Appareils de laboratoire
Électrophorèse

Laboratory equipment
Electrophoresis

Réf :
591 031

Français – p 1

English – p 19

Version : 6104

Cuve ADN - protéines

DNA proteins cell

Contenu

1 Introduction 2

2 Sécurité 2

3 Description et composition de la cuve 2
3.1 La cuve 2
3.2 La tension à appliquer 3

4 Séparation des fragments d'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose 3
4.1 La théorie avant la pratique 3
4.2 Objectifs et principes 4
4.3 Matériel et produits nécessaires 4
4.4 Mode opératoire 5
4.4.1 Préparation des solutions 5
4.4.2 Dépôt de l'ADN 6
4.4.3 Mise en route de l'électrophorèse et migration (environ 1 heure 30) 6
4.4.4 Arrêt de l'électrophorèse et coloration (quelques heures) 6
4.5 Résultats et exploitations : quelques pistes 7
4.6 Domaines variables 7
4.7 Trucs et astuces 8
4.8 Suggestions pédagogiques et techniques 8

5 Électrophorèse de sérums de lapin immunisé ou non immunisé contre un antigène 8
5.1 Objectifs et principes 8
5.2 Matériel et produits nécessaires 9
5.3 Mode opératoire 9
5.3.1 Préparation des solutions et des bandes d'acétate 9
5.3.2 Mise en place des bandes d'acétate de cellulose dans la cuve : 10
5.3.3 Dépôt du sérum : 11
5.3.4 Mise en route de l'électrophorèse : 11
5.3.5 Arrêt de l'électrophorèse (au bout de 1 heure ou 1 heure 30 min) et coloration des bandes 11
5.4 Résultats attendus 12
5.5 Trucs et astuces 12
5.6 Suggestions pédagogiques et techniques 12

6 Electrophorèses comparatives d'hémoglobines de vertébrés 13
6.1 Objectifs et Principes 13
6.2 Matériel et produits nécessaires 13
6.3 Mode opératoire 13
6.3.1 Préparation des solutions et des bandes d'acétate 14
6.3.2 Mise en place des bandes d'acétate de cellulose dans la cuve : 14
6.3.3 Dépôt des hémoglobines : 15
6.3.4 Mise en route de l'électrophorèse : 15
6.3.5 Arrêt de l'électrophorèse (au bout de 1 heure ou 1heure 30min) et coloration des bandes : 15
6.4 Résultats attendus 16
6.5 Domaines variables 16
6.6 Trucs et astuces 16

7 Entretien 16

8 Service après-vente 17

1 Introduction

Cette cuve à électrophorèse permet, de part sa conception et les équipements dont elle dispose, de réaliser la migration de molécules protéiques et nucléotidiques. La séparation des protéines s'effectue sur bandes d'acétate de cellulose, celles de fragments d'ADN sur gel d'agarose.

2 Sécurité

L'électrophorèse utilise des tensions élevées, nécessitant un dispositif de sécurité infaillible.

La cuve dispose d'un dispositif de sécurité mécanique interdisant l'accès à l'intérieur de la cuve lorsqu'elle se trouve sous tension. Le retrait du couvercle de la cuve provoque un arrêt immédiat de l'alimentation des électrodes.

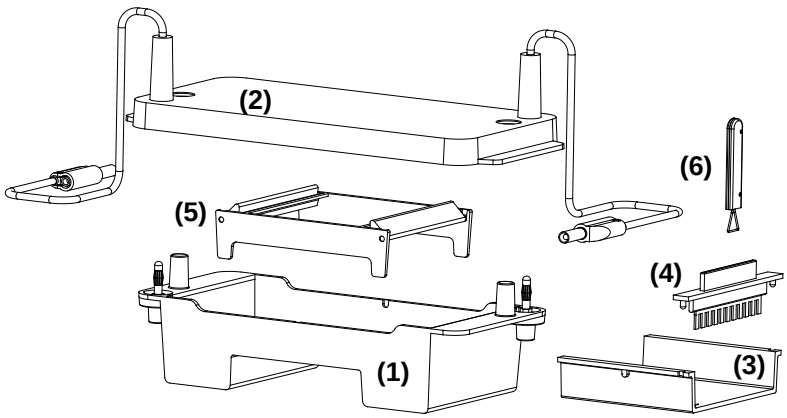
D'autre part, les alimentations fournies par JEULIN sont toutes équipées de douilles de sécurité.

Cependant, l'utilisation de ce type de technique nécessite certaines précautions :

- Effectuer toutes les opérations afférentes à des transferts de liquides à des endroits éloignés de l'alimentation. Eviter toute projection d'eau sur le boîtier d'alimentation.
- Optimiser l'utilisation de la longueur des cordons d'alimentation de la cuve en éloignant au maximum la cuve de l'alimentation, notamment lorsque celle-ci est sous tension.
- Bien essuyer la surface externe de la cuve avant de procéder à son raccordement à l'alimentation.
- Ne mettre le dispositif sous tension que lorsque tous les branchements sont effectués, la cuve fermée et les précautions citées précédemment respectées.

3 Description et composition de la cuve

3.1 La cuve



La cuve à électrophorèse est composée des éléments suivants :

- Un fond de cuve (1) partagé en deux compartiments. Deux électrodes émergent de chacune des fiches bananes et plongent dans les deux compartiments.
  Dimensions (L x l x h) : 20 x 9 x 5 cm.
- Un couvercle transparent (2) équipé de deux cordons.

  Le retrait du couvercle s'effectue en soulevant ses bordures extrêmes à l'aide des index tout en appuyant les pouces sur les deux ergots verticaux cylindriques traversant le couvercle. Cela permet d'ouvrir le couvercle sans bouger la cuve et donc le liquide qu'elle contient.

- Le support (moule) de gel d'agarose (3). Cet accessoire vient se placer dans la partie centrale de la cuve. Le positionnement exact est déterminé par deux ergots positionnés sur les bords. Dimensions (L x l x h) : 87 x 80 x 22 mm.
- Un peigne (4) muni de 11 dents pour la réalisation des puits pour le dépôt des échantillons d'ADN. Il s'adapte sur l'une des extrémités du support grâce à des encoches aménagées à cet effet.
- Le support de bandes (5) pour l'électrophorèse des protéines. Cette pièce est équipée d'un dispositif de cales pivotantes solidaires du support et dont la fonction est de maintenir les extrémités des bandes d'acétate de cellulose bien en contact avec la solution tampon. Dimensions (L x l x h) : 105 x 82 x 27 mm.
- Un applicateur de sérum (6). Cet outil permet d'effectuer sur les bandes d'acétate des dépôts de sérum très fins compatibles avec l'obtention, après migration et séparation, de bandes présentant des bordures relativement nettes. Il permet aussi d'effectuer des dépôts de volume constant.

3.2 La tension à appliquer

Selon la nature des molécules à séparer (ADN ou protéines) et donc des supports de migration correspondant (gel d'agarose ou acétate de cellulose), la tension à appliquer entre les électrodes sera la suivante :

- 100 V pour l'électrophorèse de fragments d'ADN sur gel d'agarose.
- 160 V à 250 V pour la séparation des protéines.

L'alimentation Evolution 100/160 V Réf. 281 287 est en mesure de fournir les deux tensions utiles pour les deux types de TP.

4 Séparation des fragments d'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose

4.1 La théorie avant la pratique

❖ **Le principe de l'électrophorèse d'ADN en gel**

En milieu légèrement basique, l'ADN se comporte comme une chaîne polyanionique (groupements phosphates ionisés). Placés dans un gel d'agarose et soumis à un champ électrique, des fragments d'ADN de taille différente migrent plus ou moins rapidement suivant leur masse moléculaire. La charge relative des fragments étant la même, c'est essentiellement l'effet de tamisage exercé par le gel qui influe sur la migration. La vitesse de déplacement diminue donc avec la taille des fragments, celle-ci étant exprimée en nombre de paires de bases (pb) ou en Kb (1 Kb = 1000 pb).

❖ **Les fragments de restriction**

L'ADN utilisé est de l'ADN de bactériophage lambda digéré par une enzyme de restriction : (EcoRI ou Hind III). Il s'agit d'un « petit » ADN de 49 Kb dont la « digestion » ne fournit que peu de fragments de restriction, ce qui facilite la lecture du gel.

Taille (pb) des fragments obtenus après digestion :

par Hind III :	23130	9416	6557	4361	2322	2027	564	125
par EcoRI :	21226	7421	5804	5643	4878	3530		

L'ADN de phage lambda digéré par Hind III peut être utilisé comme ADN de référence pour déterminer la taille des fragments de restriction (marqueur de taille).

4.2 Objectifs et principes

Approcher expérimentalement la technique de réalisation d'un Southern Blot :

- Découpage de l'ADN par des enzymes de restriction.
- Séparation des fragments par électrophorèse.
- Révélation non spécifique des fragments séparés.

4.3 Matériel et produits nécessaires

Qté	Désignation	Référence
1	Alimentation électrique Evolio 2 Cuves 70/140 V	**281 120**
1	Cuve à électrophorèse ADN-Protéines	**591 031**
Consommables / réactifs		
1	Tampon TBE	**105 173**
1	ADN de phage digéré par Hind III	**117 039**
1	ADN de phage digéré par EcoR1	**117 038**
1	Solution de charge	**117 037**
1	Colorant pour électrophorèse d'ADN	**105 171**
1	Tampon pH 6.87	**107 195**
1	Tampon pH 9.18	**107 196**
1	Ethanoate de sodium	**107 112**
1	Acide éthanoïque à 80 %	**106 110**
Verrerie		
1	Fiole de 1000 mL	**713 270**
1	Fiole de 250 mL	**713 268**
2	Entonnoir	**713 027**
1	Eprouvette de 250 mL	**723 166**
1	Eprouvette de 100 mL	**723 165**
1	Capsule verre	**713 201**
1	Erlenmeyer de 250 mL à col large	**713 207**
1	Bécher de 250 mL	**713 196**
2	Bécher de 100 mL	**713 513**
1	Pipette graduée de 5 mL	**713 281**
1	Cristallisoir 1,5 L	**713 497**
Matériel annexe		
1	Agitateur magnétique	**701 182**
1	Bain-marie ou four micro-ondes	
1	Balance au 1/100ème	**701 243**
1	Pipette automatique	**703 397**
1	Cônes pour micropipette	**723 136**
1	Tubes Eppendorf	**723 184**
1	Portoir pour tubes Eppendorf	**701 153**
1	Spatule	**703 101**
1	Testeur de pH	**701 217**
1	Turbulents droits 1 bague	**703 178**
1	Baguette magnétique	**703 251**

4.4 Mode opératoire

Durée de préparation : Préparation du gel, coulage, montage, migration, coloration, décoloration : 16 heures.

Durée d'observation en classe : quelques minutes.

