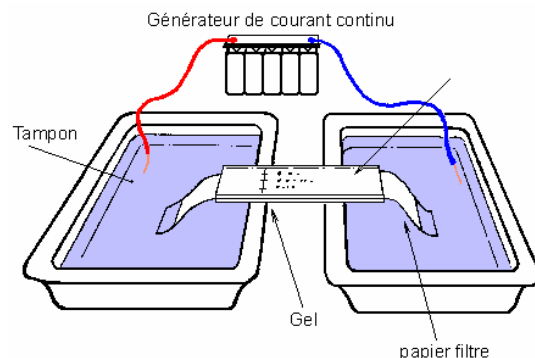


Séparation des hémoglobines A et S par électrophorèse

Fiche laboratoire

Principes de l'électrophorèse des protéines

L'électrophorèse est une méthode d'analyse ou de fractionnement des protéines sous l'effet d'un champ électrique. Les protéines sont déposées sur un gel d'agarose plongeant à chaque extrémité dans un bac rempli de solution tampon. Une tension continue est appliquée à 2 électrodes plongeant chacune dans un des bacs de tampon. Une protéine migrera sur son support d'autant plus rapidement que sa charge globale nette est élevée et que sa taille est réduite. Les tampons utilisés ont un pH basique afin que les protéines se chargent négativement, et migrent vers l'électrode positive.



PROTOCOLE

Préparations

- Remplir la cuve à électrophorèse de tampon.
- Disposer dans des récipients à la taille des bandes utilisées, le colorant et 4 bains de décoloration.

Dépôt des échantillons sur le gel

- Essorer la zone de dépôt est essorée avec une bande de papier filtre pour faciliter la diffusion des échantillons lors du dépôt
- Disposer à la même place un masque de dépôt formé d'une bande de plastique comportant 10 fentes.
- Déposer sur les fentes 5 µL de l'échantillon à analyser et l'abandonner 5' : il diffuse alors au niveau de la zone de dépôt.
- Essorer le liquide non absorbé par le gel avec une autre bande de papier filtre.
- Mettre en place le gel dans la cuve et le assurer un contact électrique entre le tampon placé dans les deux réservoirs et le gel par des bandes de papier filtre trempées dans le tampon.
- Couvrir la cuve à électrophorèse et brancher le générateur (100 à 150 V) : la migration des protéines démarre. Laisser migrer 1 h.

Fixation et coloration du gel

Une fois la migration terminée, le gel est plongé pendant dix minutes dans le fixateur, séché puis plongé pendant 10 minutes dans le colorant. Une succession de bains dans la solution de décoloration permet ensuite d'éliminer la coloration du fond de façon à faire apparaître les bandes correspondant aux diverses protéines séparées. Le gel est ensuite séché ce qui permet de le conserver dans de bonnes conditions.

Résultats

Les hémoglobines A et S ne diffèrent que par 1 acide aminé de la chaîne β globine (constituée de 147 AA) : la différence de migration est faible. Le radical des deux acides aminés est pour HbA, GLU ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$) et pour HbS, VAL ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$). Malgré une masse molaire légèrement plus importante, l'HbA migre plus vite que l'HbS vers l'anode en raison de la présence d'une fonction COOH supplémentaire dans l'AA GLU ($-\text{COOH} \rightarrow -\text{COO}^- + \text{H}^+$).



Informations techniques

Matériel : cuve à électrophorèse, générateur de tension, micropipette 5 µL, récipients pour les différents bains.

Consommables : gel d'agarose, masque de dépôt, bandes de papier filtre, embouts pour micropipette, microtubes.

Réactifs

- 1L Tampon Tris barbital (Tris (hydroxyméthyl) aminométhane : 7,2 g ; Acide diéthylbarbiturique : 1,82 g ; Diéthylbarbiturate de sodium : 10,2 g ; Ethylmercurithiosalicylate : 0,02 g ; Eau distillée : 1 L)
- 200 mL Fixateur (Méthanol : 90 mL ; Acide acétique glacial : 20 mL ; Eau distillée : 90 mL)
- 100mL Colorant (Noir amido : 0,25 g ; Acide acétique à 5 % : 100 mL)
- ½ L Solution de décoloration (Acide acétique à 5 %)
- 100 µL d'HbA et d'HbS à 2,5 mg/mL dans du tampon d'électrophorèse préalablement oxygéné par agitation vigoureuse

Fournisseurs

- Hémoglobines A et S : [SIGMA](#)
- Gels d'agarose supportés : [BIOMIDI](#)