

 LYCEE SAINT-PAUL IV	PROCEDURE	Pr Bioch Ma 009
		Version : 1
	Mini-PROTEAN Tetra Cell	Date de 1 ^{ère} mise en application
		Version de travail : 06/11/12
		Mise à jour AQ le 02/09/2014
		Page : 1/4

1. CHAMPS D'APPLICATION

Le mini-PROTEAN Tetra cell permet de couler des gels d'électrophorèse ainsi que de réaliser la migration électrophorétique pour séparer des protéines.

Le mini-PROTEAN Tetra cell permet de faire migrer 1 à 4 gels simultanément.

2. COULAGE D'UN GEL D'ELECTROPHORESE

2.1 PREPARATION DE LA CASSETTE DE GEL

2.1.1 MATERIEL NECESSAIRE

- Une plaque d'espacement (plaque transparente de grande taille). Les plaques disponibles au lycée sont des plaques d'espacement de 1 mm, donnant ainsi des gels de 1 mm d'épaisseur.
- Une plaque courte (plaque transparente moins haute que la plaque d'espacement).
- Deux pinces.
- Un portoir
- Joins étanches

2.1.2 ASSEMBLAGE DE LA CASSETTE

- Placer les deux pinces sur une surface plane avec le mécanisme de serrage en position ouverte.
- S'assurer que la plaque d'espacement et la plaque courte soient propres.
- Orienter la plaque d'espacement de manière à ce que l'écriture soit positionnée en haut.
- Positionner la plaque courte à l'extrémité basse de la plaque d'espacement (**figure 1 a**).
- Glisser les deux plaques dans les pinces en plaçant la plaque courte du côté du mécanisme de serrage (**figure 1 b**).
- S'assurer que les deux plaques sont correctement alignées.
- Serrer le mécanisme de serrage des pinces afin de maintenir les plaques (**figure 1 c**).Vérifier que l'extrémité basse des plaques soit alignée sur une surface plate. L'ensemble plaques-armatures est appelé **cassette**.
- Placer des joins étanches sur le socle du portoir.
- Placer la cassette sur les joins du portoir en orientant les mécanismes de serrage des pinces vers l'extérieur du portoir.
- Maintenir la cassette sur le portoir avec le levier à ressort (**figure 1 d**).

Rédigé par : Mme. GERBELOT Date : 01/09/2012	Vérifié par : M.GENSSE Date : 05/11/12	Approuvé par : P.LAMAUVE Date : 01/09/2014
---	---	---

 LYCEE SAINT-PAUL IV	PROCEDURE		Pr Bioch Ma 009
	Mini-PROTEAN Tetra Cell		Version : 1
			Date de 1 ^{ère} mise en application
			Version de travail : 06/11/12
			Mise à jour AQ le 02/09/2014
			Page : 2/4