4.4.1 Préparation des solutions

❖ **Préparation du tampon (environ 1 heure) :**

Le volume de tampon nécessaire par cuve est d'environ 300 mL.

- Verser le contenu d'un sachet de tampon TBE (Tris Borate Ethylène diamine) dans une fiole jaugée de 1 litre.
- Rincer le sachet à l'eau distillée pour récupérer le reste de tampon.
  Pour faciliter la dilution du TBE, verser le contenu du sachet en plusieurs fois, en maintenant une agitation constante.
- Une fois que le TBE est complètement dissous dans l'eau déminéralisée, une dilution **par 10** est nécessaire pour préparer la solution finale.

Une fois que la solution diluée est prête, s'assurer que le pH résultant est effectivement compris entre 8,2 et 8,3. Dans le cas contraire, rectifier (ajout de HCl ou NaOH).

❖ **Préparation et coulage du gel d'agarose pour une cuve (environ 1 heure 15) :**

- Verser 83 mL de tampon final TBE dans un erlenmeyer de 250 mL.
- Peser 0,5 g d'agarose de type II dans une capsule et le verser en pluie fine dans le tampon TBE.
- Mettre l'erlenmeyer contenant le TBE et l'agarose sur un agitateur magnétique chauffant avec un turbulent jusqu'à dissolution complète. S'assurer que l'agitation est maintenue constante afin de permettre une bonne homogénéisation du produit et d'éviter la formation de bulles dans le gel.
- Attendre le refroidissement de la solution (léger épaississement) et préparer le support (moule de coulage) comme suit.
- Disposer 2 morceaux d'adhésif pour peintre, un à chaque extrémité ouverte du support de gel pour le fermer complètement. S'assurer que l'adhésif utilisé est suffisamment résistant pour éviter la perte de la solution, et ce notamment si le gel est trop chaud et un peu trop liquide.

Positionner le peigne sur le support en utilisant les encoches prévues à cet effet.

Placer le plateau de moulage parfaitement à l'horizontale.

Lorsque la température de la solution atteint 50 °C, la verser lentement et à vitesse constante au centre du plateau de moulage. Arrêter lorsque le niveau arrive juste au-dessous de la jonction dents-reste du peigne. Laisser ensuite le gel se figer 10 min à la température de la salle, puis 10 à 15 min au réfrigérateur. Enlever ensuite le peigne en le tirant bien verticalement : les puits apparaissent. Retirer le papier adhésif.

❖ **Préparation de l'ADN :**

- Avant la séance, décongeler l'ADN. Placer le tube Eppendorf le contenant environ 5 minutes sous l'eau chaude, puis le plonger dans l'eau glacée pendant deux minutes. Cela permet, par chocs thermiques, de séparer les fragments qui auraient pu s'associer à nouveau et d'autre part d'éviter la nouvelle formation de bouts collés.
- Dans un autre tube Eppendorf, diluer la solution mère d'ADN de façon à obtenir 80 µL d'une solution à concentration égale à 0,07 µg d'ADN par µL. Utiliser la formule de chimie suivante : C1xV1 = C2xV2 : C1 désigne la concentration en µg d'ADN par mL donnée par le fournisseur : C2 représente la concentration à obtenir soit 0,07 µg / µL : V2 représente le volume final de solution, soit 80 µL : V1 le volume d'ADN à prélever en µL. Le prélèvement s'effectue avec une pipette automatique.On complète le volume à 80 µL en ajoutant de l'eau distillée. Il y a alors 5,6 µg d'ADN dans le tube Eppendorf.

REMARQUE : *L'ADN non utilisé doit être replacé le plus tôt possible à -15 °C (même s'il s'agit d'un échantillon densifié).*
Le produit supporte aisément une succession de plusieurs alternances de congélation-décongélation sans perdre ses propriétés. Mais il faut réduire au minimum la durée de décongélation pendant laquelle une dégradation occasionnelle par des micro-organismes est possible.

- Réaliser ensuite la densification de l'ADN : à l'ADN préparé précédemment, ajouter une solution de charge pour densifier l'échantillon et permettre son dépôt dans les puits du gel immergé. Cette solution contient en plus un indicateur de migration, le bleu de bromophénol (BBP) qui migre à une vitesse voisine d'un fragment d'ADN double brin de 300 paires de bases (pb), soit plus vite que tous les fragments (sauf un) de restriction impliqués dans ce TP.
  Respecter les proportions suivantes : 1 volume (20 µL) de solution de charge pour 4 volumes (80 µL) de la solution d'ADN. Le prélèvement s'effectue à la pipette automatique. Bien mélanger l'ensemble.

4.4.2 Dépôt de l'ADN

À l'aide d'une pipette automatique, déposer 6 µL d'ADN dans chaque puits ou dans un puits sur deux en évitant que le puits ne déborde. Veiller à ne pas perforer le fond des puits.

4.4.3 Mise en route de l'électrophorèse et migration (environ 1 heure 30)

- Poser le support de gel dans la cuve, les puits devant être du côté de la cathode (borne négative).
- Remplir chaque compartiment de la cuve de tampon final TBE. Le tampon vient au contact du gel jusqu'à dépasser les 2/3 de sa hauteur, mais ne le recouvre en aucun cas. Un niveau de tampon trop élevé peut engendrer une intensité supérieure aux limites autorisées par l'alimentation qui disjoncte alors.
- Fermer la cuve à l'aide de son couvercle.
- Respecter la correspondance des couleurs entre les cordons de la cuve et les douilles de l'alimentation.
- Régler la tension de votre alimentation sur 100 V.
- Raccorder l'appareil au secteur.
- Mettre l'alimentation sous tension. La migration démarre.
  Vérifier le bon déroulement de votre électrophorèse : de la buée doit apparaître sur le couvercle dans les cinq premières minutes si le générateur et la cuve sont bien alimentés.
- Pour stopper la migration, couper l'alimentation, débrancher la cuve et le cordon secteur.
  Si, lors de la mise sous tension, l'alimentation disjoncte, retirer un peu de solution tampon.
  La disjonction peut être due à une trop grande conductivité de la solution, provoquant la mise en marche de la protection en court-circuit. Se reporter à la notice de l'alimentation pour le rétablissement de la tension.

4.4.4 Arrêt de l'électrophorèse et coloration (quelques heures)

- Pendant la durée de la migration, préparer 125 mL d'éthanoate de sodium 0,5 M (soit 5,12 g d'éthanoate de sodium pour 125 mL d'eau distillée).
- Étalonner le pH-mètre avec deux solutions tampon de pH connu : par exemple 6,87 et 9,18.
  Ajuster le pH des 125 mL de solution d'éthanoate de sodium à 5,2 en ajoutant progressivement de l'acide éthanoïque à 80 %.
  Mesurer de manière permanente le pH à l'aide du pH-mètre.

- Préparer une solution de colorant pour électrophorèse à 0,1 % (0,1 g pour 100 mL). Dissoudre le colorant dans la solution tampon acide éthanoïque - éthanoate de sodium à pH 5,2.
- Arrêter l'électrophorèse lorsque le BBP (Bleu de Bromophénol), indicateur de migration, a au moins parcouru une distance équivalente aux 2/3 du gel. Le retrait du couvercle s'effectue en soulevant ses bordures extrêmes à l'aide des index tout en appuyant les pouces sur les deux ergots verticaux cylindriques traversant le couvercle et situés aux deux extrémités de la cuve.
- Mesurer la distance parcourue par le BBP (pour une exploitation ultérieure en classe par les élèves).
- Retirer le support de gel (avec son gel) de la cuve et le déposer dans un cristallisoir.
- Recouvrir avec le colorant et attendre 5 min à température ambiante.
- Vider le colorant (qui peut être réutilisé).
- Rincer le gel resté dans le cristallisoir à l'eau distillée pour retirer l'excès de colorant.
- Retirer le support du cristallisoir.
- Décolorer le gel par des bains successifs d'eau distillée jusqu'à apparition des bandes d'ADN (plusieurs heures).
  Les bandes d'ADN restent bien colorées et on les distingue de mieux en mieux.

4.5 Résultats et exploitations : quelques pistes

Les deux enzymes de restriction scindent l'ADN en un nombre variable de fragments visibles sous-forme de bandes dont l'épaisseur et la distance de migration sont fonction de leur masse en paires de bases.

- Faire découvrir le mode d'action des enzymes de restriction par l'analyse de l'électrophorégramme.
  Faire comprendre que la vitesse de migration est ici fonction de la taille des fragments en constatant que les bandes sont d'autant plus colorées et épaisses qu'elles sont plus proches des puits. En effet, on peut considérer que le nombre de fragments au niveau de chaque bande est le même. C'est donc la masse moléculaire de ces fragments qui varie.
- Déterminer la taille d'un fragment de restriction. Pour cela il faut utiliser l'ADN de phage lambda coupé par Hind III comme marqueur de taille (étalon) et proposer la détermination de la taille d'un fragment d'ADN coupé par Eco RI .
  On considère que dans les conditions habituelles et dans certaines limites, le log décimal de la taille (en pb) d'un fragment est inversement proportionnel à la distance de migration. Il suffit donc, à partir du gel (ou d'une photo numérisée), de mesurer la distance de migration de chaque bande de l'ADN étalon. Connaissant la taille des fragments (indiquée par ailleurs), on construit la courbe étalon log (T) = f (d) avec T= taille en pb et d = distance parcourue en mm. Pour déterminer la taille d'un fragment inconnu, ici de l'ADN coupé par Eco RI, il faut mesurer d et retrouver T sur la courbe étalon (partie linéaire de la courbe).
  Remarque : *On peut tracer la courbe Log (T) = f (Rf) avec*
  Rf = distance parcourue par la bande / distance parcourue par le BBP, mais il faut alors mesurer la migration du BBP avant coloration.
- Attirer l'attention des élèves sur l'efficacité de la méthode par l'évaluation des microquantités d'ADN utilisées et révélées.
- Envisager les opérations qui complètent l'électrophorèse lors de la réalisation d'un Southern blot, par exemple, dans le cadre d'un diagnostic prénatal.

4.6 Domaines variables

Utilisation possible d'autres enzymes de restriction.

