinces, puis les égoutter sur papier pour enlever l'huile. Les placer ensuite individuellement dans des tubes, support plastique du strip contre la paroi du tube.

Ajouter dans chaque tube 10 ml de la solution d'équilibration contenant du DTT (voir ANNEXE 2 BIS) et les placer sous agitation pendant 15 min.

Vider les tubes , ajouter 10 ml de solution d'équilibration contenant de l'iodoacétamide (voir ANNEXE 2 BIS) dans chacun et les remettre sous agitation pendant 15 min.

Vider les tubes, retirer les strips, les égoutter sur papier, les placer sur des supports plastique rigides, emballer le tout dans du papier aluminium et stocker à -80°C.

Rincer les sarcophages rapidement à l'eau pour enlever l'huile, les mettre à tremper plusieurs heures dans une solution de 2 à 5 % d'IPGphor Strip Holder Cleaning Solution (Amersham), puis les frotter à l'aide d'une brosse à dents et de solution pure. Bien rincer ensuite à l'eau.

## 5/ Préparation des gels de résolution (3<sup>eme</sup> jour)

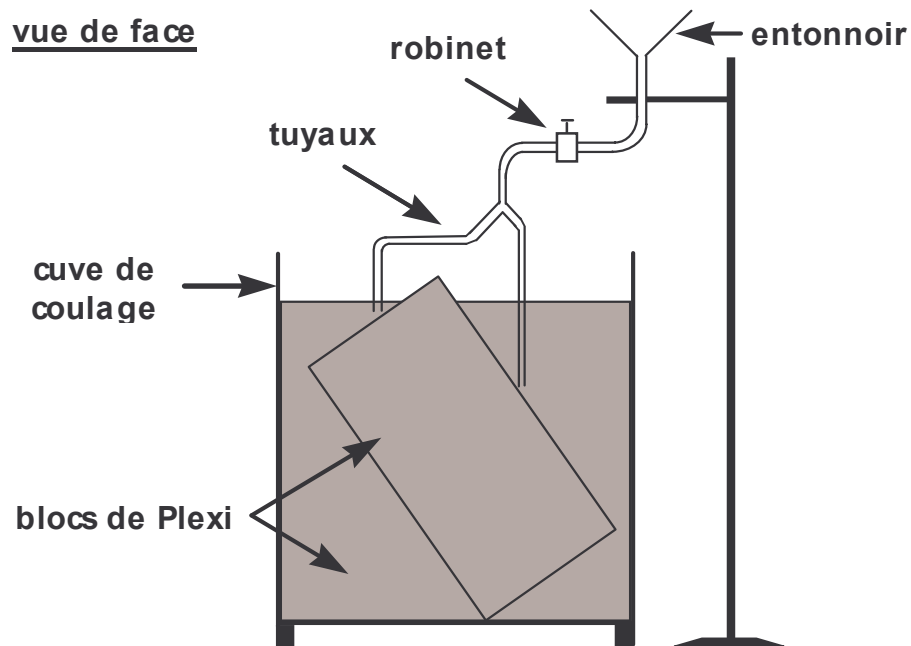
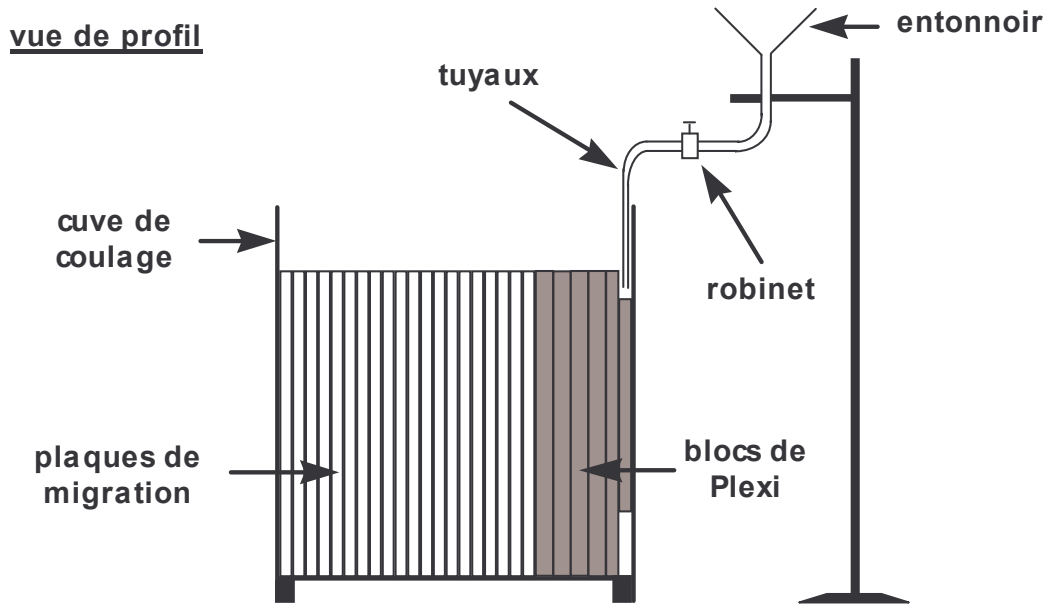
### Préparation de la solution de résolution

Voir l'ANNEXE 2 : « SOLUTIONS POUR ELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE AVEC BOUDINS » pour les différents constituants et leurs quantités. Dans une éprouvette de 2 l, verser l'acrylamide puis compléter à 1 l avec de l'eau déminéralisée. Ajouter ensuite le TRIS, le saccharose préalablement dissous puis de l'eau déminéralisée QSP 2 l. Verser les 2 l de solution dans un erlenmeyer de 5 l. Dans une éprouvette de 500 ml, verser 462,5 ml d'eau déminéralisée et ajouter 37,5 ml de SDS. Verser les 500 ml obtenus dans l'erlenmeyer. Filtrer sous vide les 2,5 l de la solution de résolution à l'aide d'un entonnoir filtrant cylindrique (porosité : 40 à 100 µm) et d'une fiole à vide. Laisser reposer une ½ heure afin que la mousse disparaisse puis dégazer (2 h).

### Polymérisation des gels de résolution

Mettre en place le joint de la cuve de coulage. Disposer les 20 plaques préparées la veille dans la cuve, haut des plaques en bas et charnière à droite. Placer 5 blocs de Plexi (4 gros blocs + 1 bloc fin) contre les plaques et fermer la cuve.

Enfoncer en biais un petit bloc de Plexi entre les blocs déjà en place et la paroi de la cuve pour assurer un serrage parfait des plaques. Mettre en place les 2 tuyaux de coulage contre le bloc placé en biais, comme indiqué sur les schémas suivants.



Ajouter à la solution de résolution préalablement préparée et sous agitation 10,4 ml d'une solution de persulfate à 10 % ainsi que 1,67 ml de TEMED. Si la température de la pièce est trop élevée, l'acrylamide peut polymériser très rapidement. Ceci peut être évité en diminuant de 10 % les quantités d'APS et de Temed (APS : 9,4 ml ; Temed : 1,5 ml) et en plaçant le récipient sur de la glace.

Verser lentement la solution dans l'entonnoir, jusqu'à ce que la solution de résolution dans la cuve dépasse les plaques d'environ 1 cm. Veiller à ce qu'il ne se forme pas de bulles d'air à l'intérieur de la solution lors du coulage. Laisser polymériser 3 heures.

Variante qui peut être utilisée dans le cas des strips :

Dans le cas des strips, si le front du gel de 2<sup>nd</sup>e dimension n'est pas droit, le strip ne pourra pas être bien en contact avec le gel sur toute sa longueur. Les protéines seront alors obligées de traverser l'agarose avant de pénétrer dans l'acrylamide, ce qui peut entraîner l'apparition de spots en forme de gouttes d'eau.

Lors du coulage des gels de 2<sup>nd</sup>e dimension, positionner les plaques dans la cuve haut des plaques en haut. Verser la solution de résolution dans l'entonnoir, jusqu'à ce qu'elle arrive à 1,5 cm du haut des plaques. Recouvrir alors le haut du gel avec du butanol saturé d'eau, ce qui permet, après évaporation de celui-ci d'obtenir un front parfaitement droit.

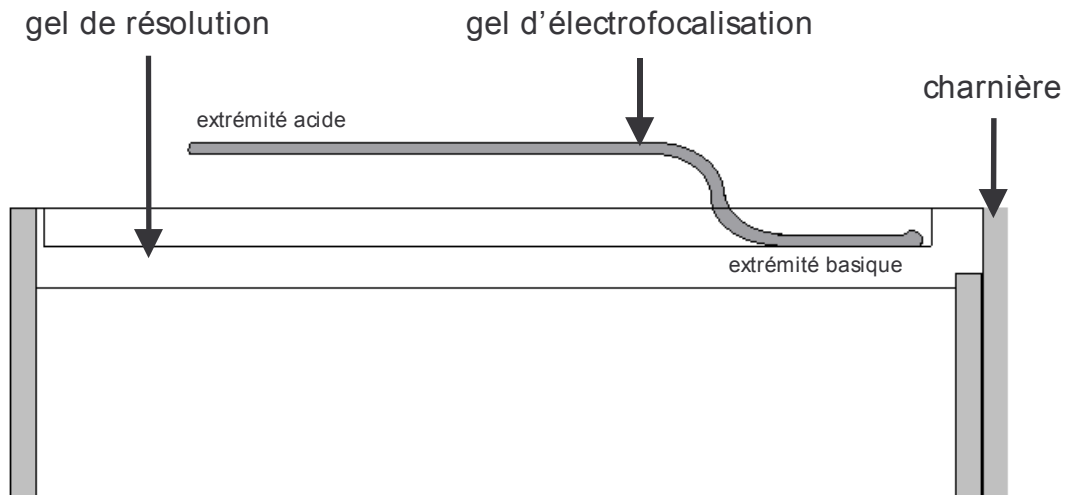
6/ Electrophorèse résolutive (2<sup>eme</sup> dimension) : migration selon la masse moléculaire (3<sup>eme</sup> jour)

Préparation de la cuve de migration

Remplir la cuve avec 30 l d'eau déminéralisée. Dissoudre dans 4 l d'eau déminéralisée tous les constituants du tampon d'électrode (Voir l'ANNEXE 2 : « SOLUTIONS POUR ELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE AVEC BOUDINS »). Verser ces 4 l dans la cuve puis mettre en route la pompe et le circuit réfrigérant (la température du circuit est réglée à 10°C, ce qui correspond à environ 15°C dans la cuve).

Dépôt des gels d'électrofocalisation (1<sup>ere</sup> dimension) sur les gels de résolution

Avant de commencer le dépôt des gels d'électrofocalisation, préparer 100 ml d'une solution d'agarose à 1 % (agarose à bas point de fusion) avec le tampon de migration comme solvant et la mettre au bain-marie (régler la température du bloc chauffant à 200°C pour faire fondre rapidement l'agarose, puis maintenir la solution à 40°C). Décongeler les gels d'électrofocalisation. Démouler les plaques et les nettoyer en les plongeant dans de l'eau déminéralisée. Pour chaque plaque, retirer l'espaceur du haut et sécher le haut du gel de résolution avec du papier filtre. A l'aide d'une spatule et d'un peu de tampon de cuve, déposer délicatement et progressivement le gel d'électrofocalisation sur le gel de résolution correspondant, extrémité basique (renflée) coté charnière (voir schéma ci-dessous). Eviter la formation de bulles d'air entre le gel d'électrofocalisation et le gel de résolution.



