

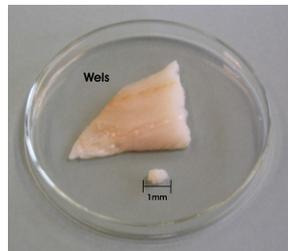
Procédure SDS-PAGE

1. Préparation de l'échantillon (8')

- 1.1 Annoter le bouchon des microtubes de 1,5 ml avec le nom des échantillons de poissons.
- 1.2 Ajouter 250 µl de tampon Laemmli dans chaque tube annoté.

2. Extraction des protéines (10')

Pour chaque échantillon, prélever 1g de muscle du poisson, et le transférer dans le microtube annoté correspondant.



- 2.2 Mélanger brièvement le tube au Vortex, puis incuber les échantillons pendant 5 minutes à température ambiante.
- 2.3 Transférer 18 µl de la solution tampon contenant l'extrait protéique dans un tube avec bouchon à vis annoté.

Ne pas pipeter un morceau de poisson !

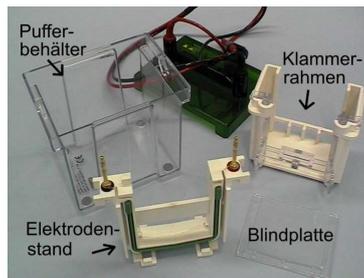
- 2.4 Chauffer les échantillons de poisson et d'actine-myosine pendant 5 min à 95°C.

3. Préparation des gels d'électrophorèse (5')

- 3.1 Couper le long de la ligne et sortir la plaque de gel.
- 3.2 Couper le film adhésif de la plaque de gel le long de la ligne marquée, avec une lame de rasoir ou un scalpel, et enlever la bande inférieure.

4. Préparation de la cuve d'électrophorèse (3')

- 4.1 Mettre la plaque de gel dans le support à électrodes, avec la plus petite face vers l'intérieur. Fermer l'autre côté du compartiment à l'aide d'une plaque de séparation ou d'une autre plaque de gel.
- 4.2 Appuyer sur le support à électrodes pour fermer les deux leviers de la structure d'assemblage.
- 4.3 Placer l'ensemble du compartiment intérieur dans la mini-cuve.
- 4.4 Retirer le peigne.



5. Remplissage de la cuve avec le tampon (3')

- 5.1 Remplir le compartiment intérieur avec 140 ml du tampon d'électrophorèse TGS.
- 5.2 Remplir la mini-cuve avec 200 ml du tampon d'électrophorèse TGS.

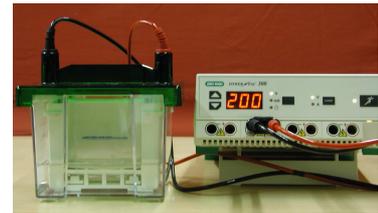
6. Chargement du gel (8')

- Les pistes de droite et gauche restent vides.
 - Les autres puits seront chargés avec :
 - 10 µl des étalons Kaléidoscope (KS)
 - 10 µl de l'étalon actine et myosine (AM)
 - 10 µl des échantillons.
- (Noter l'ordre des dépôts sur le protocole !)**



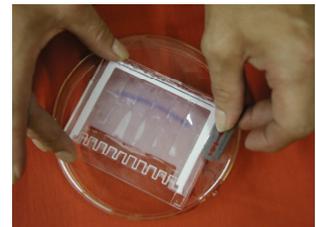
7. Réalisation de l'électrophorèse (26')

Fermer la cuve et commencer l'électrophorèse à 200 V. Arrêter l'électrophorèse quand le bleu de Bromophénol a atteint l'extrémité inférieure du gel (environ 25 minutes).



8. Démoulage du gel (6')

- 8.1 Retirer la structure d'assemblage et vider le tampon (**le tampon pourra être réutilisé**).
- 8.2 Sortir la plaque de gel et la poser avec la petite face au dessus.
- 8.3 Couper le film adhésif le long des côtés de la plaque de gel.

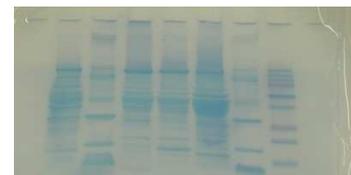


9. Coloration du gel (65')

- 9.1 Retirer la face supérieure de la plaque de gel, et la placer, gel au dessus, dans un bac de coloration rempli d'eau.
- 9.2 Sous l'eau, séparer le gel de la plaque.
- 9.3 Remplacer l'eau par 70 ml de solution de bleu de Coomassie et laisser colorer pendant une heure.

10. Transparisation du gel (3')

- 10.1 Après 1 heure, vider la solution de coloration.
- 10.2 Décolorer le gel sous un filet d'eau (jusqu'à ce que le fond du gel soit transparent).



11. Analyse du gel (45')

- 11.1 Repérer les différences entre les protéines musculaires des différentes espèces.
- 11.2 Déterminer la masse moléculaire de deux protéines par piste à l'aide de la courbe d'étalonnage.