

Protocole

1. Préparation de l'échantillon pour l'expression in vitro (10')



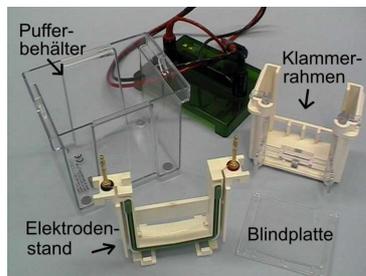
- 1.1 Dans votre tube rouge n°1 contenant déjà 12 µl de lysat de *E.coli*, pipeter :
 - 10 µl de mélange réactionnel (tube 2 vert)
 - 12 µl d'acides aminés (tube 3 bleu)
 - 1 µl de méthionine (tube 4 jaune)
 - 5 µl de tampon (tube 5 rose)
 - 10 µl de vecteur GFP (tube 6 transparent)
- 1.2 Incuber votre mélange pendant 120 minutes dans un bain thermostaté à 30°C.

2. Préparation des plaques de gel

- 2.1 Ouvrir l'emballage du gel PAGE en coupant le long de la ligne noire et prendre la plaque de gel.
- 2.2 Couper avec un scalpel (ou une lame de rasoir), la bande de la plaque de gel le long de la ligne marquée, et retirer cette bande inférieure.

3. Préparation de la cuve d'électrophorèse

- 3.1 Mettre la plaque de gel, avec la petite face vers l'intérieur, dans le support à électrodes. Ajouter de l'autre côté une autre plaque de gel ou une plaque neutre.
- 3.2 Placer le support à électrodes dans la structure d'assemblage et fermer les attaches.
- 3.3 Mettre l'ensemble structure d'assemblage et support à électrodes dans la cuve de tampon.
- 3.4 Retirer le peigne.



4. Remplissage de la cuve

- 4.1 Remplir le compartiment électrodes avec 140 ml de tampon TGS.
- 4.2 Remplir la cuve avec 200 ml de tampon TGS.

5. Préparation des échantillons (10')

- 5.1 Annoter un nouveau tube.
- 5.2 Deux heures après le début de l'expression in vitro, transférer 20 µl du mélange réactionnel du tube rouge dans le tube annoté.

- 5.3 Ajouter 20 µl de tampon Laemmli du tube 8 et mélanger par retournement.

6. Remplissage des puits du gel

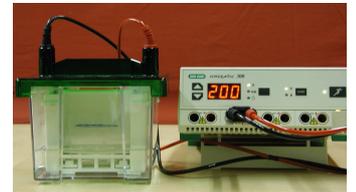
(2 groupes de travail utilisent un même gel; les puits droits et gauches restent vides!)

- 6.1 Remplir les puits du gel avec:

- 10µl de protéines étalons Kaléidoscope
- 10µl d'échantillon du groupe 1
- 10µl d'échantillon du groupe 2
- 10µl de protéines étalons Kaléidoscope

7. Réalisation de l'électrophorèse

- 7.1 Fermer la cuve et commencer l'électrophorèse à 200V.
- 7.2 Arrêter l'électrophorèse quand le bleu de bromophénol a atteint l'extrémité inférieure du gel. (environ 25 min.)



8. Récupération du gel

- 8.1 Enlever la structure d'assemblage et vider la cuve de solution tampon. Vous pouvez réutiliser la solution tampon !
- 8.2 Prendre la plaque de gel et la poser avec la petite face au dessus.
- 8.3 Couper la bande de la plaque de gel le long de la ligne blanche.
- 8.4 Retirer la face supérieure de la plaque de gel.
- 8.5 Retirer le gel qui est collé à la plaque, sous l'eau, dans un bac en plastique.
- 8.6 Enlever l'eau du bac en plastique.



9. Analyse du gel

- 9.1 Vérifier la présence de la protéine fluorescente verte sous la lampe UV.
- 9.2 Déterminer la masse moléculaire avec la courbe d'étalonnage.

Données: Masses moléculaires des protéines étalons Kaléidoscope.

Myosine	bleue	201.090 Da	
β-Galactosidase	magenta	133.730 Da	
Albumine bovine	verte	83.559 Da	
Anhydrase carbonique	violette	39.559 Da	
Inhibiteur trypsique de soja	orange	31.405 Da	
Lysozyme	rouge	17.408 Da	
Aprotinine	bleue	7.081 Da	