Une fois les gels d'électrofocalisation en place, les recouvrir de la solution d'agarose à 1 % préalablement chauffée à 40°C au bain-marie. Laisser refroidir l'agarose quelques minutes. Nettoyer les plaques puis les placer dans la cuve : pour cela, mouiller d'abord chaque plaque en l'immergeant dans le tampon puis l'insérer dans le support, haut du gel côté cathode (-) et charnière en bas.

### Dépôt des strips (1<sup>ère</sup> dimension) sur les gels de résolution

Avant de commencer le dépôt des strips, préparer 100 ml d'une solution d'agarose Low Melting 1 % (voir ANNEXE 2 BIS) et la mettre au bain-marie pour faire fondre l'agarose.

Décongeler les strips et couper la partie plastique située côté anode (pointue) et côté cathode.

Démouler les plaques et les nettoyer en les plongeant dans de l'eau déminéralisée. Pour chaque plaque, retirer l'espaceur du haut, rincer à l'eau et sécher le haut du gel de résolution avec du papier filtre.

Remplir le haut du gel d'agarose. Rincer le strip dans le tampon de cuve et le déposer à l'aide de pinces en haut du gel 2D et le faire descendre à l'aide d'une spatule (côté cathode vers la charnière). Laisser l'agarose polymériser pendant 15 min, puis installer les plaques dans la cuve : pour cela, mouiller d'abord chaque plaque en l'immergeant dans le tampon puis l'insérer dans le support, haut du gel côté cathode (-) et charnière en bas.

## Conditions de migration

Mettre l'ampérage au maximum. Régler le voltage jusqu'à ce que le courant soit de 0,3 A (environ 60 V) pour la première ½ heure, puis 0,6 A (environ 90 V) pour la deuxième ½ heure. Enfin augmenter le voltage jusqu'à obtenir 110 V maximum ou 0,9 A. Laisser migrer 16 heures. La migration nécessite donc 17 heures et elle est effectuée la nuit.

## 7/ Coloration et scanning des gels 2 D (4<sup>eme</sup> jour)

### Préparation des gels 2 D

Après la fin de la deuxième migration, sortir les plaques de la cuve de migration. Ouvrir les plaques à l'envers de telle sorte que le GelBond soit tourné face à soi. Oter les espaceurs latéraux. Enlever l'acrylamide au-dessus et au-dessous du GelBond. Nettoyer sommairement le GelBond avec un peu d'acétone. Placer le gel dans un support métallique.

### Coloration

Voir ANNEXE 3 : « COLORATION DES GELS AU NITRATE D'ARGENT » pour la préparation des différents bains. Les bains sont effectués dans des cuves en inox et sont en permanence agités à l'aide de petits barreaux aimantés. Les spots protéiques commencent à apparaître lors du premier des 3 bains de révélation (bains contenant du formaldéhyde). Le bain d'acide acétique suivant permet d'arrêter la coloration.

Voir ANNEXE 4 : « COLORATION DES GELS AU BLEU COLLOIDAL » pour la préparation des différentes solutions. La coloration au bleu se fait à saturation pendant 5 jours. Les gels colorés sont ensuite rincés dans l'eau et scannés. On peut par la suite prélever les spots intéressants pour une analyse au spectromètre de masse.

### Scanning des gels 2 D (système BiImage)

Avant toute chose, allumer une ½ heure avant la table lumineuse afin que celle-ci ait le temps de chauffer. Fermer les volets et éteindre la lumière de la salle. Avant le scanning proprement dit des gels, une calibration est nécessaire si l'on désire quantifier les spots protéiques. Les étapes de calibration sont décrites ci-dessous :

**A/** Placer la caméra à la bonne hauteur. Ouvrir BioImage 2 D ANALYSE puis cliquer sur ANALYSE.

Dans le menu SCAN, ouvrir SCAN KODAK CAMERA

Dans la fenêtre de réglage, choisir 1024×1024 dans IMAGE DIMENSION, SCAN STEP TABLET dans INTENSITY STANDARD et SCAN AND ANALYSE.

Installer le 1<sup>er</sup> gel sur une plaque de verre, face acrylamide contre le verre.

Mettre en place la plaque supportant le gel sur la table lumineuse et l'entourer complètement avec les caches noirs.

Régler EXPOSURE TIME jusqu'au niveau de luminosité souhaité. Régler alors le focus (environ 1,5 à 2) pour avoir une image du gel aussi nette que possible (l'ouverture doit rester à 8).

**B/** Retirer le gel et installer à la place la tablette de calibration Transmission 21, chiffre 1 en bas et à gauche. L'entourer complètement avec les caches noirs. La tablette à l'écran doit être coupée par l'axe horizontal vert. Choisir 21-STEP TRANSMISSIVE (#1) dans SIZE STEP TABLET.

Régler EXPOSURE TIME jusqu'à obtenir une image de la tablette aussi nette que possible (si l'image n'est toujours pas nette, déplacer légèrement la tablette).

Cliquer sur le bouton SIZE.

Retirer la tablette et nettoyer la table lumineuse.

Cliquer sur le bouton EQUALIZE.

**C/** Remettre en place le gel comme précédemment. Donner un nom au gel.

Régler EXPOSURE TIME jusqu'au niveau de luminosité souhaité.

Cliquer sur le bouton SCAN.

Remettre en place une deuxième fois la tablette et cliquer sur OK. La calibration est alors terminée. L'icône de l'image scannée apparaît sur le bureau.

**D/** Cliquer 2 fois sur l'icône.

Sélectionner le projet dans lequel l'image doit être sauvegardée.

Régler les paramètres (en général 10, 30, 6 et 15) de détection automatique des spots puis cliquer sur FIND SPOTS.

Cliquer sur CONTINUE ANALYSIS pour sauvegarder l'image.

**E/** Mettre en place le gel suivant sur la table lumineuse.

Dans le menu SCAN, ouvrir SCAN KODAK CAMERA

Choisir PREVIOUS VALUES dans INTENSITY STANDARD.

Donner un nom au gel.

Régler EXPOSURE TIME jusqu'au niveau de luminosité souhaité.

Cliquer sur le bouton SCAN.

L'icône de l'image scannée apparaît sur le bureau.

La calibration étant terminée, repartir seulement de l'étape D.

## Scanning des gels 2 D (Scanner Amersham, Logiciel Labscan)

### Quelques consignes en préambule :

Ce scanner est waterproof, on peut l'utiliser pour scanner des gels humides.  
Nettoyage des vitres H<sub>2</sub>O + EtOH 95%.

Toujours allumer le scanner et le laisser s'initialiser avant d'allumer l'ordinateur.

Vérifier que le scanner est calibré.

- ❖ S'il y a une calibration déjà faite alors vérifier que le filtre utilisé correspond bien au type de gel que vous voulez scanner ( AgNO<sub>3</sub> ou bleu colloïdal ou autoradiographie...) .Si cela est correct alors vous pouvez scanner vos gels ( voir paragraphe « scanner un gel » )
- ❖ S'il n'y a pas de calibration ou si vous devez en refaire une autre car vous avez changer le filtre du scanner, vous devez utiliser la réglette Kodak comportant différents niveaux de gris pour calibrer le scanner  
Tenir la réglette uniquement par le côté noir pour éviter de mettre des traces de doigts sur la partie claire de la réglette.  
Pour calibrer le scanner voir le paragraphe « calibration »

### La calibration :

1. Positionner la réglette des niveaux de gris dans le scanner
2. Définir les paramètres suivants :  
Résolution : 300 dpi  
Brightness : 253  
Contrast : maxi
3. Aller dans Scanner options et choisir les paramètres suivants :  
Couleur : **Lumière bleue ou verte** pour gels colorés au **Nitrate d'Argent**  
**Lumière rouge** pour gels colorés au **bleu de coomassie**  
**Lumière verte ou normale** pour les **autoradiographie**

Light Path : **Transmissive** ( pour les gels )  
Reflective ( pour les images opaques)

Choisir 16 bits

4. Cliquer sur **Refresh Preview** pour visualiser la réglette
5. Définir la zone à scanner à l'aide de la souris
6. Cliquer sur **Scan**.  
Le logiciel nous prévient qu'il n'y a pas de calibration et nous demande si on veut continuer. Répondre **oui**
7. Une fois la réglette scannée, entrer dans le mode **Calibrate**

Units : Diffuse density

Type de courbe : en général quadratic ou log quadratic

Sélectionner toutes les valeurs de DO et les amener sur la gamme de gris. Les déplacer jusqu'à ce qu'on obtienne une courbe. Tant qu'on n'a pas de courbe, les hautes valeurs sont saturées. Eventuellement les supprimer.

8. Une fois la calibration terminée, l'enregistrer sous « nom.tif » dans le répertoire Labscan.  
Pour rappeler une calibration existante, ouvrir le fichier correspondant, entrer dans le mode calibration et cliquer sur **Revert to Default Calibration**.
9. Cliquer ensuite dans **Scan a new image** pour scanner les gels.

#### Scanner un gel :

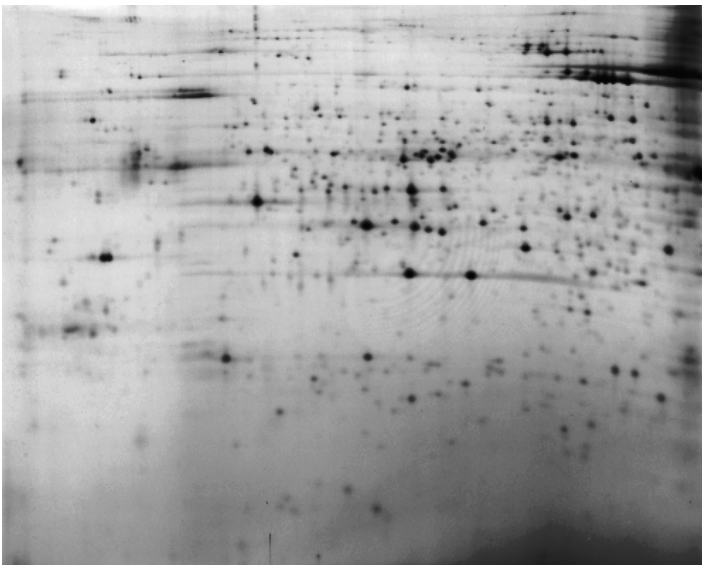
1. Cliquer sur l'icône Image Master Labscan V3.00
2. Cliquer sur **Scan a new image**
3. Placer le gel dans le scanner. Seules les zones bordées de vert seront scannées
4. Cliquer sur **Refresh Preview** (brouillon)
5. Définir la zone à scanner à l'aide du rectangle vert
6. Cliquer sur **Scan**
7. Enregistrer l'image dans le répertoire désiré

### 8/ Séchage des gels 2 D (4<sup>eme</sup> jour)

Placer une feuille de Cellophane mouillée sur le support poreux du sécheur de gels et bien la tendre pour éliminer les plis. Déposer les gels sur le Cellophane, face acrylamide contre le Cellophane. Couvrir les gels avec la feuille plastique du sécheur puis faire le vide. Mettre en marche la plaque chauffante (réglée à 80°C) et laisser sécher 2 heures.

