

# Protocole

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



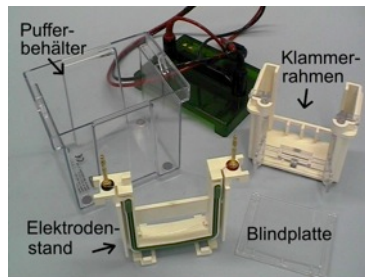
- 1.1 Dans votre tube rouge n°1 contenant déjà 12 µl de lysat de *E.coli*, pipeter :
  - 10 µl de mélange réactionnel (tube 2 vert)
  - 12 µl d'acides aminés (tube 3 bleu)
  - 1 µl de méthionine (tube 4 jaune)
  - 5 µl de tampon (tube 5 rose)
  - 10 µl de vecteur GFP (tube 6 transparent)
- 1.2 Incuber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

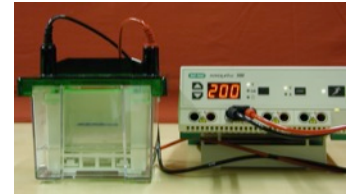
(2 groupes de travail utilisent un même gel; les puits droits et gauches restent vides!)

- 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

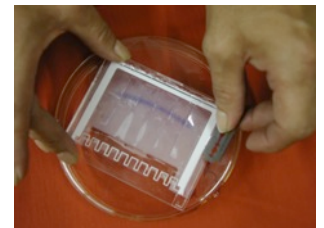
## 7. Réalisation de l'électrophorèse

- 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	