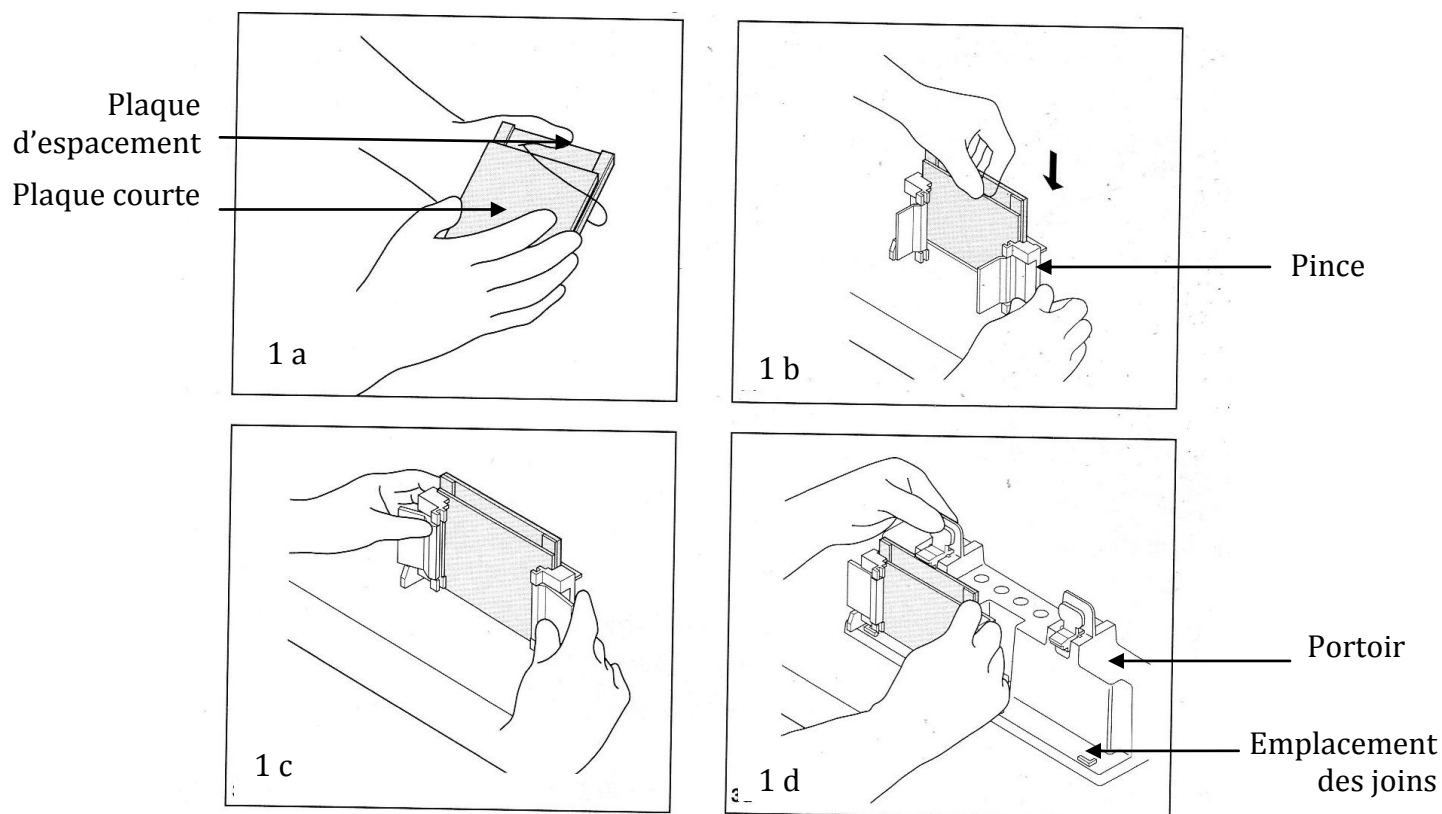


Figure 1 : Préparation de la cassette

Rédigé par : Mme. GERBELOT Date : 01/09/2012	Vérifié par : M.GENSSE Date : 05/11/12	Approuvé par : P.LAMAUVE Date : 01/09/2014
---	---	---

 LYCEE SAINT-PAUL IV	PROCEDURE	Pr Bioch Ma 009
		Version : 1
	Mini-PROTEAN Tetra Cell	Date de 1 ^{ère} mise en application
		Version de travail : 06/11/12
		Mise à jour AQ le 02/09/2014
		Page : 3/4

2.2 COULAGE DU GEL

2.2.1 CAS D'UN GEL DISCONTINU DE POLYACRYLAMIDE

Un gel discontinu est formé d'un gel de concentration et d'un gel de séparation. Sa préparation ce fait selon le protocole suivant :

Préparation du gel de séparation :

- Placer un peigne sur le haut de la cassette. Tracer un repère à 1 cm en dessous du niveau des dents du peigne. Ce repère correspond au niveau jusqu'auquel le gel de séparation doit être versé. Retirer le peigne.
- Préparer le gel de séparation en mélangeant tous les réactifs sauf le TEMED et le persulfate d'ammonium (APS).
- Ajouter l'APS et le TEMED au moment de couler le gel. Verser la préparation de gel de séparation dans la cassette jusqu'au repère à l'aide d'une pipette. Attention à verser la préparation de gel doucement afin d'éviter l'introduction d'air.
- Verser doucement et uniformément de l'eau sur le gel de manière à le recouvrir.
- Laisser le gel se polymériser 30 minutes. Rincer la surface du gel avec de l'eau distillée.