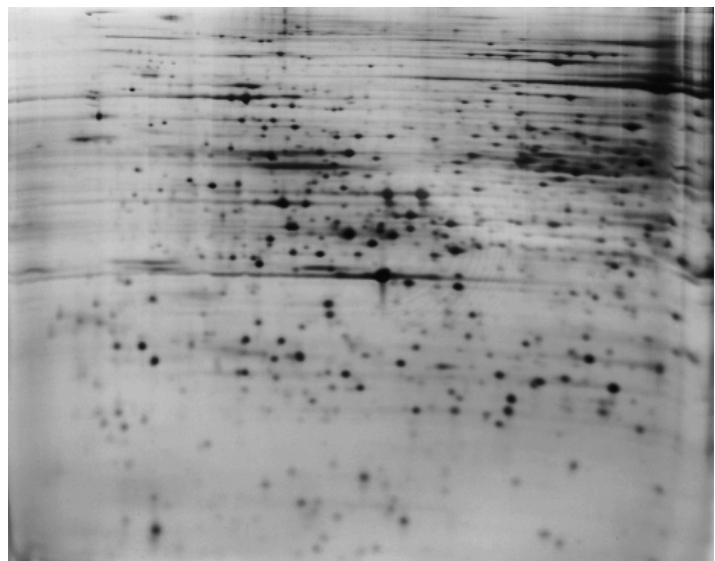
### 9/ Quelques exemples de gels (boudins) d'électrophorese bidimensionnelle

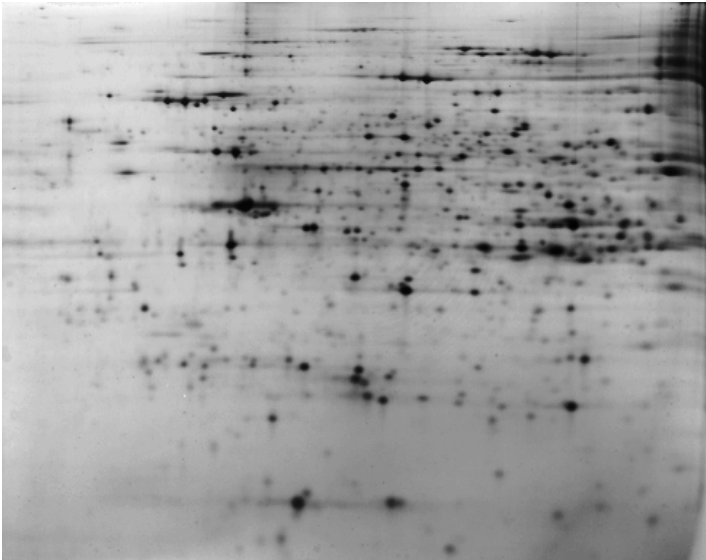
Voici ce que l'on peut obtenir après avoir suivi le protocole qui vient d'être décrit :



Xylème de Peuplier

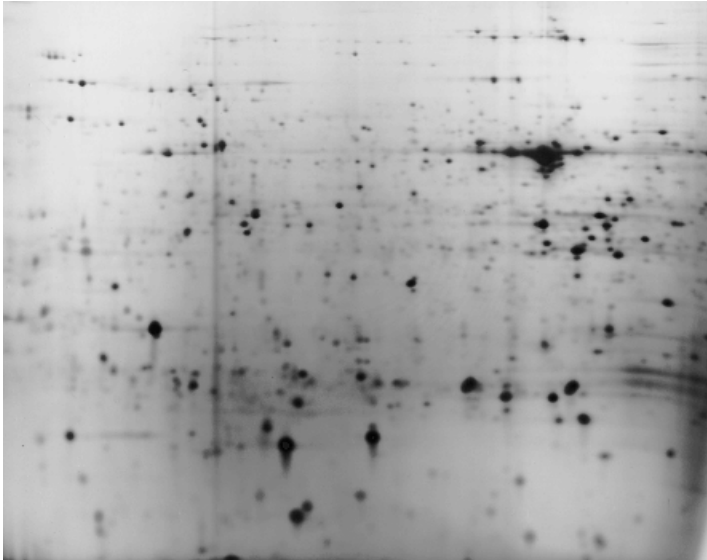
Xylème d'Eucalyptus





Xylème de Pin

Aiguille de Pin



## PLAN DU PROTOCOLE POUR ELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE PREPARATIVE

### 1/ Extraction des protéines totales (1<sup>er</sup> jour)

### 2/ Préparation des plaques pour l'électrophorèse résolutive (2<sup>eme</sup> jour)

### 3/ Préparation des gels d'électrofocalisation (2<sup>eme</sup> jour)

Préparation de la solution d'électrofocalisation

Polymérisation des gels d'électrofocalisation

### 4/ Focalisation électrique (1<sup>ere</sup> dimension) : migration selon le pI (2<sup>eme</sup> jour)

Préparation de la cuve de focalisation électrique

Introduction des échantillons

Conditions de migration

Extraction des gels d'électrofocalisation (3<sup>eme</sup> jour)

Equilibration des gels d'électrofocalisation (3<sup>eme</sup> jour)

5/ Préparation des gels de résolution et de concentration (3<sup>ème</sup> jour)

Préparation de la solution de résolution  
Polymérisation des gels de résolution

Préparation de la solution de concentration

Polymérisation des gels de concentration

6/ Electrophorèse résolutive (2<sup>ème</sup> dimension) : migration selon la masse moléculaire (3<sup>ème</sup> jour)

Préparation de la cuve de migration

Dépôt des gels d'électrofocalisation (1<sup>ère</sup> dimension) sur les gels de concentration

Conditions de migration

7/ Coloration des gels 2 D (4<sup>ème</sup> jour)

Préparation des gels 2 D

Coloration

8/ Prélèvement des spots protéiques (4<sup>ème</sup> et 5<sup>ème</sup> jour)

## ELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE PREPARATIVE POUR LE MICROSEQUENCAGE : PROTOCOLE DETAILLE

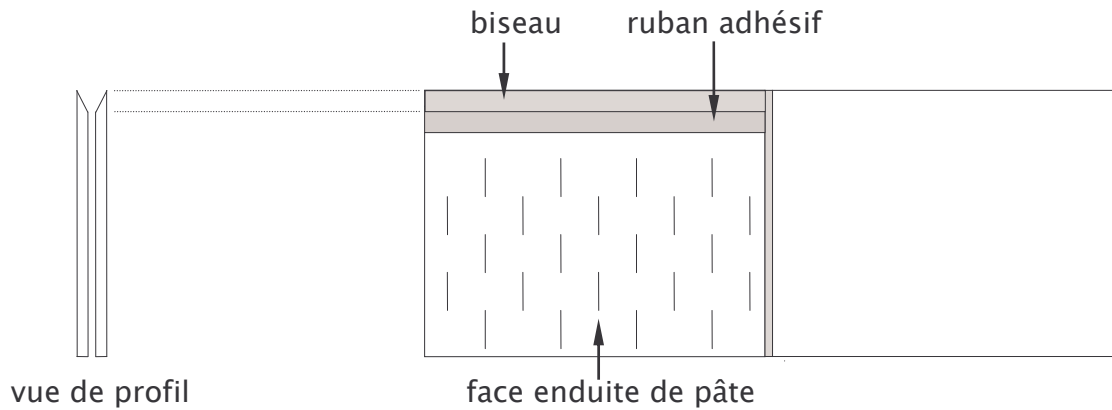
L'électrophorèse bidimensionnelle préparative pour le microséquençage diffère peu de l'électrophorèse bidimensionnelle analytique : seuls changent le diamètre des gels d'électrofocalisation, la quantité des protéines chargée, l'épaisseur des gels de résolution et la présence chez ces derniers d'un gel de concentration. L'électrophorèse bidimensionnelle préparative pour le microséquençage utilise les mêmes appareillages que l'électrophorèse bidimensionnelle analytique et nécessite autant de temps. Ce protocole suit l'ordre des manipulations mais cet ordre ne correspond pas à l'ordre chronologique, certaines manipulations pouvant être faites la veille pour le lendemain. Les parties propres à l'électrophorèse bidimensionnelle préparative sont bordées d'un trait.

### 1/ Extraction des protéines totales (1<sup>er</sup> jour)

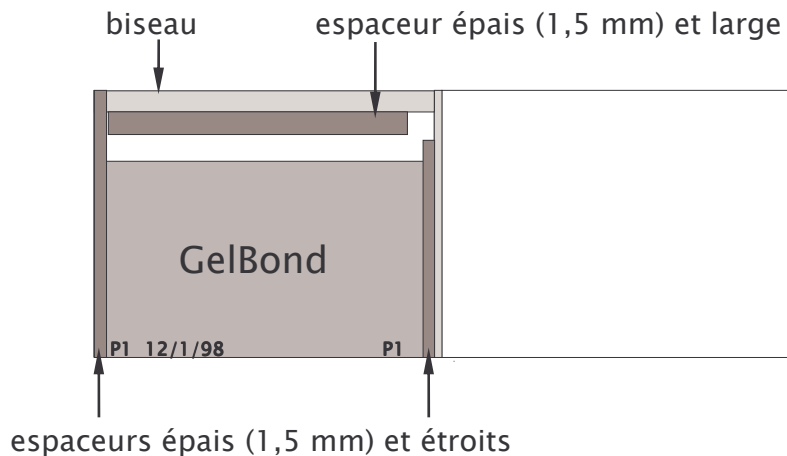
Elle ne diffère pas de l'extraction des protéines effectuée pour l'électrophorèse bidimensionnelle analytique. Prévoir seulement plus de tissus pour obtenir une plus grande quantité d'extrait protéique (on utilise 10 fois plus d'extrait protéique que pour l'électrophorèse bidimensionnelle analytique).

### 2/ Préparation des plaques pour l'électrophorèse résolutive (2<sup>eme</sup> jour)

Ouvrir les plaques (dimensions : 253×230×4 mm) et nettoyer soigneusement les faces internes à l'acétone (opération à effectuer sous la hotte). Enlever les restes éventuels d'acrylamide de l'électrophorèse précédente à l'aide d'un scalpel. En haut de la face interne gauche, coller au bas du biseau et sur toute la longueur du ruban adhésif (voir schéma ci-dessous). Déposer sur la même face un peu de graisse silicone (pâte 70428) puis bien l'étaler à l'aide d'une spatule : la graisse silicone doit former un film uniforme couvrant toute la face, hormis le ruban adhésif.



Mettre en place le GelBond recouvert de son papier protecteur (préalablement coupé pour avoir une largeur de 24,5 cm) en le manipulant par les bords et avec des gants, côté hydrophobe contre la face enduite de pâte et bas du GelBond au bord inférieur de la face (on peut déterminer quel côté du GelBond est hydrophobe ou hydrophile en faisant couler un peu d'eau dessus). Laisser le papier protecteur puis passer trois fois le rouleau à pâtisserie sur le GelBond afin qu'il adhère correctement à la plaque. Enlever le ruban adhésif ainsi que l'excès de pâte autour du GelBond. Oter le papier protecteur. Déposer les espaceurs (épaisseur : 1,5 mm) comme indiqué sur le schéma ci-dessous. Référencer les plaques en inscrivant sur le GelBond le numéro de la plaque (exemple : P1) et la date du lendemain (exemple : 12/1/98).