4.7 Trucs et astuces

- Ne pas couler le gel à une température trop élevée, bien attendre son refroidissement. (Vous devez pouvoir poser l'erlenmeyer sur votre main sans vous brûler)
- Ne pas prendre de l'adhésif classique trop collant, vous auriez des difficultés à le décoller et vous endommageriez le gel.
- Bien vérifier la concentration de l'ADN indiquée par le fournisseur avant d'effectuer les dilutions.
- Vous visualisez la migration en observant le déplacement du BBP vers l'anode. Pour cela les tâches doivent avoir quitté les puits de dépôt.
- Le temps de préparation du TP étant long, il est possible de préparer la manipulation à l'avance. Le gel coloré se conserve au moins une semaine à 4°C dans un cristallisoir rempli d'eau distillée.
- Éviter la présence de bulles d'air dans le gel : elles gênent le séparation des bandes, le milieu n'étant pas homogène. Pour cela, au moment du moulage du gel, verser la solution d'agarose doucement et progressivement dans le moule et, au préalable, lors de la dissolution de la poudre d'agarose, régler la vitesse de l'agitateur magnétique de manière à ne pas introduire de bulles d'air dans la solution.
- Si le générateur disjoncte : il s'agit d'un court-circuit dû à un excès de tampon. Retirer à l'aide d'une pipette un petit volume égal de tampon dans chaque cuve, et recommencer le protocole de mise en route de l'électrophorèse.
- Absence de migration du BBP au bout de 15 minutes :
- Le générateur n'ayant pas disjoncté, il s'agit d'un manque de tampon dans un ou dans les deux compartiments de la cuve.
- Arrêter le générateur, puis à l'aide d'une pipette ajouter du tampon dans le ou les compartiments.
- Recommencer le protocole de mise en route de l'électrophorèse.
- Déplacement non rectiligne des bandes :
- Ce problème ne gêne pas la visualisation de l'électrophorèse mais peut handicaper son interprétation.

4.8 Suggestions pédagogiques et techniques

Ce TP est intéressant dans l'enseignement de spécialité de Terminale S lorsqu'on aborde les bases de la révolution technologique du début des années 70, et en premier lieu l'utilisation des enzymes de restriction.

La comparaison des électrophorèses du même ADN phagique traité par deux enzymes de restriction différentes permet de sensibiliser à la notion de spécificité de ces enzymes.

Ce TP sensibilise aussi à la migration différentielle des fragments d'ADN selon leur taille ce qui est indispensable par la suite à la compréhension d'un Southern Blot réalisé dans la perspective d'un diagnostic prénatal, par exemple.

La discussion sur les limites de la technique utilisée pour révéler l'ADN permet de poser le problème de la révélation d'un fragment particulier de l'ADN et donc d'introduire la technique de dénaturation de l'ADN associée à l'utilisation d'une sonde spécifique.

5 Électrophorèse de sérums de lapin immunisé ou non immunisé contre un antigène

5.1 Objectifs et principes

- Mise en évidence de la présence permanente d'immunoglobulines dans un organisme par une méthode de séparation des protéines sanguines.
- Introduction à la notion de phénotype immunitaire.
- Variation du phénotype immunitaire suite à une immunisation.

5.2 Matériel et produits nécessaires

Qté	Désignation	Référence
Equipement de base		
1	Alimentation électrique Evolio 2 Cuves 70/140 V	**281 120**
1	Cuve à électrophorèse ADN/Protéines	**591 031**
1	Bac de coloration	**591 033**
Consommables / réactifs		
1	Tampon pour électrophorèse de protéines	**107 263**
1	Colorant rouge ponceau (250 mL)	**106 135**
1	Bandes acétate de cellulose (100)	**105 042**
1	Sérum de lapin	**117 027**
1	Acide éthanoïque cristallisable	**106 002**
1	Diacétone alcool (1 L)	**102 068**
1	Méthanol (1 L)	**102 134**
1	Papier filtre	**703 082**
Verrerie		
1	Fiole jaugée de 1000 mL	**713 270**
1	Fiole jaugée de 100 mL	**713 267**
1	Entonnoir	**713 027**
1	Capsule verre	**713 201**
1	Pipette graduée de 5 mL	**713 281**
Matériel annexe		
1	Pince plate	**564 026**
1	Pince Dumont	**564 062**

5.3 Mode opératoire

Durée de préparation : 30 minutes.
Durée de réalisation en classe : 1 heure 30.

5.3.1 Préparation des solutions et des bandes d'acétate

❖ **Solution tampon :**

Verser le contenu du flacon de tampon pour électrophorèse des protéines dans une fiole jaugée d'un litre. Rincer le flacon de tampon une ou deux fois à l'eau distillée afin de récupérer tout le produit dans la fiole jaugée, puis compléter son volume à un litre avec de l'eau distillée.

❖ **Bandes d'acétate de cellulose :**

- Les bandes de cellulose sont conservées dans le méthanol. Remplacer ce conservateur par du tampon afin que la migration des protéines soit possible dans un champ électrique.
- Remplir à l'aide du tampon autant de compartiments du bac de coloration que de bandes d'acétate de cellulose nécessaires pour votre groupe de TP.
  Sortir du paquet le nombre de bandes nécessaires à l'expérience. Elles sont placées entre deux lames de protection en plastique translucide et conservées dans le méthanol à 35 %.
- Enlever une lame en plastique et prélever une à une le nombre de bandes nécessaires à l'aide d'une pince Dumont. La dimension de l'applicateur de sérum autorise 2 dépôts par bande.
  Déposer une bande par compartiment et la laisser immergée 10 à 15 minutes dans le tampon pour l'imprégner et éliminer le méthanol.

❖ **Rouge ponceau :**

La solution Réf. 106 135 est livrée prête à l'emploi.

À partir du colorant en poudre, préparer la solution en respectant la composition suivante :

- Rouge ponceau 1,25 g
- Acide trichloractéique 11,8 g
- Eau distillée q.s.p. 100 mL

Bien mélanger.

Filtrer pour éliminer le colorant non dissous.

À conserver de préférence au réfrigérateur à l'abri de la lumière.

Attention :
Le rouge ponceau est un colorant spécifique des protéines qui a une très grande affinité pour celles-ci. Si vous posez vos doigts dans le bain, ils seront colorés de manière indélébile jusqu'au remplacement de vos cellules de peau. Penser à utiliser des béchers forme basse en verre et des gants.

❖ **Solution de décoloration** (à préparer extemporanément) :

Préparer une solution d'acide acétique à 5 % dans l'eau : 50 mL d'acide + 900 mL H_2O.

❖ **Solution de transparisation** (à préparer extemporanément) :

Composition :

- Méthanol 75 mL
- Acide acétique (cristallisable) 20 mL
- Diacétone alcool 5 mL

Remarque : la solution de transparisation permet de rendre les bandes transparentes après traitement. Cette opération n'est pas indispensable pour la détermination de l'électrophorégramme avec l'adaptateur lecteur d'électrophorèse qui peut s'effectuer sur la bande blanche.

❖ **Préparation du sérum :**

Reconstituer le sérum de lapin en ajoutant 5 mL d'eau distillée au contenu du flacon.

Attendre la solubilisation complète et agiter le flacon pour homogénéiser son contenu. La conservation du sérum ainsi reconstitué est limitée à trois ou quatre jours au réfrigérateur.

5.3.2 Mise en place des bandes d'acétate de cellulose dans la cuve :

Une cuve est en mesure d'accepter trois bandes au maximum.

- Remplir chaque compartiment de la cuve de tampon pour électrophorèse des protéines en évitant tout débordement. Prévoir 100 mL de solution par cuve.
- Sortir les bandes des bacs de coloration à l'aide d'une pince plate. Les placer entre deux feuilles de papier filtre et les sécher à l'aide d'un mouvement rapide de la main.
- Ecarter les cales du support de bandes, en les faisant pivoter.
- Poser les bandes sur le support, le coin coupé en bas à droite (ainsi la bande présente sa la face mate qui est absorbante sur le dessus). Faire glisser chaque extrémité de chaque bande entre les cales et leur support.
- Rabattre les cales. Tendre légèrement les bandes en tirant sur leurs extrémités libres à l'aide de la pince plate.
- Les bandes doivent être parallèles entre elles et perpendiculaires à l'axe du portoir pour permettre une migration des protéines dans l'axe de la bande.
- Poser le support dans la cuve et vérifier que les extrémités de chaque bande trempent dans le tampon de chacun des deux compartiments.

5.3.3 Dépôt du sérum :

Verser quelques gouttes du flacon de sérum de lapin dans la capsule de verre.

À l'aide de l'applicateur, prélever (par simple trempage) le sérum et le déposer rapidement sur la bande, à quelques millimètres, voir un centimètre, au-dessus du rebord supérieur de la cale, du côté de la cathode (borne noire) et perpendiculairement à l'axe de la bande.

Il est possible de réaliser deux dépôts côte à côte sur la même bande.

5.3.4 Mise en route de l'électrophorèse :

- Fermer la cuve à l'aide du couvercle.
- Relier la cuve au générateur à l'aide des cordons.

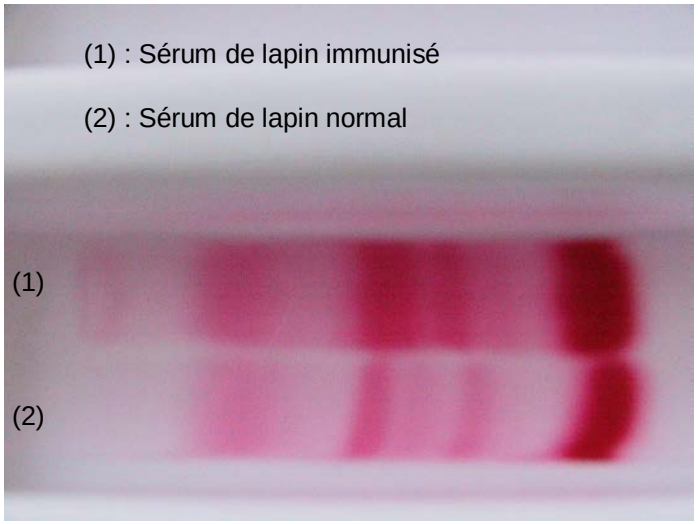
Respecter la correspondance des couleurs entre cordons et douilles.

- Régler la tension de votre alimentation sur 160 V.
- Raccorder l'appareil au secteur.
- Mettre l'alimentation sous tension. La migration démarre.

5.3.5 Arrêt de l'électrophorèse (au bout de 1 heure ou 1 heure 30 min) et coloration des bandes

- Pendant la durée de la migration, remplir le premier compartiment du bac à coloration de rouge Ponceau.
- Remplir au minimum trois compartiments avec la solution de décoloration composée d'acide éthanoïque à 5 % (5 mL d'acide éthanoïque glacial dans 100 mL d'eau distillée). Pour obtenir au final des bandes transparentes, réserver aussi un compartiment pour la solution de transparisation.
- Arrêter l'électrophorèse. La durée de migration va dépendre du temps disponible pour le TP. Respecter un minimum d'une heure, sachant que la distance de migration va dépendre de la durée et de l'intensité de la tension appliquée (migration plus rapide à 225 V qu'à 160 V).
- Débrancher les cordons reliés à la cuve et retirer le couvercle. Le retrait du couvercle s'effectue en soulevant ses bordures extrêmes à l'aide des index tout en appuyant les pouces sur les deux ergots verticaux cylindriques traversant le couvercle et situés aux deux extrémités de la cuve.
- Sortir le support de la cuve, faire pivoter les cales pour libérer les bandes.
- Prendre chaque bande à l'aide d'une pince plate pour la coloration.
- Immerger la première bande dans le compartiment contenant le rouge Ponceau.
  La laisser se colorer pendant environ 1 minute. Puis la tremper dans des bains successifs d'acide éthanoïque à 5 %. La changer de compartiment lorsque la solution d'acide éthanoïque est saturée en rouge Ponceau. Dans le dernier compartiment d'acide éthanoïque à 5 % le fond de la bande doit être redevenu blanc. Seules les protéines apparaissent sous forme de tâches rouges. Selon le nombre de bandes à colorer, changer, dans les différents compartiments qui la contiennent, la solution d'acide éthanoïque lorsque celle-ci, saturée en colorant, ne remplit plus correctement ses fonctions.
- Immerger les bandes dans la solution de transparisation, puis les retirer dès qu'elles deviennent translucides. Sortir la bande du dernier compartiment et la sécher entre deux feuilles de papier filtre.