Préparation du gel de concentration :

- Préparer le gel de concentration. Mélanger tous les réactifs à l'exception de l'APS et du TEMED.
- Sécher la surface du gel de séparation avec un papier filtre avant de couler le gel de concentration.
- Ajouter l'APS et le TEMED à la préparation avant de couler le gel. Verser la préparation de gel de concentration entre les deux plaques jusqu'en haut de la plaque courte.
- Insérer le peigne dans la cassette en alignant la crête du peigne avec le haut de la plaque courte. Les dents du peigne doivent être incluses dans le gel.
- Laisse le gel se polymériser pendant 30 minutes.
- Retirer doucement le peigne.

Rincer les armatures et le portoir à l'eau distillée après utilisation.

2.2.2 CAS D'UN GEL CONTINU DE POLYACRYLAMIDE

Un gel discontinu est formé d'un gel de séparation. Il se prépare selon le protocole ci-dessous :

- Préparer le gel en mélangeant tous les réactifs à l'exception de l'APS et du TEMED.
- Ajouter l'APS et le TEMED à la préparation avant de couler le gel. Verser la préparation de gel entre les deux plaques jusqu'en haut de la plaque courte.
- Insérer le peigne dans la cassette en alignant la crête du peigne avec le haut de la plaque courte. Les dents du peigne doivent être incluses dans le gel.
- Laisse le gel se polymériser pendant 45 minutes.
- Retirer doucement le peigne..

Rincer les armatures et le portoir à l'eau distillée après utilisation.

Rédigé par : Mme. GERBELOT Date : 01/09/2012	Vérifié par : M.GENSSE Date : 05/11/12	Approuvé par : P.LAMAUVE Date : 01/09/2014
---	---	---

 LYCEE SAINT-PAUL IV	PROCEDURE	Pr Bioch Ma 009
		Version : 1
	Mini-PROTEAN Tetra Cell	Date de 1 ^{ère} mise en application
		Version de travail : 06/11/12
		Mise à jour AQ le 02/09/2014
		Page : 4/4

3. MIGRATION ELECTROPHORETIQUE

3.1 MATERIEL NECESSAIRE:

- Cuve d'électrophorèse
- Le module d'assemblage à électrodes (module avec sites de branchement pour électrodes).
- Le module d'assemblage secondaire (module sans sites de branchements pour électrodes). **A utiliser seulement si trois ou quatre gels sont à faire migrer.**
- Le gel préparé ou prêt à l'emploi
- Le « Buffer Dam » (plaque de barrage du tampon). **A utiliser seulement si le nombre de gels à faire migrer est impair.**
- Générateur (**PowerPacTM Basic power supply**)

3.2 REMPLISSAGE DES PUIITS:

Le remplissage des puits doit se faire en dehors de la cuve d'électrophorèse.

- Le module d'assemblage contenant les gels doit être posé sur une surface plane.
- Laver les puits au tampon de migration. Retirer le liquide de lavage avec du papier filtre.
- Remplir doucement les puits avec les échantillons directement à la pipette automatique ou grâce aux guides de chargement.
- Si des guides de chargement sont utilisés, placer le guide entre les deux gels sur le module d'assemblage. Insérer la pointe de la pipette automatique chargée de l'échantillon dans les fentes du guide et remplir doucement les puits correspondants.

Pour un gel coulé avec un peigne de 10 dents et une plaque d'espacement de 1 mm (matériel disponible au lycée), le volume maximal d'échantillon par puits est de 44 µL.

3.3 ASSEMBLAGE:

- **Pour la migration d'un ou deux gels : mettre le gel ou les deux gels sur le module d'assemblage à électrodes.**
- **Pour la migration de trois ou quatre gels : mettre deux gels sur le module d'assemblage à électrodes et le troisième gel (et éventuellement le quatrième gel) sur le module d'assemblage secondaire.**

Protocole pour positionner les gels sur le module :

-Placer le module d'assemblage sur une surface plane en position ouverte (**figure 2 a**)

- Placer la première cassette (plaques + gel) au bas du module d'assemblage. La plaque courte de la cassette doit être positionnée vers l'intérieur du module d'assemblage. Maintenir la cassette à un angle de 30°.