Refermer les plaques et les mettre à l'abri de la lumière sous papier aluminium.

### 3/ Préparation des gels d'électrofocalisation (2<sup>eme</sup> jour)

Rincer 22 tubes capillaires de 3 mm de diamètre intérieur (préalablement mis à tremper dans du détergent) à l'eau déminéralisée pendant 5 minutes. Les rincer ensuite à l'alcool puis à l'acétone. Laisser sécher. Mettre en marche le thermoplongeur pour que la température du bain-marie soit de 26°C. Placer dans le

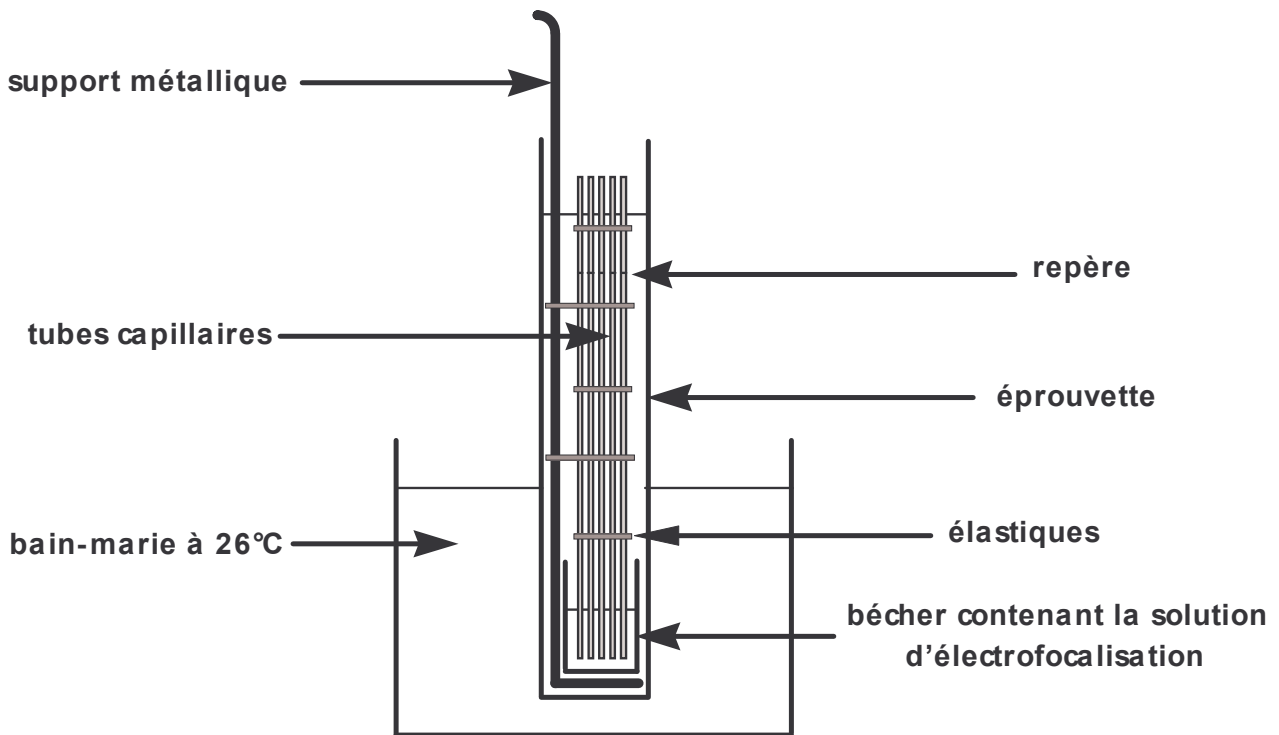
bain une éprouvette de 1 l contenant environ 600 ml d'eau déminéralisée. Préparer 15 ml d'une solution de persulfate d'ammonium à 10% (1,5 g de persulfate d'ammonium + eau déminéralisée qsp 15 ml).

### Préparation de la solution d'électrofocalisation

Voir l'ANNEXE 2 : « SOLUTIONS POUR ELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE AVEC BOUDINS » pour les différents constituants et leurs quantités. Peser l'urée puis ajouter toutes les solutions. Compléter à 50 ml avec de l'eau déminéralisée. Utiliser les ultrasons pour dissoudre complètement l'urée (la température du bain ne doit pas dépasser les 28°C : ajouter de la glace pour abaisser la température). Compléter à nouveau à 50 ml. Filtrer la solution à l'aide d'une seringue et d'un embout filtrant (porosité : 0,22 µm) puis mettre la solution à dégazer (en utilisant une fiole à vide et une pompe à vide).

### Polymérisation des gels d'électrofocalisation

Regrouper les 22 tubes capillaires à l'aide de 3 élastiques. Marquer un repère au feutre noir à 24 cm de la base des tubes. Placer l'ensemble dans un bécher de 100 ml relié à un support métallique. Laisser un espace de 1 mm entre le fond du bécher et la base des tubes. Comblent l'espace entre les tubes et la paroi du bécher avec 3 petits tubes à hémolyse. Lier les tubes au support métallique avec 3 élastiques. Ajouter à la solution électrofocalisation préalablement préparée et dégazée 75 µl d'une solution de persulfate à 10 %. Agiter doucement puis verser la solution dans le bécher que l'on maintient au chaud dans les mains afin que l'urée ne recristallise pas. Compléter délicatement avec de l'eau déminéralisée jusqu'au ras du bécher puis immerger doucement l'ensemble support-bécher-tubes dans l'éprouvette remplie d'eau déminéralisée et thermostatée. Ajouter de l'eau déminéralisée dans l'éprouvette jusqu'à ce que le niveau de la solution dans les tubes atteigne le repère à 24 cm tracé auparavant (la solution d'électrofocalisation monte dans les tubes grâce au poids de l'eau se trouvant au-dessus d'elle). Laisser polymériser 3 heures.



Après polymérisation, sortir les tubes capillaires délicatement du bécher. Dégager les tubes du reste d'acrylamide à l'aide d'un scalpel, en coupant au ras de la base des tubes et sur les bords.

#### 4/ Focalisation électrique (1<sup>ère</sup> dimension) : migration selon le pI (2<sup>ème</sup> jour)

##### Préparation de la cuve de focalisation électrique

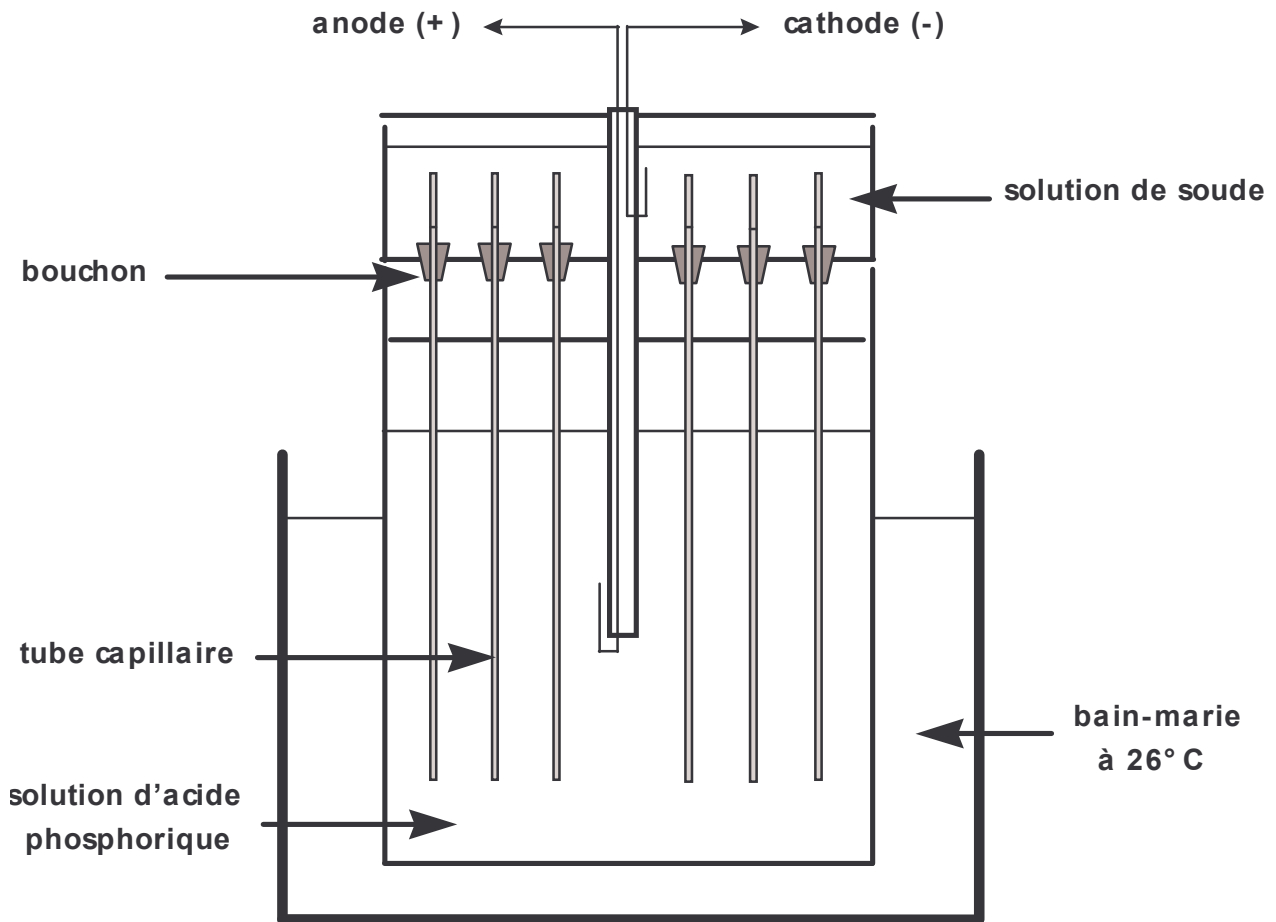
Préparer la solution de soude (voir l'ANNEXE 2 : « SOLUTIONS POUR ELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE AVEC BOUDINS ») puis la mettre à dégazer jusqu'à utilisation. Remplir la partie inférieure de la cuve d'une solution d'acide phosphorique (voir l'ANNEXE 2 : « SOLUTIONS POUR ELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE AVEC BOUDINS »).

Placer la cuve dans le bain-marie à 26°C. Sur la partie supérieure de la cuve, déposer, sans les enfoncer, les bouchons préalablement immergés dans de l'eau déminéralisée. Insérer chaque tube dans un bouchon (la base du tube est préalablement mouillée pour faciliter son insertion). 21 tubes peuvent être placés dans la cuve.

##### Introduction des échantillons

A l'aide d'une seringue Hamilton à aiguille longue, ôter la fine couche d'acrylamide non polymérisée au-dessus des gels. Avec une P1000, déposer 400 µl d'extrait protéique (solution à 30 µl/mg) sur le gel et compléter jusqu'au ras des tubes avec la solution de soude. Verser la solution de soude dans la cuve supérieure, jusqu'à

immerger complètement les bouchons. Après avoir vérifié qu'il n'y pas de fuites au niveau de ces derniers, remplir la cuve supérieure jusqu'au trait indiqué (le niveau de la solution de soude doit dépasser les tubes capillaires d'au moins 1 cm).