5.4 Résultats attendus



Les différentes protéines constituant le sérum sont visibles sous forme de bandes rouges séparées les unes des autres.
On voit apparaître des bandes que l'on lit du + vers le – dans l'ordre des protéines les plus déplacées vers les moins déplacées. TISELIUS (prix Nobel pour sa découverte) a donné leur nom aux protéines :

- Albumine.
- α_1 et α_2 globulines
- β_1 et β_2 globulines
- γ globulines

Vous pouvez effectuer un témoin de migration avec de l'albumine de lapin. Vous pouvez comparer cette électrophorèse de sérum de lapin non immunisé avec celle d'un sérum de lapin immunisé.

5.5 Trucs et astuces

- Ne pas toucher les bandes avec les doigts à aucune des étapes de leur manipulation. Dans le cas contraire, il apparaîtrait après coloration des tâches rouges à l'emplacement des doigts.
- Vérifier le bon déroulement de votre électrophorèse : de la buée doit apparaître sur le couvercle dans les cinq premières minutes si le générateur et la cuve sont bien alimentés.
- Les bandes colorées peuvent être conservées pour une exploitation ultérieure entre deux feuilles de papier filtre mais doivent être mises sous presse pour le séchage. Dans le cas contraire la bande vrille et devient inutilisable, en particulier, pour une lecture ESAO.

  Une autre possibilité consiste à poser chaque bande sur une lame porte-objet et laisser sécher à l'air libre. Les bandes se conservent ainsi dans d'excellentes conditions, à température ambiante, pendant plusieurs années.
- Si la migration des tâches n'est pas rectiligne : soit l'axe de la bande n'était pas perpendiculaire à l'axe du portoir, soit le dépôt n'a pas été fait perpendiculairement à l'axe de la bande.

5.6 Suggestions pédagogiques et techniques

Cette analyse des protéines sanguines associée à la réaction d'Outcherlony permet de fournir les bases scientifiques nécessaires à l'interprétation des tests de séropositivité dans le cas du SIDA (test ELISA ou Western Blot).

Vous pouvez réaliser la lecture de votre électrophorèse par ESAO grâce au logiciel Phorèse et à l'adaptateur lecteur pour électrophorèse.

6 Électrophorèses comparatives d'hémoglobines de vertébrés

6.1 Objectifs et Principes

Comparaison de la vitesse de migration des hémoglobines de différents Vertébrés (molécules homologues). Cette comparaison permet de mettre en évidence des différences de structures primaire et tertiaire des hémoglobines de Vertébrés.

Après une première approche de l'établissement des liens de parenté chez les Vertébrés par des études anatomiques, ce TP peut permettre de mettre en pratique les comparaisons moléculaires réalisées à partir de logiciels.

6.2 Matériel et produits nécessaires

Qté	Désignation	Référence
Equipement de base		
1	Alimentation électrique Evolio 2 Cuves 70/140V	**281 120**
1	Cuve à électrophorèse ADN/Protéines	**591 031**
Consommables / réactifs		
1	Tampon tris borate EDTA	**105 173**
1	Colorant rouge ponceau (250 mL)	**106 135**
1	Bandes acétate de cellulose (100)	**105 042**
1	Acide éthanoïque cristallisable	**106 002**
1	Papier filtre	**703 082**
Verrerie		
1	Fiole jaugée de 1000 mL	**713 270**
1	Fiole jaugée de 500 mL	**713 269**
1	Fiole jaugée de 250 mL	**713 268**
1	Entonnoir	**713 027**
1	Capsule verre	**713 201**
1	Pipette graduée de 5 mL	**713 281**
Matériel annexe		
1	Pince plate	**564 026**
1	Pince Dumont	**564 062**
1	Spatule	**703 101**
1	Balance électronique 0,1 g	**701 244**
1	Turbulent droit	**703 178**
1	Agitateur magnétique	**701 182**
1	Seringue de 5 mL	

6.3 Mode opératoire

Durée de préparation : 1 h 30.
Durée de réalisation en classe : 1 h 30.

6.3.1 Préparation des solutions et des bandes d'acétate

❖ **Tampon :**

Le volume final de tampon barbital pour hémoglobine est de 750 mL.

Verser le contenu du flacon de tampon barbital dans une fiole jaugée de 500 mL. Rincer le flacon de tampon une ou deux fois à l'eau distillée afin de récupérer tout le produit dans la fiole jaugée. Compléter son volume à 500 mL avec de l'eau distillée. Mélanger. Remplir une fiole jaugée de 250 mL avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge. Transférer le contenu de la fiole jaugée de 500 mL dans une fiole d'un litre, et rincer la fiole de 500 mL avec les 250 mL d'eau distillée pour récupérer tout le tampon.

❖ **Bandes d'acétate de cellulose :**

Les bandes de cellulose sont conservées dans le méthanol à remplacer par du tampon afin que la migration des protéines soit possible dans un champ électrique.

Remplir à l'aide du tampon autant de compartiments du bac de coloration que de bandes d'acétate de cellulose nécessaires pour votre groupe de TP.

Sortir du paquet le nombre de bandes nécessaires à l'expérience. Il est possible de réaliser deux dépôts côte à côte sur la même bande.

Les bandes sont placées entre deux lames de protection en plastique translucide et conservées dans le méthanol à 35 %.

Enlever une lame en plastique et prélever une à une le nombre de bandes nécessaires à l'aide d'une pince Dumont.

Déposer une bande par compartiment et la laisser immergée 10 à 15 minutes dans le tampon pour les imprégner et éliminer le méthanol.

❖ **Hémoglobines :**

Selon le nombre de dépôts à réaliser au total, peser la quantité d'hémoglobine nécessaire à la préparation d'une solution à 0,15 g/L d'hémoglobine. Verser par exemple 0,15 g dans 1mL d'eau distillée préalablement déposée au fond d'une capsule en verre (une capsule pour chaque hémoglobine).

Attendre la reconstitution de l'hémoglobine sans mélanger. Faire de même pour l'hémoglobine d'oiseau.

Pour l'hémoglobine de poisson, nous vous conseillons le Maquereau frais. À l'aide d'une seringue de 5 mL, prélever du sang au niveau de la partie antérieure des opercules en appuyant sur les branchies. Vider le sang de la seringue dans une capsule sans le diluer.

6.3.2 Mise en place des bandes d'acétate de cellulose dans la cuve :

Une cuve est en mesure d'accepter trois bandes au maximum.

- Remplir chaque compartiment de la cuve de tampon barbital en évitant tout débordement. Prévoir 100 mL de solution par cuve.
- Sortir les bandes des bacs de coloration à l'aide d'une pince plate. Les placer entre deux feuilles de papier filtre et les sécher à l'aide d'un mouvement rapide de la main.
- Écarter les cales du support de bandes, en les faisant pivoter.
- Poser les bandes sur le support le coin coupé de la bande en bas à droite (ainsi la bande présente sa face mate qui est absorbante sur le dessus). Faire glisser chaque extrémité de chaque bande entre les cales et leur support.
- Rabattre les cales. Tendre légèrement les bandes en tirant sur leurs extrémités libres à l'aide de la pince plate.
- Les bandes doivent être parallèles entre elles et perpendiculaires à l'axe du portoir pour permettre une migration des protéines dans l'axe de la bande.
- Poser le portoir dans la cuve et vérifier que les extrémités de chaque bande trempent dans le tampon de chacun des deux compartiments.

6.3.3 Dépôt des hémoglobines :

À l'aide de l'applicateur, prélever (par simple trempage) une hémoglobine et la déposer rapidement sur la bande, à quelques millimètres, voir un centimètre, au-dessus du rebord supérieur de la cale, du côté de la cathode (borne noire) et perpendiculairement à l'axe de la bande.

Il est possible de réaliser deux dépôts côte à côte sur la même bande.

Vous pouvez ainsi déposer sur la même bande une deuxième hémoglobine d'un autre vertébré après avoir bien nettoyé l'applicateur.

Pour effectuer une comparaison entre les trois Vertébrés, il faut trois bandes portant chacune deux hémoglobines différentes.

6.3.4 Mise en route de l'électrophorèse :

- Fermer la cuve à l'aide du couvercle.
- Relier la cuve au générateur à l'aide des cordons.

Respecter la correspondance des couleurs entre cordons et douilles.

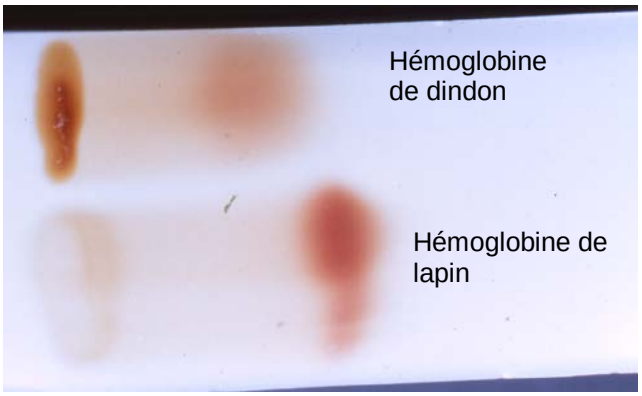
- Régler la tension de votre alimentation sur 160 V.
- Raccorder l'appareil au secteur.
- Mettre l'alimentation sous tension. La migration démarre.