Rédigé par : Mme. GERBELOT Date : 01/09/2012	Vérifié par : M.GENSSE Date : 05/11/12	Approuvé par : P.LAMAUVE Date : 01/09/2014
---	---	---

 LYCEE SAINT-PAUL IV	PROCEDURE	Pr Bioch Ma 009
		Version : 1
	Mini-PROTEAN Tetra Cell	Date de 1 ^{ère} mise en application
		Version de travail : 06/11/12
		Mise à jour AQ le 02/09/2014
		Page : 5/4

-Placer la seconde cassette (ou le « Buffer Dam » si le nombre de gels est impair) de l'autre côté du module d'assemblage. La plaque courte de la cassette est positionnée vers l'intérieur du module d'assemblage. Maintenir la cassette à un angle de 30° (**figure 2 b**).

-D'une main, pousser doucement chacune des deux cassettes l'une face à l'autre. S'assurer que les cassettes restent plaquées contre les joints verts se trouvant verticalement sur le module d'assemblage.

-D'une main, maintenir les cassettes contre les joints verts. De l'autre main, fermer les armatures vertes du module d'assemblage sur les cassettes. (**figure 2 c**).

-S'assurer que les plaques courtes soient situées en dessous de l'entaille située en haut des joints verts du module d'assemblage.

- Remplir les puits avec les échantillons (voir paragraphe suivant 4.3). (**figure 2 d**).

Pour un gel coulé avec un peigne de 10 dents et une plaque d'espacement de 1 mm (matériel disponible au lycée), le volume maximal d'échantillon par puits est de 44 µL.

-Placer le module d'assemblage dans la cuve de migration (**figure 4 e**).