### Conditions de migration

Relier la partie supérieure de la cuve au pôle négatif du générateur et la partie inférieure de la cuve au pôle positif. Régler le générateur sur 40 000 Vh, mettre l'ampérage et la puissance au maximum. Appliquer 500 V pour la première ½ heure puis 1000 V pour la deuxième ½ heure. Augmenter à 2200 V et laisser migrer toute la nuit. Appliquer 2500 V (maximum 2900 V) le lendemain matin pour terminer plus rapidement la migration.

### Extraction des gels d'électrofocalisation (3<sup>eme</sup> jour)

Extraire les gels des tubes à l'aide d'une seringue remplie d'eau sur laquelle est placé un cône jaune coupé à sa base. Les gels sont déposés sur des supports plastiques rigides dont les extrémités sont obstruées de façon étanche avec du PARAFILM. Mettre les 22 tubes capillaires à tremper pendant 3 jours dans de l'eau contenant un bouchon de détergent type TFD 7 de FRANKLAB.

### Equilibration des gels d'électrofocalisation (3<sup>ème</sup> jour)

Les gels d'électrofocalisation préparés ici étant plus épais que les gels d'électrofocalisation analytique, il est nécessaire de les équilibrer, c'est-à-dire de les immerger dans un tampon d'équilibration (voir l'ANNEXE 2 : « SOLUTIONS POUR ELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE AVEC BOUDINS ») afin que tout le gel soit imprégné de SDS. On utilise pour cela les supports plastiques sur lesquels ont été déposés les gels. Verser environ 12 ml de tampon d'équilibration dans le support afin d'immerger complètement le gel. Attendre 12 min puis retirer soigneusement tout le tampon à l'aide d'une P5000. Emballer soigneusement le support dans du papier aluminium puis stocker à -20° C jusqu'à utilisation.

## 5/ Préparation des gels de résolution et de concentration (3<sup>ème</sup> jour)

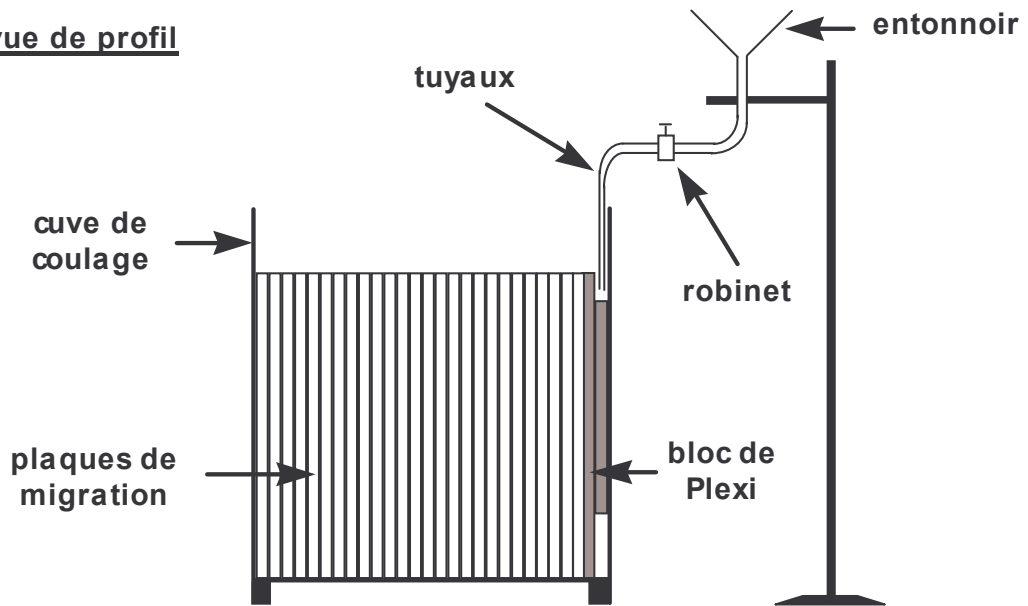
### Préparation de la solution de résolution

Voir l'ANNEXE 2 : « SOLUTIONS POUR ELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE AVEC BOUDINS » pour les différents constituants et leurs quantités. Dans une éprouvette de 2 l, verser l'acrylamide puis compléter à 1 l avec de l'eau déminéralisée. Ajouter ensuite le TRIS et le saccharose puis de l'eau déminéralisée QSP 2 l. Verser les 2 l de solution dans un erlenmeyer de 5 l. Dans une éprouvette de 1 l, verser 659,5 ml d'eau déminéralisée et ajouter 40,5 ml de SDS. Verser les 700 ml obtenus dans l'erlenmeyer. Filtrer sous vide les 2,7 l de la solution de résolution à l'aide d'un entonnoir filtrant cylindrique (porosité : 40 à 100 µm) et d'une fiole à vide. Laisser reposer une ½ heure afin que la mousse disparaisse puis dégazer (2 h).

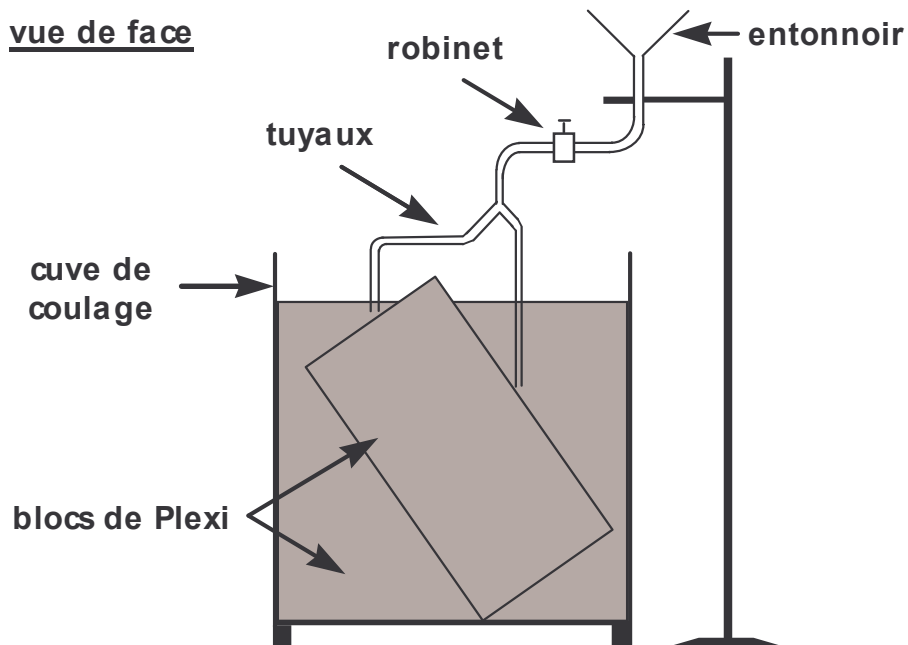
### Polymérisation des gels de résolution

Mettre en place le joint de la cuve de coulage. Disposer les 20 plaques préparées la veille dans la cuve, haut des plaques en bas et charnière à droite. Placer un bloc de Plexi fin contre les plaques et fermer la cuve. Enfoncer en biais un petit bloc de Plexi entre les blocs déjà en place et la paroi de la cuve pour assurer un serrage parfait des plaques. Mettre en place les 2 tuyaux de coulage contre le bloc placé en biais, comme indiqué sur les schémas suivants.

vue de profil



vue de face



Ajouter à la solution de résolution préalablement préparée et sous agitation 11,23 ml d'une solution de persulfate à 10 % ainsi que 1,8 ml de TEMED. Verser lentement la solution dans l'entonnoir, jusqu'à ce que la solution de résolution dans la cuve dépasse les plaques d'environ 1 cm. Veiller à ce qu'il ne se forme pas de bulles d'air à l'intérieur de la solution lors du coulage. Laisser polymériser 3 heures.

## Préparation des plaques

Une fois polymérisées, les plaques sont sorties et débarrassées de l'excès d'acrylamide par immersion dans de l'eau distillée. Sortir l'espaceur large (haut du gel) et sécher le haut du gel avec du papier filtre. Remettre ensuite les plaques dans la cuve de coulage nettoyée avec, cette fois-ci, le haut du gel en haut de la cuve et charnière à droite.

## Préparation de la solution de concentration

Le gel de concentration permet de concentrer sur une même ligne les protéines du gel d'électrofocalisation, avant que celles-ci soient séparées dans le gel de résolution. Le gel de concentration (stacking gel en anglais) est coulé au-dessus du gel de résolution, après polymérisation de ce dernier. Voir l'ANNEXE 2 : « SOLUTIONS POUR ELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE AVEC BOUDINS » pour les différents constituants du gel et leurs quantités. Filtrer la solution à l'aide d'un entonnoir filtrant cylindrique (porosité : 40 à 100  $\mu\text{m}$ ) et d'une fiole à vide. Laisser reposer une 1/2 heure afin que la mousse disparaisse puis dégazer (2 h).

## Polymérisation des gels de concentration

Ajouter à la solution qui vient d'être préparée 532  $\mu\text{l}$  de TEMED et 3,2 ml d'une solution d'APS à 10 %. Utiliser le même système de coulage que le gel de résolution. Arrêter de couler le gel lorsque le niveau de celui-ci atteint le bas du biseau de la plaque. Déposer alors sur le gel encore liquide du butanol saturé d'eau (mélanger 20 ml de butanol avec 40 ml d'eau. Prélever ensuite la phase supérieure). Laisser polymériser 4 heures.

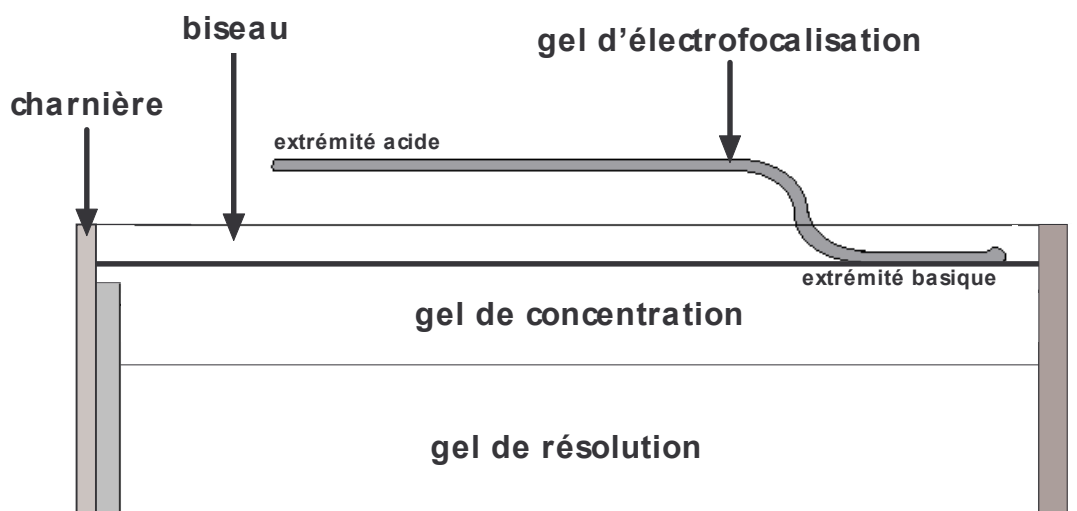
## 6/ Electrophorèse résolutive (2<sup>eme</sup> dimension) : migration selon la masse moléculaire (3<sup>eme</sup> jour)

### Préparation de la cuve de migration

Remplir la cuve avec 30 l d'eau déminéralisée. Dissoudre dans 4 l d'eau déminéralisée tous les constituants du tampon (Voir l'ANNEXE 2 : « SOLUTIONS POUR ELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE AVEC BOUDINS »). Verser ces 4 l dans la cuve puis mettre en route la pompe et le circuit réfrigérant (la température du circuit est réglée à 10 °C, ce qui correspond à environ 15 °C dans la cuve).