6.3.5 Arrêt de l'électrophorèse (au bout de 1 heure ou 1heure 30min) et coloration des bandes :

- Pendant le temps de migration, remplir le premier compartiment du bac à coloration de rouge Ponceau.
- Remplir les compartiments restants du bac à coloration d'acide éthanoïque à 5 % (5 mL d'acide éthanoïque glacial dans 100 mL d'eau distillée).
- Arrêter l'électrophorèse. La durée de migration va dépendre du temps disponible pour le TP. Respecter un minimum d'une heure, sachant que la distance de migration va dépendre de la durée et de l'intensité de la tension appliquée (migration plus rapide à 225 V qu'à 160 V).
- Débrancher les cordons reliés à la cuve et retirer le couvercle. Le retrait du couvercle s'effectue en soulevant ses bordures extrêmes à l'aide des index tout en appuyant les pouces sur les deux ergots verticaux cylindriques traversant le couvercle et situés aux deux extrémités de la cuve.
- Sortir le portoir de la cuve, faire pivoter les cales du support pour ainsi libérer les bandes.
- Prendre chaque bande à l'aide d'une pince plate pour la coloration.
  Vous pouvez réaliser une observation directe de la migration pour comparer les distances parcourues.

  La coloration des bandes reste facultative, mais si vous différez l'observation, les tâches d'hémoglobines s'atténuent rapidement au cours du temps.
- Immerger la première bande dans le compartiment contenant le rouge Ponceau (voir préparation au chapitre 5.3.1.).
  Laisser la bande se colorer pendant environ 1 minute.
- Puis tremper la bande dans des bains successifs d'acide éthanoïque à 5 %. La bande est changée de compartiment lorsque la solution d'acide éthanoïque est saturée en rouge Ponceau. Dans le dernier compartiment d'acide éthanoïque à 5 % le fond de la bande doit être redevenu blanc, seules les protéines apparaissent sous forme de tâches rouges. Selon le nombre total de bandes à colorer, changer, dans les différents compartiments qui la contienne, la solution d'acide éthanoïque lorsque celle-ci, saturée en colorant, ne remplit plus correctement ses fonctions.
- Sortir la bande du dernier compartiment et la sécher entre deux feuilles de papier filtre.

6.4 Résultats attendus



Les différentes hémoglobines migrent à des vitesses différentes donc parcourent une distance différente sur un même temps.

6.5 Domaines variables

- Autres supports biologiques : utilisation possible d'autres hémoglobines provenant d'autres vertébrés.
- Autres paramètres expérimentaux : Une tension supérieure à 200 V permet d'augmenter la vitesse de migration (1 heure).

6.6 Trucs et astuces

- Ne pas toucher les bandes avec les doigts à aucune étape de leur manipulation. Dans le cas contraire, il apparaîtrait après coloration des tâches rouges à l'emplacement des empreintes de doigts.
- Si la solution d'hémoglobine est trop épaisse, rajouter un peu d'eau distillée et mélanger avec une spatule.
- Si le générateur disjoncte, retirer du tampon de chacun des compartiments.
- Vérifier le bon déroulement de votre électrophorèse : de la buée doit apparaître sur le couvercle dans les cinq premières minutes si le générateur et la cuve sont bien alimentés.
- Les bandes colorées peuvent être conservées, à température ambiante, pour une exploitation ultérieure entre deux feuilles de papier filtre mais doivent être mise sous presse pour le séchage. Dans le cas contraire la bande vrille et devient inutilisable, en particulier, pour une lecture par ESAO.

Si la migration des tâches n'est pas rectiligne, deux causes possibles :

- soit l'axe de la bande n'était pas perpendiculaire à l'axe du portoir.
- soit le dépôt n'a pas été fait perpendiculairement à l'axe de la bande.

7 Entretien

Il faut simplement veiller à bien rincer la cuve à l'eau distillée puis la sécher après usage.

Attention de ne pas détériorer les électrodes qui, très fines, demandent à être manipulées avec certaines précautions.

8 Service après-vente

La garantie est de 2 ans.

Pour tous réglages, contacter le **Support Technique** au **0 825 563 563**.

Le matériel doit être retourné dans nos ateliers et pour toutes les réparations ou pièces détachées, veuillez contacter :

JEULIN – S.A.V.
468 rue Jacques Monod
CS 21900
27019 EVREUX CEDEX France

0 825 563 563*
** 0,15 € TTC/min. à partir un téléphone fixe*

NOTES

TABLE OF CONTENTS

1 Introduction 20

2 Safety 20

3 Description and composition of the cell 20
3.1 The cell 20
3.2 The voltage applied. 21

4 Separation of DNA fragments by electrophoresis on agarose gel 21
4.1 Theoretical background. 21
4.2 Objectives and principles 21
4.3 Equipment and products required 22
4.4 Operating procedure 22
4.4.1 Preparation of solutions 23
4.4.2 Deposit of DNA: 24
4.4.3 Starting the electrophoresis and migration (about 1-1/2 hour): 24
4.4.4 Stopping the electrophoresis and staining (few hours): 24
4.5 Results and analyses: some approaches 25
4.6 Variable domains 25
4.7 Useful tips 25
4.8 Pedagogical and technical suggestions 26

5 Electrophoresis of rabbit serums immunised or not against an antigen 26
5.1 Objectives and principles 26
5.2 Equipment and products required 27
5.3 Operating procedure 27
5.3.1 Preparation of solutions and acetate strips 27
5.3.2 Installation of the cellulose acetate strips in the cell 28
5.3.3 Deposit of serum: 28
5.3.4 Starting of electrophoresis: 29
5.3.5 Stopping of electrophoresis (after one hour or 1 hour 30min) and staining of strips 29
5.4 Results expected 29
5.5 Useful tips 30
5.6 Pedagogical and technical suggestions 30

6 Comparative electrophoresis of vertebrate haemoglobins 30
6.1 Objectives and principles 30
6.2 Equipment and products required 31
6.3 Operating procedure 31
6.3.1 Preparation of solutions and acetate strips 31
6.3.2 Installation of the cellulose acetate strips in the cell: 32
6.3.3 Deposit of haemoglobins: 32
6.3.4 Starting the electrophoresis: 32
6.3.5 Stopping the electrophoresis (after one hour or 1 hour 30min) and staining of strips: 33
6.4 Results expected 33
6.5 Variable domains 33
6.6 Useful tips 34

7 Maintenance 34

8 After-Sales Service 34

1 Introduction

The design and the equipment it is fitted with allow this electrophoresis cell to be used in the study of migration of protein molecules and nucleotides. The proteins are separated on strips of cellulose acetate, the DNA fragments on agarose gel.

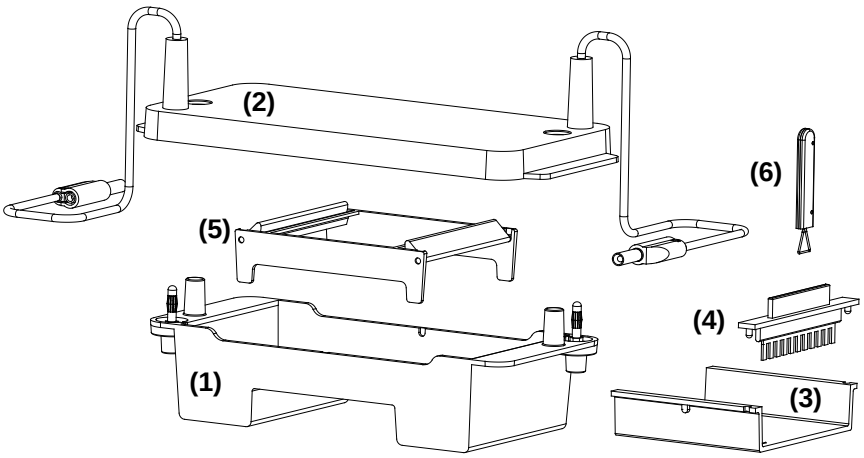
2 Safety

The electrophoresis uses high voltages and requires a foolproof safety system.
The cell has a mechanical safety device preventing access to the interior of the cell when it is powered on. The removal of the cover of the cell causes the immediate disconnection of the power supply to the electrodes.
In addition, the power supplies sold by Jeullin are all equipped with safety plugs.
However, the use of this type of technique requires certain precautions:

- Carry out all the operations relating to the transfer of liquids at locations away from the power supply. Avoid any projection of water on the power supply box.
- Optimise the usage of the length of supply cords of the cell by placing the cell's power supply as far away as possible, particularly when it is powered on.
- Wipe dry the external surface of the cell before connecting it to the power supply.
- Power on the equipment only when the connections are made, the cell is closed and all the precautions mentioned above are followed.

3 Description and composition of the cell

3.1 The cell



The electrophoresis cell is composed of the following elements:

- A cell bottom (1) divided into two compartments. Two electrodes emerge from each of the banana plugs and dip into the two compartments. Dimensions (L x w x h): 20 x 9 x 5 cm.
- A transparent cover (2) equipped with two cords.
- The cover can be removed by lifting its outer edges using the index finger while pressing the thumbs on the two vertical cylindrical lugs passing through the cover. This allows opening the cover without moving the cell or spilling the liquid it contains.
- The support (mould) of agarose gel (3). This accessory is placed in the central part of the cell. Two positioning lugs determine its exact position on the edges of the cell. Dimensions (L x w x h): 87 x 80 x 22 mm.
- A comb (4) having 11 teeth for creating the wells where the DNA samples are deposited. It is fitted on one of the ends of the support on the slots provided for this purpose.

- The support of strips (5) for the electrophoresis of proteins. This part is provided with a system of swivelling blocks attached to the support and its function is to maintain the ends of cellulose acetate strips in good contact with the buffer solution. Dimensions (L x w x h): 105 x 82 x 27 mm.
- A serum applicator (6). This tool allows depositing on the acetate strips very fine lines of serum compatible with obtaining, after migration and separation, the strips showing relatively clean borders. It also allows making deposits of constant volume.

3.2 The voltage applied.

Depending on the nature of molecules to be separated (DNA or proteins) and on the corresponding supports of migration (agarose gel or cellulose acetate), the voltage to be applied between the electrodes of the cell shall be as follows:

- 100 V for the electrophoresis of DNA fragments on the agarose gel.
- 160 V to 250 V for the separation of proteins.

The power supply Evolution 100/160 V Ref. 281 287 can supply the two voltages for these two types of experiments.

4 Separation of DNA fragments by electrophoresis on agarose gel

4.1 Theoretical background.

❖ **The principle of electrophoresis of DNA in gel.**

In a slightly basic medium, the DNA behaves like a polyanionic chain (ionised phosphate groups). Placed in the agarose gel and subjected to an electrical field, the DNA fragments of different sizes migrate more or less rapidly depending on their molecular weight. The relative charge of the fragments being the same, it is essentially the sieving effect exercised by the gel that influences the migration.

The rate of movement thus reduces with the size of fragments, this is expressed in number of pairs of bases (pb) or in Kb (1 Kb = 1000 pb).

❖ **The restriction fragments.**

The DNA used is the DNA of bacteriophage lambda digested by a restriction enzyme: (EcoRI or Hind III). This is a “small” DNA of 49 Kb whose “digestion” provides only very few restriction fragments, thus facilitating the reading of the gel.

