

Electrophorèse

L'électrophorèse a pour but d'identifier les protéines présentes dans les fractions recueillies lors de la purification. Le gel de séparation est utilisé pour séparer les protéines selon leur vitesse de migration quand elles sont soumises à un champ électrique. Le gel de concentration a pour but de concentrer les protéines avant leur migration.

Préparation du matériel.

- Montage

Un joint est mis en place sur l'une des plaques en verre puis on positionne les deux espaceurs de chaque côté et on pose l'autre plaque par-dessus. Le tout est solidarisé par des pinces. On remplit le montage d'eau pour tester l'étanchéité puis on sèche avec de l'alcool.

- Gel de séparation

Nous avons préparé 30 ml de gel selon le protocole fourni soit

7.50 ml d'acrylamide :bis-Acrylamide
11.25 ml Tris HCl pH 8.8
0.30 ml SDS à 10 %
10.95 ml d'eau
Pour la polymérisation nous avons ajouté
30 µl de TEMED
Et après agitation
300 µl de persulfate d'ammonium 20%

La préparation est aussitôt coulée entre les deux plaques à l'aide d'une pipette jusqu'à 2 cm du niveau supérieur. Nous avons pris soin d'éviter la présence de bulle dans le gel en inclinant le montage lors du remplissage. Puis nous avons recouvert le gel d'eau distillée afin d'obtenir une surface parfaitement horizontale. Le gel a commencé à polymériser dès la fin du remplissage. Il importe donc d'effectuer cette opération très rapidement ou bien de diminuer la quantité de catalyseur pour ralentir la polymérisation.

- Gel de concentration

Nous avons préparé 10 ml de gel selon le protocole fourni soit :

1.25 ml d'acrylamide :bis-Acrylamide
1.25 ml Tris HCl pH 6.8
0.10 ml SDS à 10 %
7.4 ml d'eau
Pour la polymérisation nous avons ajouté
40 µl de TEMED
Et après agitation

100 µl de persulfate d'ammonium 20%

Nous avons retiré l'eau puis avons rempli le montage comme précédemment jusqu'au niveau supérieur des plaques de verre. Le peigne est alors mis en place pour former des puits dans le gel de concentration.

- Le tampon de migration

Nous avons préparé 1 litre de tampon selon le protocole fourni soit :

12.5 ml de Tris 25mM
14.4 g de Glycine
977.5 ml d'eau distillée
10 ml SDS 10 %

- Préparation des fractions

Les fractions F0 à F6 ont été diluées en fonction des concentrations en protéines. Les préparations sont effectuées dans des tubes Eppendorf dont le bouchon a été percé.

Fraction	F0	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Tampon dénaturant	50 µl	50 µl	50 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Fraction recueillie	50 µl	50 µl	50 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Préparation à placer dans l'électrophorèse	100 µl	100 µl	100 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl

Les préparations sont chauffées pendant 4 minutes afin de favoriser la dénaturation des protéines.

- Montage de l'électrophorèse

Le peigne est retiré puis les plaques sont placées sur le support et fixées avec des pinces. Les cuves sont alors remplies avec le tampon de migration en commençant par la partie supérieure puis inférieure. Nous avons pris soin de retirer les bulles d'air présentes entre les plaques en verre et le tampon de migration.

Nous avons déposé 50 µl d'échantillon protéique dénaturé dans chaque puit à l'aide d'une seringue.

Les électrodes sont alors connectées au générateur avec le pôle négatif dans la partie supérieure. La migration se fait à 30 mA jusqu'à ce que le bleu de bromophénol atteigne le bord inférieur des plaques.

Révélation

Le gel est retiré des plaques puis placé sur un agitateur et coloré pendant 30 minutes puis décoloré 3 fois 30 minutes avec les solutions suivantes :

Coloration 30 minutes	Décoloration 3 fois 30 minutes
Bleu de Coomassie 2.5 % Isopropanol 20 % Acide Acétique 20 % Eau 57.5 %	Isoopropanol 45% Acide Acétique 10 % Eau 45 %

L'électrophorèse nous permet d'identifier les protéines présentes dans les fractions et donc de déterminer la présence de lysozyme.

Nos résultats obtenus ne sont pas exploitables, en effet il semble que la migration ait duré trop longtemps et que le marqueur moléculaire correspondant au lysozyme soit sorti du gel. Il nous a donc été fourni d'autres résultats sous la forme d'une photocopie.

Grâce aux marqueurs de poids moléculaire et à la distance de migration nous avons pu tracer la courbe $\text{Log PM} = \text{distance de migration}$.

Le lysozyme a un PM de 14300 ce qui est très proche de l'ovalbumine (14200) ainsi nous avons pu identifier ou non la présence du lysozyme dans les différentes fractions

MARQUEURS de PM	PM en Dalton
Alpha lactalbumine	14200
Inhibiteur Trypsique	20100
Trypsinogène	24000
Anhydrase carbonique	29000
Glycérhyde 3 Phosphate	36000
Ovalbumine	45000
Serum Albumine	66000

Fraction	F0	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Présence de lysozymes	oui	Bande très peu visible	non	non	non	oui	Oui

Les résultats fournis sont exemplaires. En effet ils correspondent parfaitement avec la théorie :

Le lysozyme est clairement présent en F0 c'est à dire dans le blanc d'œuf.

Il est présent en faible quantité dans F1 c'est à dire que une très grande partie a été fixée sur la résine mais qu'il reste un faible pourcentage dans le surnageant.

En F2, F3, F4 l'absence de lysozyme confirme qu'il est correctement fixé à la résine.

En F5, c'est la désorption et donc le lysozyme est libéré de la résine et se retrouve dans le surnageant.

En F6 où l'on répète une nouvelle fois la désorption il est présent aussi, c'est-à-dire que tout le lysozyme n'a pas été désorbé en F5.

Cependant la présence du lysozyme en quantité significative en F6 suggère qu'il en reste encore sur la résine au moins en faible quantité et une troisième désorption le prouverait certainement.

Ainsi la purification a correctement fonctionné puisque le lysozyme se retrouve séparé des autres protéines du blanc d'œuf en F5 et F6. Cependant la « purification » est relative et nous sommes loin d'une purification à 100% (impossible d'ailleurs à réaliser où à trouver dans le commerce) et pour obtenir une substance « plus » pure, il faudrait soit répéter les opérations de purification à partir de la fraction F5 et F6 soit utiliser d'autres techniques tels que la CPG (chromatographie en phase gazeuse) ou la HPLC (chromatographie liquide haute pression) qui demandent cependant du matériel plus imposant et plus coûteux.

Concentrations en proteines des differentes fractions du surnageant