## Dépôt des gels d'électrofocalisation (1<sup>ère</sup> dimension) sur les gels de concentration

Avant de commencer le dépôt des gels d'électrofocalisation, préparer 100 ml d'une solution d'agarose à 1 % (agarose à bas point de fusion) avec le tampon de migration comme solvant et la mettre au bain-marie (régler la température du bloc chauffant à 200 °C pour faire fondre rapidement l'agarose, puis maintenir la solution à 40 °C). Décongeler les gels d'électrofocalisation. Démouler les plaques et les nettoyer en les plongeant dans de l'eau déminéralisée. Pour chaque plaque, sécher délicatement avec du papier filtre le haut du gel de concentration (celui-ci est très fragile). A l'aide d'une spatule et d'un peu de tampon de cuve, déposer délicatement et progressivement le gel d'électrofocalisation sur le gel de concentration, au creux du biseau, extrémité acide coté charnière (voir schéma ci-dessous). Eviter la formation de bulles d'air entre le gel d'électrofocalisation et le gel de concentration.



Une fois les gels d'électrofocalisation en place, les recouvrir de la solution d'agarose à 1 % préalablement chauffée à 40 °C au bain-marie. Laisser refroidir l'agarose quelques minutes. Nettoyer les plaques puis les placer dans la cuve : pour cela, mouiller d'abord chaque plaque en l'immergeant dans le tampon puis l'insérer dans le support, haut du gel côté cathode (-) et charnière en bas.

### Conditions de migration

Mettre l'ampérage au maximum. Régler le voltage jusqu'à ce que le courant soit de 0,3 A (environ 60 V) pour la première ½ heure, puis 0,6 A (environ 90 V) pour la deuxième ½ heure. Enfin augmenter le voltage jusqu'à obtenir 110 V maximum ou 0,9 A. Laisser migrer 18 heures et 15 minutes. La migration nécessite donc 19 heures et 15 minutes. Elle est effectuée la nuit.

## 7/ Coloration des gels 2 D (4<sup>eme</sup> jour)

### Préparation des gels 2 D

Après la fin de la deuxième migration, sortir les plaques de la cuve de migration. Ouvrir les plaques à l'envers de telle sorte que le GelBond soit tourné face à soi. Oter les espaceurs latéraux. Enlever l'acrylamide au-dessus du GelBond. Nettoyer sommairement le GelBond avec un peu d'acétone. Placer le gel dans un support métallique.

### Coloration

Voir l'ANNEXE 3 : « COLORATION DES GELS AU NITRATE D'ARGENT » pour la préparation des différents bains. Les bains sont effectués dans des cuves en inox et sont en permanence agités à l'aide de petits barreaux aimantés. Il faut laisser les gels toute la nuit dans le dernier bain afin que les spots protéiques apparaissent.

## 8/ Prélèvement des spots protéiques (4<sup>eme</sup> et 5<sup>eme</sup> jour)

Les spots protéiques sont découpés sur le gel à l'aide d'un scalpel. Ne pas découper au plus près ni au plus loin. Les spots sont ensuite prélevés avec une pince et mis dans des tubes Eppendorf. Ils peuvent être stockés au congélateur avant d'être envoyés pour microséquençage. Il faut une bonne dizaine de morceaux de gels d'acrylamide contenant un spot protéique donné pour pouvoir le microséquencer.

## PREPARATION DES ECHANTILLONS POUR UNE ANALYSE EN SPECTROMETRIE DE MASSE

### DIGESTION EN GEL POUR ANALYSE MALDI PROTOCOLE SIMPLIFIE, SANS REDUCTION / ALKYLATION

D'après Nicolas Sommerer, ENSA-M / INRA, Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes, UMR 5004 Agro-M/CNRS/INRA/UM2, 2 place Viala, 34060 MONTPELLIER cedex 1 France, direct phone: +33 (0)4.99.61.23.58  
secretary phone: +33 (0)4.99.61.26.03, fax: +33 (0)4.67.52.57.37, email :  
sommerer@ensam.inra.fr

#### Remarque préliminaire :

- Utiliser toujours de l'eau ultra pure (eau qualité HPLC) ou eau miliQ du jour
- Travailler avec blouse et gants lavés à l'eau + savon.
- Les solutions de travail sont à préparer le jour même, dans des flacons préalablement passés aux ultrasons pendant plusieurs heures ( eau+ méthanol 50/50 ; eau miliQ). Un flacon sera réservé à chacune des solutions.
- Veiller à ce que les bouchons ne soient pas en contact avec les solutions (pas de goutte de solution sinon lavage).
- Consommable (ependorfs, cones...) à autoclaver.

#### Découpe des spots :

- Scapel propre (lame neuve) ou embout de pipette taillé au bon diamètre (guillotine à cône) : exciser le plus près possible (ne prendre que le centre du spot).
- Faire un blanc avec un bout de gel sans protéine.
- Dans le cas d'une découpe au scalpel, couper en morceaux de 1 à 3 mm<sup>3</sup> si les morceaux sont gros.
- Mettre dans un eppendorf (qualité hdpp ou TREFF) de 1,5 ml. A conserver à – 80°C.

#### Lavage :

- Ajouter 1 ml d'eau milli-Q pour chaque échantillon et vortexer (niveau 3) **15 min** (si contact du cône avec l'éppendorf changer de cône). Eliminer le surnageant et changer de cône pour chaque échantillon. ATTENTION à ne pas aspirer le gel...
- Ajouter 1 ml de tampon carbonate d'ammonium à 25 mM (pour tamponner la solution au pH de la trypsine) et vortexer **30 min**. Eliminer le surnageant.
- Ajouter 1 ml de tampon carbonate / acétonitrile 50/50 (élimination de l'acrylamide non polymérisé et décoloration des spots) et vortexer **30 min** et éliminer le surnageant.

- Répéter l'étape précédente.
- Ajouter 1 ml d'acétonitrile pur (contraction du gel) et vortexer **15 min**. Eliminer le surnageant.
- Sécher au speedvac (l'appareil doit être propre) quelques minutes pour éliminer toute trace d'acétonitrile.
- Transvaser le gel sec dans un eppendorf de 500 µl ou 1,5 ml (suivant la taille du spot). Cette étape doit être réalisée avec précaution au-dessus d'une feuille de papier aluminium (réservé bidi). Changer de feuille dans le cas d'un contact entre feuille et spot.
- Le gel peut se conserver au congélateur (-20°C).

### **Digestion en gel :**

- Pénétration de la trypsine dans le gel à T° ambiante (la trypsine coupe les résidus basiques Lysine ou Arginine). : Réhydrater (recouvrir) le gel avec le minimum (10 µl) de tampon de digestion composé de tampon carbonate  $\text{NH}_4^+\text{HCO}_3^-$  à 25 mM et de trypsine à une concentration finale comprise entre 0,025µg/µl à 0,05µg/µl . (Au total 0,25 à 0,5 µg de trypsine selon abondance et masse moléculaire de la protéine, mais ne pas dépasser 1 µg de trypsine.)  
(A Montpellier la trypsine est utilisée à la concentration de **0,0125µg/µl** soit au total **0.125µg**).  
Cependant, selon la taille et l'intensité du spot, il peut-être indispensable de doubler voir quadrupler sa quantité sinon les pics de trypsine n'apparaissent plus et la calibration est impossible.
- Attendre **30 min** que le gel gonfle et rajouter éventuellement du tampon carbonate sans enzyme de façon à ce que le gel soit mouillé en permanence.
- Digestion : 37°C pendant toute la nuit ( en général début digestion vers 17h00/18h00 et fin de digestion vers 9h00/10h00).

## Extraction des peptides :

### A Montpellier Maldi-TOF :

- Recouvrir le gel par 20  $\mu\text{l}$  de tampon carbonate  $\text{NH}_4^+\text{HCO}_3^-$  à 25 mM, soniquer 15 min, prélever le surnageant et le mettre dans un autre tube eppendorf de 500 $\mu\text{l}$
- Ajouter 100 $\mu\text{l}$  d'une solution de 0.1% TFA dans 60% acétonitrile dans les tubes où il y a les gels, soniquer 15 min, prélever le surnageant et le mettre dans le tube de 500  $\mu\text{l}$  précédent.
- Répéter l'étape précédente.
- Une fois qu'on a regroupé tous les surnageants on se retrouve avec un volume d'environ 220  $\mu\text{l}$ .
- Concentrer au speedvac, de préférence sans amener à sec (5 à 10  $\mu\text{l}$  de volume final).

### Au Moulon : MS/MS (d'après Luc Négroni, Le Moulon)

Incubation sous agitation forte lors des différentes étapes de l'extraction (sonication possible)

1- Rajouter 20  $\mu\text{l}$  de 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  ( ou 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  ) 15 min.

2- Récupérer l'extrait

3 30  $\mu\text{l}$  acide Acide Formique 5%,Acétonitrile 50% 15 min.

4- Récupérer l'extrait

5- 30  $\mu\text{l}$  acide Acide Formique 5%,Acétonitrile 50% 15 min.

6- Récupérer l'extrait

7- Pooler les extraits et sécher au speed vac.

A partir de cette étape, les échantillons sont envoyés à la plate forme protéomique pour l'analyse MALDI-TOF ou ESI-MS/MS.

## **PREPARATION DES DIFFERENTES SOLUTIONS**

◆ **Tampon Carbonate d'Ammonium 25mM** (Masse Molaire : 79g/mol)  
Peser 198mg pour 100ml d'eau ultra pure (attention odeur désagréable, mettre un masque)

◆ **Tampon carbonate / Acétonitrile 50/50 ( 12.5mM Carbonate final )**  
Pour 25 ech., soit  $V_f=60\text{ml}$  (car deux lavages) : 30ml Tp carbonate +30ml Acétonitrile

◆ **Tampon de digestion ( dans tp carbonate 25mM + 0.0125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  trypsine<sup>o</sup>) : ne pas vortexer !!**

Trypsine conditionnée par 20 $\mu\text{g}$ . Diluer dans 200 $\mu\text{l}$  de tp carbonate 25mM (refroidi au préalable dans la glace). Concentration de la trypsine est de 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

Aliquoter en 25  $\mu\text{l}$  dans des tubes eppendorfs (8 tubes) . on utilise un tube pour 20 spots

Conserver les tubes à  $-20^\circ\text{C}$ . Ne pas réutiliser un tube décongelé

Pour 20 spots, prendre un tube de trypsine aliquotée et rajouter 175  $\mu\text{l}$  de tampon

Carbonate 25 mM.( 0.0125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de trypsine)

Déposer 10 $\mu\text{l}$  de cette solution sur chaque spots ( 0.125 $\mu\text{g}$  de trypsine pour chaque Spot).