Size (pb) of fragments obtained by digestion:

by Hind III:	23130	9416	6557	4361	2322	2027	564	125
by EcoRI:	21226	7421	5804	5643	4878	3530		

The DNA of the lambda phage digested by Hind III can be used as the reference DNA for determining the size of the restriction fragment (size marker).

4.2 Objectives and principles

Approach experimentally the technique of creating a Southern Blot:

- Breakdown of DNA by the restriction enzymes.
- Separation of fragments by electrophoresis.
- Non specific revelation of separated fragments.

4.3 Equipment and products required

Qty.	Designation	Reference
1	Power supply Evolution 70/140 V	**281 120**
1	DNA proteins electrophoresis cell	**591 031**
Consumables / reagents		
1	TBE Buffer	**105 173**
1	DNA of a phage digested by Hind III	**117 039**
1	DNA of a phase digested by EcoR1	**117 038**
1	Charge solution	**117 037**
1	Staining for the electrophoresis of DNA	**105 171**
1	Buffer pH 6.87	**107 195**
1	Buffer pH 9.18	**107 196**
1	Sodium ethanoate	**107 112**
1	Ethanoiac acid 80 %	**106 110**
Glassware		
1	Flask 1000 mL	**713 270**
1	Flask 250 mL	**713 268**
2	Funnel	**713 027**
1	Test tube 250 mL	**723 166**
1	Test tube 100 mL	**723 165**
1	Glass capsule	**713 201**
1	Conical flask of 250 mL with wide neck	**713 207**
1	Beaker 250 mL	**713 196**
2	Beaker 100 mL	**713 513**
1	Graduated pipette of 5 mL	**713 281**
1	Crystalliser 1.5 L	**713 497**
Other equipment		
1	Magnetic stirrer	**701 182**
1	Water-bath or microwave oven	
1	Balance sensitive to 1/100th	**701 243**
1	Automatic pipette	**703 397**
1	Cones for micropipette	**723 136**
1	Eppendorf tubes	**723 184**
1	Holder for Eppendorf	**701 153**
1	Spatula	**703 101**
1	pH tester	**701 217**
1	Turbulent straight coils 1 ring	**703 178**
1	Magnetic rod	**703 251**

4.4 Operating procedure

Preparation period: Preparation of the gel, pouring, mounting, migration, staining and stain removal: 16 hours.

Period of observation in class: few minutes.

4.4.1 Preparation of solutions

❖ **Preparation of buffer (about 1 hour):**

The volume of buffer solution necessary for the cell is about 300 mL.

- Pour the contents of a sachet of TBE (Triborate Ethylene Diamine buffer) into a graduated flask of 1 litre.
- Rinse the sachet with distilled water for recovering the traces of the buffer remaining in the sachet.

  or facilitating the dilution of TBE, pour the contents of the sachet little by little while stirring steadily.
- When the TBE buffer is completely dissolved in demineralised water, a dilution **by 10** is necessary for preparing the final solution.

  When the diluted solution is ready, ensure that the pH resulting is effectively comprised from 8.2 to 8.3 (Otherwise, adjust by adding HCl or NaOH).

❖ **Preparation and pouring of agarose gel for a cell (about 1 hour 15 minutes):**

- Pour 83 mL of final TBE buffer into a flask of 250 mL.
- Weigh 0.5 g of type II agarose in a capsule and sprinkle it into the TBE buffer.
- Place the conical flask containing the TBE and the agarose on a magnetic stirrer and heat with a coil till complete dissolution. Make sure that a constant stirring is maintained in order to allow the proper homogenisation of the product and to prevent the formation of bubbles in the gel.
- Wait for the solution to cool down (slight thickening) and prepare the support (pouring mould) as follows.
- Place two pieces of adhesive tape, one at each end of the gel support for closing it completely. Make sure that the adhesive used is sufficiently strong for preventing the loss of solution, particularly if the gel is too hot or too liquid.
  Position the comb on the support using the slots provided for this purpose.
  Place the moulding plate in a perfectly horizontal position.
  When the temperature of the solution reaches 50 °C, pour it slowly and at a constant rate at the centre of the moulding plate. Stop when the level reaches just below the junction teeth-rest of the comb. Then, allow the gel to set for 10 min at room temperature, then 10 to 15 min in the refrigerator. Then remove the comb by pulling it vertically: the wells appear. Remove the adhesive paper.

❖ **Preparation of the DNA:**

- Before the session, defreeze the DNA. Place the Eppendorf tube containing it about 5 minutes in hot water and then dip it in chilled water during two minutes. This allows, by thermal shocks, to separate the fragments that may have associated again and in addition, prevent any new formation of adhering ends.
- In another Eppendorf tube, dilute the mother solution of DNA in order to obtain 80 µL of a solution with concentration equal to 0.07 µg of DNA per µL.
  Use the following chemical formula: C1xV1 = C2xV2: C1 represents the concentration in µg of
  DNA per mL given by the supplier: C2 represents the concentration to be obtained, that is, 0.07 µg / µL: V2 represents the final volume of the solution, that is 80 µL: V1 represents the volume of DNA to be sampled in µL.
  The sample is collected by an automatic pipette.
  The volume is adjusted to 80 µL by adding distilled water. There is then 5.6 µg of DNA in the Eppendorf tube.
  NOTE: The unused DNA should be returned as quickly as possible to -15 °C (even if it is a densified sample).
  The product easily supports a series of several alternate freezing-defreezing cycles without losing its properties. However the period of defreezing should be reduced to the minimum because an occasional degradation by micro organisms is possible.

- Then prepare the densification of the DNA: To the DNA prepared previously, add a charge solution for densifying the sample and allowing its deposit in the wells of immersed gel. In addition, this solution contains an indicator of migration, the bromophenol blue (BBP) that migrates at a rate almost same as a fragment of double strand DNA of 300 pairs of bases (pb), faster than all the restriction fragments (except one) involved in this experiment.
  Respect the following proportions: 1 volume (20 µL) of charge solution for 4 volumes (80 µL) of the DNA solution. Automatic pipette is used for sampling. Mix well before use.

4.4.2 Deposit of DNA:

Using the automatic pipette, deposit 6 µL of DNA in each well or in one well out of two taking care that the well does not overflow. Avoid piercing the bottom of wells.

4.4.3 Starting the electrophoresis and migration (about 1-1/2 hour):

- Place the gel support in the cell, the wells should be on the side of the cathode (negative terminal).
- Fill each compartment of the cell with the final TBE buffer. The buffer is in contact with the gel up to 2/3 of its height but does not cover it in any case. A too high level of buffer can generate an intensity higher than the limits authorised by the power supply which will trip in this case.
- Close the cell by means of its cover.
- Respect the correspondence of colours between the cords of the cell and the power supply plugs.
- Set the voltage of the power supply to 100 V.
- Connect the equipment to the mains.
- Turn on the power supply. The migration starts.

  Check the correct progress of your electrophoresis: A mist must appear on the cover during the first five minutes if the generator and the cell are properly supplied.
- For stopping the migration, turn off the power, disconnect the cell and the mains cord.

  If the power supply trips, remove some of the buffer solution.

  The tripping may be due to a too high conductivity of the solution, triggering the short-circuit protection. Refer to the instructions of the power supply for re-establishing the voltage.

4.4.4 Stopping the electrophoresis and staining (few hours):

- During the migration, prepare 125 mL of sodium ethanoate 0.5 M (that is 5.12 g of sodium ethanoate for 125 mL of distilled water).
- Calibrate the pH-meter with two solutions of known pH: for example 6.87 and 9.18.

  Adjust the pH of 125 mL of sodium ethanoate solution to 5.2 by progressively adding 80% ethanoiac acid.

  Measure the pH using the pHmeter.
- Prepare a 0.1 % (0.1 g for 100 mL) staining solution for electrophoresis. Dissolve the stain in the ethanoiac acid – sodium ethanoate buffer solution at pH 5.2.
- Stop the electrophoresis when the BBP (Bromophenol Blue) indicator of migration has crossed at least a distance equivalent to 2/3rd of the gel. The cover can be removed by lifting its outer edges with the index finger while keeping the thumbs pressed on the two vertical cylindrical lugs passing through the cover and located at the two ends of the cell.
- Measure the distance travelled by the BBP (for future use in the class by the students).
- Remove the gel support (with its gel) from the cell and deposit it in a crystalliser.
- Cover with the stain and wait 5 minutes at ambient temperature.
- Drain the stain (it can be reused).

- Wash the gel remaining in the crystalliser with distilled water for removing the surplus stain.
- Remove the support from the crystalliser.
- Remove the stain from the gel by repeated washing in distilled water until the bands of DNA appear (several hours).

  The bands of DNA remain well stained and we can clearly distinguish them.

4.5 Results and analyses: some approaches

The two restriction enzymes split the DNA into a variable number of fragments visible in the form of bands whose thickness and the distance of migration depend on their weight in pairs of bases.

- Study the mode of action of restriction enzymes by the analysis of the electrophoretic pattern.
  Explain that the rate of migration here depends on the size of fragments by observing that the bands are more stained and thicker when they are closer to the wells. In fact, we can consider that the number of fragments at the level of each band is the same. It is therefore the molecular weight of these fragments that varies.
- Determine the size of a restriction fragment. For this, we must use the DNA of the lambda phage split by Hind III as a size marker (calibration) and propose the determination of the size of a DNA fragment split by Eco RI.
  We consider that under the usual conditions and within certain limits, the log decimal of the size (in pb) of a fragment is inversely proportional to the distance of migration. It is therefore sufficient, from a gel (or from a digitised photo), to measure the distance of migration of each band of the standard DNA. Knowing the size of fragment (indicated elsewhere), we can plot the calibration curve log (T) = f (d) with T= size in pb and d = distance travelled in mm. For determining the size of an unknown fragment, here the DNA split by Eco RI, we must measure d and find T on the calibration curve (linear part of the curve).
  Note: We can plot the curve Log (T) = f (Rf) with
  Rf = distance travelled by the band / distance travelled by the BBP, but we must then measure the migration of BBP before staining.
- Draw the attention of students on the efficacy of the method by the evaluation of microquantities of DNA used and revealed.
- Prepare the operations that complete the electrophoresis during the preparation of a Southern Blot, for example, as part of a pre-natal diagnosis.

4.6 Variable domains

It is possible to use other restriction enzymes.

4.7 Useful tips

- Do not pour the gel at a too high temperature; wait for it to cool down. (You have to hold the conical flask in your hand without getting burnt)
- Do not use very strong traditional adhesive, you will have difficulties removing it and you may damage the gel.
- Check the concentration of DNA indicated by the supplier before carrying out the dilutions.
- You can view the migration by observing the movement of BBP to the anode. For this, the stains must have left the wells of the deposit.
- The preparation time of the experiment being long, it is possible to prepare some of the operations in advance. The stained gel can be preserved for at least one week at 4 °C in a crystalliser filled with distilled water.

