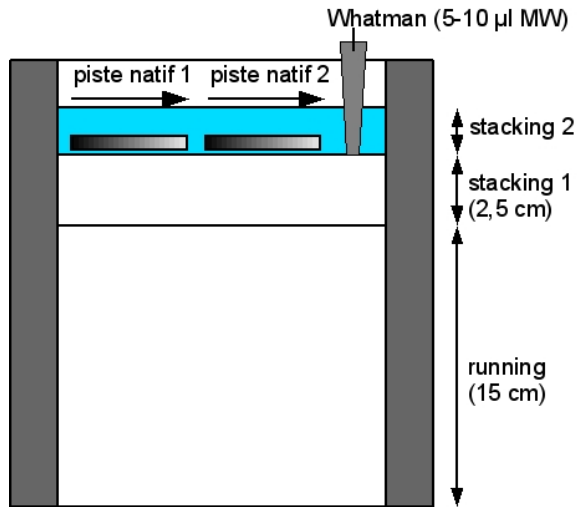


# Séparation de protéines dans une deuxième dimension SDS-page : Tricine-SDS-PAGE (Schägger et von Jagow, 1987, Schägger 2006)

Dans les expériences d'électrophorèse 2D (Natif/dénaturant), le système Tricine-SDS PAGE est mieux adapté que le système plus classique Glycine-SDS-page (Laemmli, 1970).



Réaliser la première séparation en gel natif en système MiniProtean (Biorad, 1 mm) permet de faire migrer en parallèle deux pistes sur la même 2D (comparaison de deux conditions sur une même 2D, gain de temps et de travail).

1. piste de gel natif découpée et incubée en présence de SDS 2% +  $\beta$ -mercaptoethanol 1% + inhibiteurs proteases si nécessaire
2. montage avec les pistes de la 1D coincées entre les plaques de 2D, à 17,5 cm du bas.
3. Couler le gel de séparation, ajouter un peu d'eau pour une bonne polymérisation
4. Couler le stacking 1, jusqu'au bas des pistes de 1D
5. Couler le stacking 2, en engluant les pistes 1D et le papier whatman imbibé de MM

	<i>séparation</i>			<i>séparation</i>
	<i>T% = 14</i>	<i>T% = 12</i>	<i>T%=8</i>	<i>why not a gradient ?</i>
<i>glycerol (g)</i>	4	4	4	without glycerol thus !!
<i>H<sub>2</sub>O mQ (ml)</i>	4,1	5,8	9,5	
<i>AB-mix (ml)</i>	12,7	11	7,3	
<i>tampon 3X (ml)</i>	10	10	10	
<i>Vf (ml)</i>	30	30	30	
<i>APS 10 % (µl)</i>	150	150	150	
<i>TEMED (µl)</i>	15	15	15	

Attention au glycérol : bien mélanger.

	<i>stacking 1</i>	<i>stacking 2</i>
	<i>T%=6</i>	<i>T%=6</i>
<i>glycerol (g)</i>		1
<i>H<sub>2</sub>O mQ (ml)</i>	4,9	3,9
<i>AB-mix (ml)</i>	1,82	1,82
<i>tampon 3X (ml)</i>	3,3 (3X SDS-page)	3,3 (3X native page)

<b>SDS 10 %</b>	/	0,4 ml
<b>G250 5%</b>	/	5 $\mu$ l
<b>Vf (ml)</b>	10	10
<b>APS 10 % (<math>\mu</math>l)</b>	75	75
<b>TEMED (<math>\mu</math>l)</b>	10	10

tampon (3X) SDS-page : Tris 3M, SDS 0,3 %, pH 8,45  
pour 250 ml final : 90,8 g de Tris + 7,5 ml de SDS 10%. Ajuster le pH avec HCl

AB-mix (T% = 33, C% = 3) : **NEUROTOXIQUE**. acrylamide 32 %, bis-acrylamide 1 %  
Vf = 100 ml; 50 ml Bis-acrylamide 2 % (solution commerciale, placard BM) + acrylamide 32 g.

tampon anode : Tris 0,2 M, pH 8,9. Soit, pour 1 l, 24,2 g de Tris, ajuster à pH 8,9 avec HCl 6M

tampon cathode : SDS 0,1 %, Tricine 0,1 M, Tris 0,1 M, pH 8,1~8,2. Soit, pour 1 litre, 10 ml de SDS 10 %, 12,1 g de Tris et 17,9 g de tricine. Pas besoin d'ajuster le pH.

Migration : pour 2 gels de 1 mm à T%=12, prévoir ~ 30 mA constant de 18 h à 8 h le lendemain. Ajuster en fonction du timing, du T% et du nombre de gel...