◆ **Tampon 0.1% TFA dans 60% acétonitrile**

Ex : pour 6 ml : prélever 3.6 ml d'acétonitrile + 2.4 ml eau ultra pure.Rajouter 6 $\mu\text{l}$  de TFA pur

◆ **Tampon 5% Acide Formique dans 50 % acétonitrile**

Ex : pour 5 ml : prélever 2.5 ml d'acétonitrile + 250  $\mu\text{l}$  Acide formique + 2.25 ml eau ultra pure

## **LISTE DES SOLVANTS, PRODUIT ET REACTIFS**

- ◆ Eau milli-Q ( très pure : attention aux cartouches de purification ) ou qualité HPLC
  
- ◆ Bicarbonate d'ammonium  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (79g/mol , > 99%) Référence : Sigma A 6141
  
- ◆ Trypsine ( sequencing grade, modified ) Référence : Promega V5111 ( 5 x 20 $\mu\text{g}$  )
  
- ◆ Acétonitrile qualité HPLC ou séquençage Référence : Aldrich 27-071-7 ( bouteille de 1 litre)
  
- ◆ T.F.A. qualité ou HPLC ou séquençage ( stocker sous atmosphère inerte, dans le noir) Référence : Fluka 91707 (capsules 10x 1 ml )
  
- ◆ Acide Formique Référence Sigma F0507

ANNEXE 1 :

**EXTRACTION DES PROTEINES TOTALES DE *PINUS PINASTER***

Avant toute chose, vérifier la présence d'AZOTE LIQUIDE et mettre en marche la centrifugeuse afin qu'elle atteigne la température de  $-4^{\circ}\text{C}$  à  $-20^{\circ}\text{C}$

- 1) Prélèvement du tissu (stockage à  $-80^{\circ}\text{C}$ )
- 2) Pesée des tubes « oakridge » pour l'extraction (sans les bouchons)
- 3) Broyage du matériel végétal dans de l'azote liquide (à l'aide d'un mortier et d'un pilon) : 500 à 700 mg pesé le jour même.
- 4) Ajout au broyat de 10 ml (8+2) de la solution de précipitation (stockée à  $-20^{\circ}\text{C}$ )
- 5) Laisser reposer 1 heure à  $-20^{\circ}\text{C}$
- 6) Centrifuger 15 mn à  $-20^{\circ}\text{C}$  et à 16000 g (12084 t/min)
- 7) Eliminer le surnageant
- 8) Lavage des culots par 10 ml de la solution de rinçage (stockée à  $-20^{\circ}\text{C}$ )  
Décolé gentiment le culot.
- 9) Laisser reposer 1 heure à  $-20^{\circ}\text{C}$  puis centrifuger 10 min à 16000 g.
- 10) Eliminer le surnageant.
- 11) Sécher au dessiccateur pendant 2 à 3 heures.
- 12) Peser les tubes avec les culots (sans bouchon).
- 13) Réduire en poudre les culots (à l'aide d'une baguette de verre).
- 14) Reprendre la poudre dans un volume de tampon de resolubilisation :
- 15 ou **30  $\mu\text{l}$  de tampon /mg de poudre.**

15) Centrifuger les tubes à 400 g (environ 2000 t/min) pendant 2 min à 20°C. Prélever le surnageant et le remettre dans un tube de type Eppendorf (regrouper les surnageants du même échantillon dans un seul tube, si plusieurs répétitions ont été réalisées). Centrifuger de nouveau les tubes à 400 g (environ 2000 t/min) pendant 2 min à 20°C.

16) Récupérer les surnageants et stocker à -80°C.

17) Juste avant le dosage (Bradford modifié), décongeler les échantillons, mélanger doucement et centrifuger les tubes à 400 g (environ 2000 t/min) pendant 2 min à 20°C. S'il n'y a pas de dépôt OK, sinon récupérer le surnageant et le mettre dans un nouveau tube et recentrifuger de nouveau.

<b><u>Solution de précipitation</u></b>	10 échantillons	20 échantillons		
T.C.A.	10 g	20 g	→	10 %
β mercaptoéthanol	70 µl	140 µl	→	0,07 %
Acétone	qsp 100 ml	200 ml		

<b><u>Solution de rinçage</u></b>	10 échantillons	20 échantillons		
β mercaptoéthanol	70 µl	140 µl	→	0,07 %
Acétone	qsp 100 ml	200 ml		

Deux solutions de resolubilisation sont possibles. Nous avons utilisé le tampon UKS pour dissoudre les protéines d'aiguille et utilisons maintenant le tampon dit « TCT » en interne pour solubiliser les protéines de xylème.

**Solution de resolubilisation ( U.K.S. )**

Urée	22,8 g	34,2 g	45,6 g	→	9,5 M
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ( 2,8 % solution stock)	1 ml	1,5 ml	2 ml	→	5 mM
SDS ( 10 % solution stock)	5 ml	7,5 ml	10 ml	→	1,25 %
DTT	200 mg	300 mg	400 mg	→	0,5 %
Triton X-100 (20 % solution stock)	12 ml	18 ml	24 ml	→	6 %
Ampholytes pH 3-10	2 ml	3 ml	4 ml	→	2 %
Eau distillée	qsp 40 ml	qsp 60 ml	qsp 80 ml		

Nouvelle solution de resolubilisation (T.C.T)

Urée	21 g	↔	7 M
Triton X 100 (20% solution stock)	1 ml	↔	0,4 %
Chaps	2 g	↔	4 %
Thiourée	7,61 g	↔	2 M
DTT	77,12 mg	↔	10 mM
IPG Buffer	0,5 ml	↔	1 %
Eau milliQ	qsp 50 ml		

**Attention** : pour dissoudre l'urée du tampon U.K.S. , il faut laisser le mélange 3 heures dans la cuve à ultrasons, à la fois lors de la préparation du tampon et lors des décongélations des solutions stockées. La température du bain ne doit pas dépasser 28°C.

Pour dissoudre l'urée du tampon T.C.T., nous laissons la solution se dissoudre sous agitation avec un barreau aimanté dans un bécher.

**Remarque** : le tampon U.K.S. ou T.C.T. doit être stocké à -20 °C

## ANNEXE 1 BIS :

### DOSAGE DES PROTEINES PAR LA METHODE BRADFORD

La concentration des protéines de chaque échantillon est déterminée par la méthode de Bradford modifiée selon ( S.Ramagli et al Electrophoresis 1985,6,559-563 : Quantification of microgram amounts of protein in two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis sample buffer). Cette méthode est basée sur le changement de couleur du Bleu de Coomassie en fonction de la concentration en protéines de l'échantillon. La densité optique de chaque échantillon sera observée en mesurant l'absorbance à 595 nm. Chaque échantillon est répété 6 fois pour une meilleure estimation de la DO.

Penser à allumer le spectrophotomètre avant utilisation.

#### 1. Préparation de la gamme de concentration de la protéine standard :

- ❖ Diluer le « Dye reagent concentrate » : 1 volume de Dye avec 3 volumes d'eau miliQ. Filtrer la solution sur du papier Watman n°1.
- ❖ Préparer une solution d'ovalbumine standard à 5 mg/ml soit 5 µg/ µl. Pour cela, peser 10 mg d'ovalbumine et ajouter 2 ml de tampon de resolubilisation ( T.C.T.).
- ❖ Préparation de la gamme étalon :

<b>Quantité de protéines (µg)</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>20</b>	<b>30</b>	<b>40</b>	<b>50</b>
Solution ovalbumine (µl)	-	1	2	4	6	8	10
Tampon T.C.T ( µl )	10	9	8	6	4	2	-
HCL 0.1 N (µl )	10	10	10	10	10	10	10
H2O ( µl )	80	80	80	80	80	80	80
Dye reagent dilué ( ml )	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5

Ne pas oublier de bien mélanger après avoir ajouter le dye. Attendre 5 min avant le dosage

## 2. Préparation des échantillons :

Volume échantillon à prélever ( $\mu\text{l}$ )	10
HCL 0.1 N ( $\mu\text{l}$ )	10
H <sub>2</sub> O ( $\mu\text{l}$ )	80
Dye reagent dilué ( ml )	3.5

Ne pas oublier de bien mélanger après avoir ajouter le dye. Attendre 5 min avant le dosage. Nous effectuons 6 répétitions de chaque échantillon.

## 3. Dosage :

Mesurer l'absorbance à 595 nm contre le blanc, de la gamme étalon et des échantillons (ne pas oublier de bien mélanger les cuves avant de les doser). La courbe étalon correspond à la régression linéaire de la DO en fonction de la quantité de protéine de la gamme ( $DO_{595\text{nm}} = f(\text{quantité de protéines})$ ). L'équation de la droite de régression est obtenue par le logiciel Excel. La quantité de protéine de chaque échantillon peut alors être estimée à partir de cette équation. La concentration correspondante est obtenue en divisant par 10 (volume prélevé pour le dosage).

ANNEXE 2 :

SOLUTIONS POUR ELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE AVEC BOUDINS

**GEL D'ELECTROFOCALISATION (1<sup>ère</sup> dimension)**

	EBD analytique	EBD préparative	
urée	11,07 g	27,675 g	→ 9,2 M
Triton X 100 (20 % solution stock)	2 ml	5 ml	→ 2 %
acrylamide 17,5/1(30 % solution stock)	2,7 ml	6.75 ml	→ 4 %
ampholytes :			1 %
* pharmalyte pH 5-8	1500 µl	3750 µl	
* pharmalyte pH 5-6	500 µl	1250 µl	
eau distillée	qsp 20 ml	qsp 50 ml	

**TAMPONS D'ELECTRODE (1<sup>ère</sup> dimension)**

* Anode (+)			
acide phosphorique	21 ml	→	50 mM
eau distillée	6 l		
* Cathode (-)			
soude	3,4 g	→	50 mM
eau distillée	1,7 l		

**TAMPON D'EQUILIBRATION pour EDB préparative**

TRIS	7,57 g	→	62,5 mM
SDS	23 g	→	2,3 %
Saccharose	100 g	→	10 %
eau distillée	qsp 1 l		

**GEL DE RESOLUTION (2<sup>ème</sup> dimension)**

	EBD analytique	EBD préparative	
<i>ou</i> acrylamide (30 % solution stock)	916 ml	989,3 ml	→ 11 %
acrylamide (40 % solution stock)	687 ml	742,5 ml	→ 11 %
TRIS HCl pH 8,8 (2 M solution stock)	625 ml	675 ml	→ 0,5 M
SDS (10 % solution stock)	37,5 ml	40,5 ml	→ 0,15 M
saccharose	25 g	27 g	→ 1%
eau distillée	qsp 2500 ml	qsp 2700 ml	

**GEL DE CONCENTRATION (800 ml) pour EDB préparative**

acrylamide 36,5/1 (30 % solution stock)	126,67 ml	→	4,75 %
SDS (0,4 % solution stock)	200 ml	→	0,1 %
Tris HCl pH 6,8 (0,5 M solution stock)	200 ml	→	0,125 M
eau distillée	273,33 ml		

**TAMPON D'ELECTRODE (2<sup>ieme</sup> dimension)**

Tris	102,3 g	→	25 mM
glycine	510 g	→	0,2 M
SDS	34 g	→	0,1 M
eau distillée	qsp 34 l		

**SOLUTION MERE D'ACRYLAMIDE A 30 % : ELECTROFOCALISATION (17,5:1) 1 D**

acrylamide	5,676 g	→	28,38 %
bis acrylamide	324 mg	→	1,62 %
eau distillée	qsp 20 ml		

**SOLUTION MERE D'ACRYLAMIDE A 30 % : RESOLUTION (36,5:1) 2 D**

acrylamide	584 g	→	29,2 %
bis acrylamide	16 g	→	0,8 %
eau distillée	qsp 2 l		

## ANNEXE 2BIS:

### SOLUTIONS POUR ELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE AVEC STRIPS

#### SOLUTION DE REHYDRATATION DES STRIPS

Nous utilisons la solution de resolubilisation TCT auquel nous rajoutons quelques grains de bleu de bromophénol. Cette solution sera aliquotée dans des tubes de 2 ml et stockée à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### TAMPON D'EQUILIBRATION pour strips

Tris-HCl 1,5M, pH8,8	16,75 ml	→	50 mM
Filtré 0,4 $\mu$			
Urée	180,17 g	→	6 M
Glycérol (87% stock)	172,5 ml	→	30 %
SDS	10 g	→	2 %
Bleu de Bromophénol	qq grains	→	trace
Eau milliQ	qsp 500 ml		

Le DTT (100 mg/10 ml) ou l'iodoacétamide (250 mg/10 ml) sont ajoutés extemporanément.