- Avoid the presence of air bubbles in the gel: they disturb the separation of bands, the medium not being homogenous. For this, at the time of moulding the gel, pour the agarose solution gently and progressively in the mould and during the dissolution of the agarose powder, adjust the speed of the magnetic stirrer so that air bubbles are not introduced into the solution.
- If the generator trips: this is a short circuit due to an excess of buffer solution. Remove using a pipette, a small equal volume of buffer from each cell and restart the protocol for initiating the electrophoresis.
- Absence of migration of BBP after 15 minutes:
  If the generator has not tripped, this is due to a lack of buffer in one or two compartments of the cell.
  Stop the generator, then using a pipette, add some buffer as required in the compartment.
  Restart the protocol for initiating the electrophoresis.
- Non rectilinear movement of the strips:

  This problem does not affect the viewing of electrophoresis but it may handicap the interpretation.

4.8 Pedagogical and technical suggestions

This experiment is interesting in the teaching of specialised biology courses when studying the technological revolution of the early 70's and in particular, the use of restriction enzymes.

The comparison of electrophoreses of the same DNA from phage treated with two different restriction enzymes allows creating awareness of the specificity of these enzymes.

This experiment also creates awareness of the differential migration of DNA fragments according to their size and this is essential for understanding the Southern Blot method used, for example, in the study of a pre-natal diagnosis.

The discussion on the limits of the technique used for revealing the DNA allows studying the problem of the revelation of a particular fragment of DNA and thus introduces a technique of DNA denaturation associated with the use of a specific probe.

5 Electrophoresis of rabbit serums immunised or not against an antigen

5.1 Objectives and principles

- Demonstration of the continuing presence of immunoglobulin in an organism using a blood proteins separation method.
- Introduction to the notion of immune phenotype.
- Variation of the immune prototype after an immunisation.

5.2 Equipment and products required

Qty.	Designation	Reference
Basic equipment		
1	Power supply Evolution 70/140V	**281 120**
1	DNA /Proteins electrophoresis cell	**591 031**
Consumables / reagents		
1	Buffer for protein electrophoresis	**107 263**
1	Ponceau red stain (250 mL)	**106 135**
1	Cellulose acetate strips (100)	**105 042**
1	Rabbit serum	**117 027**
1	Ethanoiac acid crystallisable	**106 002**
1	Diacetone alcohol (1L)	**102 068**
1	Methanol (1L)	**102 134**
1	Filter paper	**703 082**
Glassware		
1	Graduated flask of 1000 mL	**713 270**
1	Graduated flask of 100 mL	**713 267**
1	Funnel	**713 027**
1	Glass capsule	**713 201**
1	Graduated pipette of 5 mL	**713 281**
Other equipment		
1	Flat clips	**564 026**
1	Dumont clips	**564 062**

5.3 Operating procedure

Preparation period: 30 minutes.

Period of observation in class: 1 hour 30 minutes.

5.3.1 Preparation of solutions and acetate strips

❖ **Buffer solution:**

Pour the contents of the flask of buffer solution for electrophoresis of proteins in a graduated flask of one litre. Rinse the flask of buffer solution one or two times with distilled water in order to recover all the products in the graduated flask, then complete its volume to 1 litre with distilled water.

❖ **Cellulose acetate strips:**

The cellulose acetate strips are preserved in methanol. Replace this preserving agent with the buffer solution so that the migration of proteins is possible in an electrical field.

- Fill with the buffer solution as many compartments of the staining tank as there are cellulose acetate strips necessary for your set of experiments.
  Remove from the packet the number of strips necessary for the experiment. They are placed between two protective blades in translucent plastic and preserved in 35% methanol.
- Remove a plastic blade and take one by one the number of strips necessary using a Dumont clip. The dimensions of the serum applicator allow two deposits per strip.
  Place one strip per compartment and soak 10 to 15 minutes in the buffer for impregnating it and eliminating the methanol.

❖ **Ponceau red:**

The solution Ref. 106 135 is delivered ready to use.
Using the pigment in powder (prepare the solution according to the following composition:

- Ponceau red 1.25 g
- Trichloroacetic acid 11.8 g
- Distilled water q.s.p. 100 mL

Mix well.
Filter for eliminating the undissolved pigment.
Preserve preferably in refrigerator sheltered from light.

Attention:
The Ponceau red is a specific stain for proteins that has a very high affinity for them. In contact with your fingers, it can stain them indelible until the cells of your skin are replaced. Use low glass beakers and gloves.

❖ **Stain removing solution** (to be prepared on the spot):

prepare a 5 % solution of acetic acid in water: 50 mL of acid + 900 mL H_2O.

❖ **Transparisation solution** (to be prepared on the spot):

Composition:

- Methanol 75 mL
- Acetic acid (crystallisable) 20 mL
- Diacetone alcohol 5 mL

Note: The transparisation solution is used for making the strips transparent after treatment. This operation is not necessary for the determination of the electrophoregram pattern using the electrophoresis reading adapter that can handle the white band.

❖ **Preparation of serum:**

Reconstitute the rabbit serum by adding 5 mL of distilled water to the contents of the flask. Wait for the complete stabilisation and shake the flask for homogenising its contents. The serum thus prepared can be kept in the refrigerator only for 3 or 4 days.

5.3.2 Installation of the cellulose acetate strips in the cell

A cell can accept a maximum of three strips.

- Fill each compartment of the cell with buffer solution for electrophoresis of proteins, avoiding any overflowing. Provide 100 mL of solution per cell.
- Remove the strips from the staining dishes using the flat clips. Place them between two sheets of filter paper and dry them with a rapid movement of the hand.
- Separate the supporting blocks of the strips by turning them.
- Place the strips on the supports, the cut corner in the bottom right (thus the strip shows its matt face that is absorbent on the top). Push in each end of each strip between the blocks and their supports.
- Fold back the blocks. Pull the strips slightly by their free ends using the flat clips so that they are stretched tight.
- The strips should be parallel to one another and perpendicular to the axis of the holder in order to allow a migration of the proteins in the axis of the strip.
- Place the support in the chamber and verify that the ends of each strip dip in the buffer solution of each of the two compartments.

5.3.3 Deposit of serum:

Pour a few drops from the flask of rabbit serum into the glass capsule.

Using the applicator, collect (simple dipping), the serum is deposited rapidly on the strip, a few millimetre or about one centimetre above the top edge of the block on the cathode side (black terminal) and perpendicular to the axis of the strip.

It is possible to make two deposits side by side on the same strip.

5.3.4 Starting of electrophoresis:

- Close the cell by means of its cover.
- Connect the cell to the generator by means of the cord.

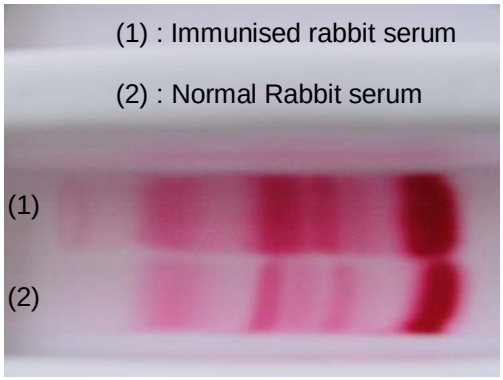
Respect the correspondence of covers between the cords and sockets.

- Set the voltage of the power supply to 160 V.
- Connect the equipment to the mains.
- For stopping the migration, turn off the power.

5.3.5 Stopping of electrophoresis (after one hour or 1 hour 30min) and staining of strips

- During the migration, fill the first compartment of the staining dish with Ponceau red.
- Fill at least three compartments with the stain removing solution composed of 5 % ethanoiac acid (5 mL of ethanoiac acid in 100 mL of distilled water). For obtaining the final transparent strips, also reserve a compartment for the transparisation solution.
- Stop the electrophoresis. The period of migration depends on the time available for the experiment. Allow at least one hour, considering that the distance of migration depends on the period and the intensity of the voltage applied (Faster migration at 225V than at 160V).
- Disconnect the cords connected to the cell and remove the cover. The cover can be removed by lifting its outer edges using the index finger while pressing the thumbs on the two vertical cylindrical lugs passing through the cover and located to the two ends of the cell.
- Remove the support of the cell, turn the blocks for releasing the strips.
- Take each strip with a flat clip for the staining.
- Immerse the first strip in the compartment containing the Ponceau red.
  Allow it to stain during about 1 minute. Then, dip it in successive baths of 5 % ethanoiac. Change the compartment when the ethanoiac solution is saturated with Ponceau red. In the last compartment of 5 % ethanoiac acid, the base of the strip should have turned white again. Only the proteins appear in the form of red stains. Depending on the number of strips to be stained, change, in the different compartments containing it, the ethanoiac solution when it becomes too saturated with the stain for correctly performing its functions.
- Immerse the strips in the transparisation solution, then remove them as soon as they become translucent. Remove the strip from the last compartment and dry it between two sheets of filter paper.

5.4 Results expected



The different proteins composing the serum are visible in the form of red bands separated from one another.

We can see the bands that are red from + to– in the order of proteins moving the farthest to those moving the least. TISELIUS (Nobel price for its discovery) has given their names to the proteins:

- Albumin.
- α_1 and α_2 globulins
- β_1 and β_2 globulins
- γ globulins

You can make a control of migration using the rabbit albumin.

You can compare this electrophoresis of non immunised rabbit serum with that of an immunised rabbit serum.

5.5 Useful tips

- Never touch the strips with the fingers during any stage of their handling. Otherwise, red stains will appear where the fingers have touched the strips.
- Check the correct progress of your electrophoresis: A mist should appear on the cover within the first 5 minutes if the generator and the cell are correctly supplied.
- The stained strips can be preserved for a future use between two sheets of filter paper but should be pressed for drying them. Otherwise, the strip gets wrinkled and cannot be used, particularly for an ESAO reading.
  Another solution is to attach each strip to a holder and allow it to dry in open air. The strips can be thus preserved in excellent conditions, at ambient temperature during several years.
- If the migration is not rectilinear: the axis of the strip is not perpendicular to the axis of the holder or the deposit is not perpendicular to the axis of the strip.

5.6 Pedagogical and technical suggestions

This analysis of blood proteins associated with the Outcherlony reaction provides the scientific bases necessary for the interpretation of seropositivity tests in the case of AIDS (ELISA or Western Blot test).
You can read your electrophoresis by *ESAO* using the software *Phoresis* and the *electrophoresis reading adapter*.

6 Comparative electrophoresis of vertebrate haemoglobins

6.1 Objectives and principles

Comparison of the rate of migration of haemoglobin from different vertebrates (homologues molecules). This comparison allows demonstrating the primary and tertiary structural difference in vertebrate haemoglobins.
After a primary approach for establishing the relationships between vertebrates by anatomic studies, this experiment can allow a practical comparison of molecules with the help of software.