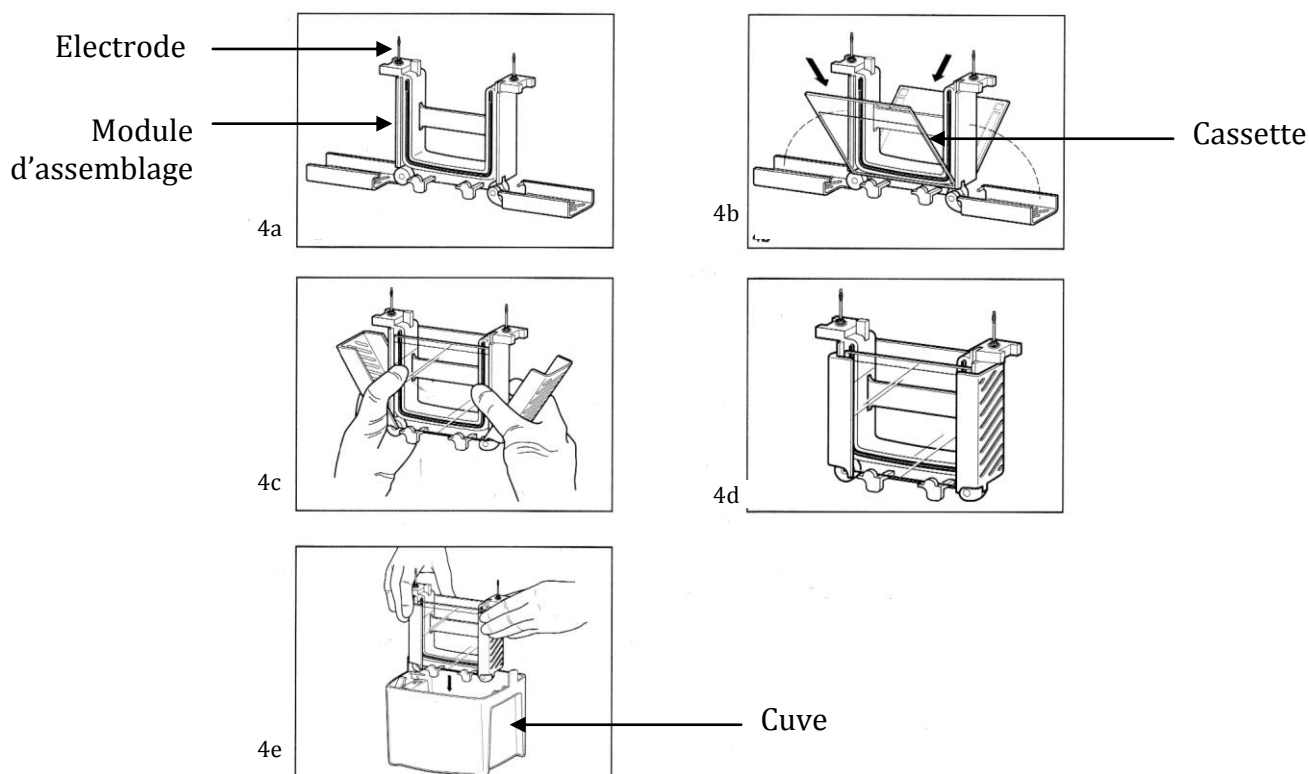


Figure 2 : Assemblage du module électrophorétique

Rédigé par : Mme. GERBELOT Date : 01/09/2012	Vérifié par : M.GENSSE Date : 05/11/12	Approuvé par : P.LAMAUVE Date : 01/09/2014
---	---	---

 LYCEE SAINT-PAUL IV	PROCEDURE	Pr Bioch Ma 009
		Version : 1
	Mini-PROTEAN Tetra Cell	Date de 1 ^{ère} mise en application
		Version de travail : 06/11/12
		Mise à jour AQ le 02/09/2014
		Page : 6/4

3.4 PLACEMENT DES ELECTRODES

-Placer la cuve sur une surface plate. L'avant de la cuve placé devant vous (l'avant de la cuve est le côté avec les limites de remplissage pour deux gel ou quatre gels).

La marque rouge sur le bord intérieur est alors positionnée à droite et la noire, à gauche.

-S'assurer que l'électrode du module d'assemblage à électrodes avec une marque rouge se trouve du côté de la marque rouge du bord intérieur de la cuve.

-Remplir la cuve avec le tampon de migration jusqu'au niveau indiqué sur la cuve en fonction du nombre de gels. Le tampon de migration doit également être placé dans le module d'assemblage de manière à recouvrir les puits.

-Placer le couvercle de la cuve de migration. Assurer vous d'associer de manière uniforme les couleurs des électrodes du couvercle et du module d'assemblage à électrodes (en cas de mauvaise orientation des électrodes, le couvercle marquera une résistance à la fermeture).

-Fermer le couvercle en appuyant (légèrement) dessus.

3.5 MISE SOUS TENSION

-Insérer les fils électriques dans un générateur adéquat (voir procédure du générateur PowerPac HC).

-Appliquer un courant dans la cuve d'électrophorèse. Un courant constant de 200 V est recommandé pour la SDS-PAGE et la plupart des électrophorèses en conditions natives.

Les valeurs maximales supportées par le dispositif sont :

- Voltage maximal : 600 V
- Puissance maximale : 30 W

3.6 RECUPERATION DES GELS

-A la fin de la migration, arrêter le générateur de courant et déconnecter les fils électriques.

-Retirer le couvercle de la cuve en déconnectant les électrodes.

-Déverser le tampon de migration hors de la cuve avant de récupérer les gels.

-Sortir le module d'assemblage de la cuve et ouvrir les armatures afin de récupérer les cassettes.

-Récupérer le gel de la cassette en séparant doucement les plaques de la cassette.

-Rincer les électrodes, la cuve et le module d'assemblage à l'eau distillée.

4. ENTRETIEN

Les éléments du Mini-PROTEAN Tetra cell ne sont pas compatibles avec l'acétone et l'éthanol. Procéder au nettoyage avec des solvants organiques.

Rédigé par : Mme. GERBELOT Date : 01/09/2012	Vérifié par : M.GENSSE Date : 05/11/12	Approuvé par : P.LAMAUVE Date : 01/09/2014
---	---	---