#### GEL DE RESOLUTION (2<sup>ieme</sup> dimension)

	EBD analytique	EBD préparative	
<i>ou</i> acrylamide (30 % solution stock)	916 ml	989,3 ml	→ 11 %
acrylamide (40 % solution stock)	687 ml	742,5 ml	→ 11 %
TRIS HCl pH 8,8 (2 M solution stock)	625 ml	675 ml	→ 0,5 M
SDS (10 % solution stock)	37,5 ml	40,5 ml	→ 0,15 M
saccharose	25 g	27 g	→ 1%
eau distillée	qsp 2500 ml	qsp 2700 ml	

**TAMPON D'ELECTRODE (2<sup>ieme</sup> dimension)**

Tris	102,3 g	→	25 mM
glycine	510 g	→	0,2 M
SDS	34 g	→	0,1 M
eau distillée	qsp 34 l		

**Préparation de L'Agarose Low Melting 1 %**

Agarose Low Melting (Interchim ref 0815)	1 g
SDS (10 % Stock)	2 ml
1,2 M Bis-Tris (Sigma ref B9754), 0,8 M HCl	12,5 ml
Eau milliQ	qsp 100 ml

ANNEXE 3 :

COLORATION DES GELS AU NITRATE D' ARGENT

**Bains de fixation et de coloration pour l'électrophorèse classique**

La veille de la coloration, mettre 4 jerricans d'eau déminéralisée en chambre froide. Cette eau à 4°C est nécessaire pour les 4 bains de révélation. Le matin, préparer 4 l de solution de carbonate de potassium (1,44 kg de carbonate de potassium qsp 4 l) et mettre cette solution au frigo. 1 l de cette solution sera ajouté à chacun des 4 bains de révélation.

**1 BAIN ETHANOL-ACIDE ACETIQUE (1 h)**

éthanol	3,6 l	→	40 %
acide acétique	900 ml	→	10 %
eau déminéralisée	qsp 9 l		

**1 BAIN ETHANOL-ACIDE ACETIQUE (2 h)**

éthanol	4 l	→	40 %
acide acétique	1 l	→	10 %
eau déminéralisée	qsp 10 l		

**2 BAINS ETHANOL A 10 % (10 min chacun)**

éthanol	900 ml	→	10 %
eau déminéralisée	qsp 9 l		

**2 BAINS CARBONATE DE Na (15 min chacun)**

carbonate de Na	27 g	→	0,3 %
eau déminéralisée	9 l		

**1 BAIN CARBONATE DE Na (5 min)**

carbonate de Na	4,5 g	→ 0,05 %
eau déminéralisée	9 l	

**1 BAIN (1 min 30 sec)**

ferricyanure de K	13,5 g	→ 0,15 %
thiosulfate de Na	27 g	→ 0,3 %
carbonate de Na	4,5 g	→ 0,05 %
eau déminéralisée	9 l	

**8 BAINS D'EAU DEMINERALISEE**

6 de 5 min  
2 de 10 min

**1 BAIN NITRATE Ag (15 min)**

nitrate Ag (20 %)	45 ml	→ 0,1 %
eau déminéralisée	9 l	

**1 BAIN (5 min) A 4°C**

carbonate de K	360 g	→ 4 %
thiosulfate de Na (100 mM) ( à ajouter juste avant utilisation )	2,7 ml	→ 30 µM
eau déminéralisée	9 l	

**3 BAINS (changer à 2 min 30 sec, 7-8 min et 10 -12 min) A 4°C**

carbonate de K	360 g	→ 4 %
formaldéhyde ( à ajouter juste avant utilisation )	4,86 ml	→ 0,054 %
thiosulfate de Na (100 mM) ( à ajouter juste avant utilisation )	2,7 ml	→ 30 µM
eau déminéralisée	9 l	

**1 BAIN ACIDE ACETIQUE A 5% (10 min)**

acide acétique

450 ml

→

5 %

eau déminéralisée

8550 ml

**5 BAINS D'EAU DEMINERALISEE**

1 bain de 10 minutes

4 bains de 5 minutes

**1 BAIN DE GLYCEROL**

glycérol

360 ml

eau déminéralisée

9 l

**Bains de fixation et de coloration pour l'électrophorèse préparative**

Le méthanol étant un produit très toxique, il est nécessaire d'effectuer les 3 bains sous la hotte aspirante.

**2 BAINS METHANOL-ACIDE ACETIQUE (30 min chacun)**

méthanol	4,5 l	→	50 %
acide acétique	0,9 l	→	10 %
eau déminéralisée	3,6 l	→	40 %

**1 BAIN METHANOL-ACIDE ACETIQUE-NAPHTOL BLUE BLACK (toute la nuit)**

méthanol	4,05 l	→	45 %
acide acétique	0,9 l	→	10 %
eau déminéralisée	4,05 l	→	45 %
naphтол blue black (ref ALDRICH 19, 524-3)	0,27 g	→	0,003 %

**4 BAINS D'EAU DEMINERALISEE**

4 bains de 10 minutes

## ANNEXE 4 :

### COLORATION DES GELS AU BLEU COLLOÏDAL

La coloration s'effectue dans des boîtes en polystyrène ( série A4/40 de chez PolyLabo) transparentes avec deux gels par boîte et sous agitation. Le volume de solution pour chaque boîte est de 400 ml .

#### FIXATION ( 2 heures )

Acide phosphorique ( 85% solution stock )	47 ml	94 ml	( 2 %)
Ethanol ( 95% solution stock)	1052 l	2104 l	( 50 %)
H <sub>2</sub> O	qsp 2 l	qsp 4 l	

#### LAVAGE ( 3 fois 30 mn )

H<sub>2</sub>O

#### INCUBATION ( 1 heure )

Méthanol ( 100 % solution stock )	680 ml	1360 ml	→ 34 %
Sulfate d'ammonium	340 g	680 g	→ 17 %
Acide phosphorique ( 85% solution stock)	47 ml	94 ml	→ 2 %
H <sub>2</sub> O	qsp 2 l	qsp 4 l	

Remarque : Pour une solution de 2 litres :

Préparer le mélange méthanol ( 680 ml ) / H<sub>2</sub>O ( 500 ml )

Préparer la solution de sulfate d'ammonium 340 g / H<sub>2</sub>O ( 700 ml ) pour une bonne solubilisation

Verser la solution de sulfate d'ammonium dans le mélange méthanol / H<sub>2</sub>O sous agitation forte

Ajouter l'acide

#### COLORATION ( 5 jours )

Préparer la même solution que pour l'incubation

Ajouter 0.05 % de bleu colloïdal BG 250 1 g / 2 l

Remarque : Dissoudre le bleu dans la solution méthanol / H<sub>2</sub>O ( 1 heure au moins )

#### CONSERVATION

5 % acide acétique

**LISTE DES PRODUITS CHIMIQUES UTILIS2ES EN ELECTROPHORESE  
BIDIMENSIONNELLE**

	Produit	Référence
<b>Extraction</b>	TCA	Prolabo RP Normapur 20.742.293
	2-mercaptoéthanol	Sigma M6250
	Acétone	Prolabo Rectapur 20.065.362
	SDS	Serva 20760 ou Prolabo Rectapur 27.926.295
	DTT	Interchim UP284250
	Triton X100	Sigma T8787
	Tris	Euromedex 26-128-3094B
	Chaps	Sigma C5849
	Thiourée	Sigma T7875
	Urée	Euromedex EU0014B
	IPG Buffer pH4-7	Amersham 17-6000-86
	Ampholytes pH3-10	Amersham 17-0456-01
	Albumin Chicken egg	Sigma A 5503
	Dye Reagent concentrate	BioRad 500-0006
<b>Focalisation</b>	Urée	Euromedex EU0014B
	Tris	Euromedex 26-128-3094B
	SDS	Serva 20760 ou Prolabo Rectapur 27.926.295
	Chaps	Sigma C5849
	Saccharose	Merck 7687
	APS	Euromedex EU0009A
	Temed	Promega H3161
	Triton X100	Sigma T8787
	Acrylamide	BioRad 161-0101
	Bis-Acrylamide	BioRad 161-0201
	Ampholytes 5-8	Amersham 17 0453 01
	Ampholytes 5-6	Amersham 17 0564 01
	Acide phosphorique	Merck 573
	Soude	Merck 6498
	Immobiline dry strip 24cm 4-7	Amersham 17 6002 46
	Dry strip coverfluid	Amersham 17 1335 01
	IPGphor Strip holder cleaning solution	Amersham 80 6452 78
	IEF sample application pieces	Amersham 80 1129 46
Bleu de Bromophénol	Sigma B5525	
Glycérol	Amersham 17 1325 01	
<b>2D</b>	Acrylamide-Bis acrylamide	Interchim UP864930
	Tris	Euromedex 26-128-3094B
	SDS	Serva 20760 ou Prolabo Rectapur 27.926.295
	Saccharose	Merck 7687
	APS	Euromedex EU0009A
	Temed	Promega H3161
	Agarose Low melting	Interchim 0815
	Bis Tris	Sigma B9754
	Glycine	Merck 4169
	GelBond	TEBU 54731
	Acide Chlorhydrique	Prolabo RP Normapur 20 252 290
	Butanol-2	Prolabo pour analyses 20 812 295

<p><b>Coloration</b></p>	<p>Carbonate de sodium                  Carbonate de potassium                  Ferricyanure de potassium                  Thiosulfate de sodium                  Nitrate d'argent                  Glycérol                  Formaldéhyde                  Sulfate d'ammonium                  Coomassie brillant blue G 250                  Sypro Ruby                  Ethanol                  Méthanol                  Acide acétique                  Acide acétique glacial                  Acide phosphorique</p>	<p>Prolabo 27 771 290                  Prolabo 26 726 322                  Merck 4973                  Sigma S8503                  Clal                  Prolabo rectapur 24 387 463                  Merck 4003                  Sigma A 5132                  BioRad 161 0406                  BioRad 170-3125                  Prolabo Rectapur 20 824 467                  Prolabo Normapur 20 847 411                  Prolabo Rectapur 20 103 444                  Sigma A6283                  Merck 573</p>
--------------------------	--	--