6.2 Equipment and products required

Qty.	Designation	Reference
Basic equipment		
1	Power supply Evolution 70/140 V	**281 120**
1	DNA /Proteins electrophoresis cell	**591 031**
Consumables / reagents		
1	Barbital buffer	**105 230**
1	Ponceau red staining (250 mL)	**106 135**
1	Cellulose acetate strips (100)	**105 042**
1	Fresh mackerel	
1	Ethanoiac acid crystallisable	**106 002**
1	Filter paper	**703 082**
Glassware		
1	Graduated flask of 1000 mL	**713 270**
1	Graduated flask of 500 mL	**713 269**
1	Graduated flask of 250 mL	**713 268**
1	Funnel	**713 027**
1	Glass capsule	**713 201**
1	Graduated pipette of 5 mL	**713 281**
Other equipment		
1	Flat clips	**564 026**
1	Dumont clips	**564 062**
1	Spatula	**703 101**
1	Electronic balance 0.1 g	**701 244**
1	Straight coil	**703 178**
1	Magnetic stirrer	**701 182**
1	Syringe of 5 mL	

6.3 Operating procedure

Preparation period: 1 h 30.

Period of observation in class: 1 h 30.

6.3.1 Preparation of solutions and acetate strips

- **Buffer:**

  The final volume of the barbital buffer for haemoglobin is 750 mL.

  Pour the contents of the barbital buffer flask into a graduated flask of 500 mL. Wash the flask of buffer once or twice with distilled water in order to recover all the products in the graduated flask. Complete its volume to 500 mL with distilled water. Mix well. Fill a graduated flask of 250 mL with distilled water up to the line of the gauge. Transfer the contents of the 500 mL into a one litre flask and rinse the flask of 500 mL with 250 mL of distilled water in order to recover all the buffer solution.

- **Cellulose acetate strips:**

  The cellulose acetate strips are preserved in methanol. Replace this preserving agent with the buffer solution so that the migration of proteins is possible in an electrical field.

  Fill with the buffer solution as many compartments of the staining tank as there are cellulose acetate strips necessary for your set of experiments.

  Remove from the packet the number of strips necessary for the experiment. It is possible to make two deposits side by side on the same strip.

  The strips are placed between two protective bands in translucent plastic and preserved in 35 % methanol.

  Remove a plastic blade and take one by one the number of strips necessary using a Dumont clip.

Place one strip per compartment and soak 10 to 15 minutes in the buffer for impregnating it and eliminating the methanol.

❖ **Haemoglobins:**

Depending on the number of deposits required, weigh the quantity of haemoglobin necessary for preparing a solution with 0.15 g/L of haemoglobin. Pour, for example, 0.15 g into 1mL of distilled water placed in the bottom of a glass capsule (one capsule for each type of haemoglobin).

Wait for the reconstitution of the haemoglobin without mixing. Proceed in the same day for the haemoglobin of bird.

For the haemoglobin of fish, we recommend the fresh mackerel. Using a 5 mL syringe, collect the blood at the level of the anterior part of the gill covers while pressing on the gills Empty the blood from the syringe into a capsule without diluting.

6.3.2 Installation of the cellulose acetate strips in the cell:

A cell can accept a maximum of three strips.

- Fill each compartment of the cell with the barbital buffer avoiding any overflowing. Provide 100 mL of solution per cell.
- Remove the strips from the staining dishes using the flat clips. Place them between two sheets of filter paper and dry them with a rapid movement of the hand.
- Separate the supporting blocks of the strips by turning them.
- Place the strips on the supports, the cut corner in the bottom right (thus the strip shows its matt face that is absorbent on the top). Push in each end of each strip between the blocks and their support.
- Fold back the blocks. Pull the strips slightly by their free ends using the flat clips so that they are stretched tight.
- The strips should be parallel to one another and perpendicular to the axis of the holder in order to allow a migration of the proteins in the axis of the strip.
- Place the support in the cell and verify that the ends of each strip dip in the buffer solution of each of two compartments.

6.3.3 Deposit of haemoglobins:

Using the applicator, collect (by simple dipping) a haemoglobin and deposit rapidly on the strip, a few millimetre or about one centimetre above the top edge of the block on the cathode side (black terminal) and perpendicular to the axis of the strip.

It is possible to make two deposits side by side on the same strip.

You can thus deposit on the same strip a second haemoglobin of another vertebrate after cleaning the applicator thoroughly.

For making a comparison between the three vertebrates, three strips each with two different haemoglobins, are necessary.

6.3.4 Starting the electrophoresis:

- Close the cell by means of its cover.
- Connect the cell to the generator by means of the cord.

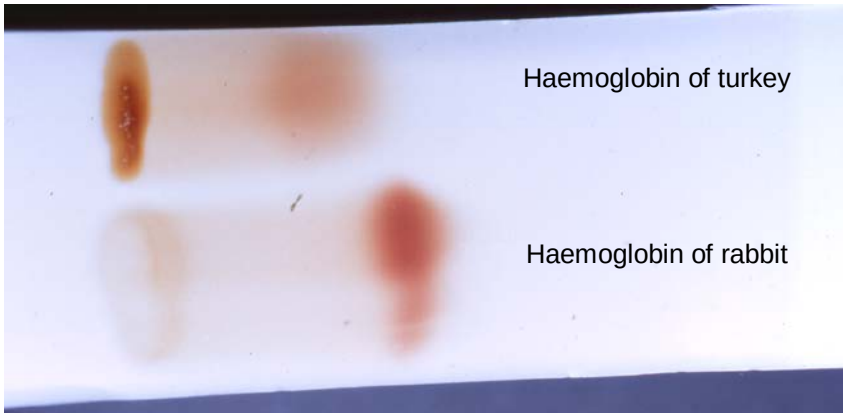
Respect the correspondence of covers between the cords and sockets.

- Set the voltage of the power supply to 160 V.
- Connect the equipment to the mains.
- For starting up the migration, turn on the power.

6.3.5 Stopping the electrophoresis (after one hour or 1 hour 30min) and staining of strips:

- During the migration, fill the first compartment of the staining dish with Ponceau red.
- Fill the remaining compartments of the staining dish with 5 % ethanoiac acid (5 mL of ethanoiac acid in 100 mL of distilled water).
- Stop the electrophoresis. The period of migration depends on the time available for the experiment. Allow at least one hour, considering that the distance of migration depends on the period and the intensity of the voltage applied (Faster migration at 225 V than at 160 V).
- Disconnect the cords connected to the cell and remove the cover. The cover can be removed by lifting its outer edges using the index finger while pressing the thumbs on the two vertical cylindrical lugs passing through the cover and located to the two ends of the cell.
- Remove the support of the cell, turn the blocks for releasing the strips.
- Take each strip with a flat clip for staining it.
  You can make a direct observation of the migration for comparing the distances travelled.
  The staining of bands is optional but if you can postpone the observation, the haemoglobin stains fade rapidly over a time.
- Immerse the first strip in the compartment containing the Ponceau red (for preparation, refer chapter 5.3.1.).
  Allow the strip to stain during about 1 minute.
- Then dip the strip in successive baths of 5 % ethanoiac acid. The strip is changed from the compartment when the ethanoiac acid solution is saturated with Ponceau red. In the last compartment of 5 % ethanoiac acid, the base of the strip should have turned wide again only the proteins appear in the form of red stains.
  Depending on the number of strips to be stained, change, in the different compartments containing it, the ethanoiac solution when it becomes too saturated with the stain for correctly performing its functions.
- Remove the strip from the last compartment and dry it between two sheets of filter paper.

6.4 Results expected



The different haemoglobins migrate at different rate, therefore travel a different distance over the same time.

6.5 Variable domains

- Other biological supports: It is possible to use other haemoglobins from different vertebrates.
- Other experimental parameters: A higher voltage of 200 V allows increasing the migration rate (1 hour).

6.6 Useful tips

- Never touch the strips with the fingers during any stage of their handling. Otherwise, red stains will appear where the fingers have touched the strips.
- If the haemoglobin solution is too thick, add a little distilled water and mix with a spatula.
- If the generator trips, remove some buffer from each compartment.
- Check the correct progress of your electrophoresis: A mist must appear on the cover during the first five minutes if the generator and the cell are properly supplied.
- The stained strips can be preserved for a future use between two sheets of filter paper but should be pressed for drying them. Otherwise, the strip gets wrinkled and cannot be used, particularly for an ESAO reading.
- If the migration is not rectilinear, two causes are possible:
- The axis of the strip is not perpendicular to the axis of the holder.
- Or the deposit is not perpendicular to the axis of the strip.

7 Maintenance

Simply take care to rinse the chamber with distilled water and dry it after each use.

Take care not to damage the electrodes that are very fine and have to be handled with care.

8 After-Sales Service

This material is under a two year warranty and should be returned to our stores in the event of any defects.

For any repairs, adjustments or spare parts, please contact:

JEULIN - TECHNICAL SUPPORT
468 Rue Jacques Monod
CS 21900
27019 EVREUX CEDEX France

+33 (0)2 32 29 40 50

NOTES

Assistance technique en direct

Une équipe d'experts
à votre disposition
du lundi au vendredi
de 8h30 à 17h30

- Vous recherchez une information technique ?
- Vous souhaitez un conseil d'utilisation ?
- Vous avez besoin d'un diagnostic urgent ?

Nous prenons en charge immédiatement votre appel pour vous apporter une réponse adaptée à votre domaine d'expérimentation :
Sciences de la Vie et de la Terre, Physique, Chimie, Technologie.

Service gratuit*

0 825 563 563 choix n°3**

** Hors coût d'appel. 0,15 € TTC/min à partir d'un poste fixe.*
*** Numéro valable uniquement pour la France métropolitaine et la Corse. Pour les DOM-TOM et les EFE, composez le +33 2 32 29 40 50.*

Aide en ligne

FAQ.jeulin.fr

Direct connection for technical support

A team of experts
at your disposal
from Monday to Friday
(opening hours)

- You're looking for technical information ?
- You wish advice for use ?
- You need an urgent diagnosis ?

We take in charge your request immediatly to provide you with the right answers regarding your activity field : Biology, Physics, Chemistry, Technology.

Free service*

+33 2 32 29 40 50**

** Call cost not included.*
*** Only for call from foreign countries.*

JEULIN
Partageons l'expérience

468, rue Jacques-Monod, CS 21900, 27019 Evreux cedex, France
Métropole • Tél : 02 32 29 40 00 - Fax : 02 32 29 43 99 - www.jeulin.fr - support@jeulin.fr
International • Tél : +33 2 32 29 40 23 - Fax : +33 2 32 29 43 24 - www.jeulin.com - export@jeulin.fr
SAS au capital de 1 000 000 € - TVA intracommunautaire FR47 344 652 490 - Siren 344 652 490 RCS Evreux