

Estimation de la masse moléculaire de la GFP

Protocole

1. Préparation des échantillons pour l'électrophorèse en Polyacrylamide (SDS-PAGE).

Exercice 1 : Vérifier si le tube (P) est vert fluorescent sous la lampe UV.

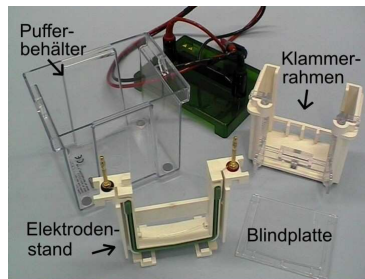
- 1.1 Pipeter 10 μ L du tampon Laemmli à verser dans le tube (P).
- 1.2 Mélanger le tube (P) en l'agitant légèrement

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 la bande inférieure.

3. Préparation de la cuve d'électrophorèse.

- 3.1 Mettre la plaque de gel avec la plus petite plaque de verre vers l'intérieur dans le support d'électrode.



Ajouter de l'autre côté une autre plaque de gel ou une plaque de verre.

- 3.2 Placer le compartiment intérieur dans la structure d'attache et fermer les attaches.
- 3.3 Mettre la structure d'attache avec le compartiment intérieur dans la cuve de tampon.
- 3.4 Retirer le peigne.

4. Remplir la cuve avec le tampon

- 4.1 Remplir le compartiment intérieur avec le tampon TGS jusqu'au bord.
- 4.2 Remplir le compartiment extérieur avec 200 mL de tampon TGS.

5. Remplissage des puits de gel

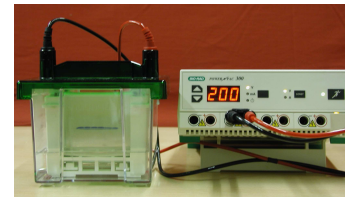
(Les puits gauches et droits doivent rester vides!)

Remplir les puits de gel avec :

- 15 μ L de marqueurs protéiques du Kaléidoscope (K)
- 15 μ L à partir du tube (P)

6. Réalisation de l'électrophorèse

- 6.1 Fermer la cuve et commencer l'électrophorèse à 200V.



- 6.2 Arrêter l'électrophorèse quand le Bleu de Bromophénol atteint l'extrémité la plus basse du gel.

7. Démoulage du gel

- 7.1 Sortir la structure d'attache et verser le tampon dans le récipient du tampon.
- 7.2 Démouler les plaques de gel.

8. Analyse

- 8.1 Marquer la bande de GFP sous la lampe UV.
- 8.2 Déterminer la masse moléculaire de la GFP avec les marqueurs protéiques du Kaléidoscope. (Vérifier avec le tableau suivant !)

Tableau: Masse moléculaire des marqueurs protéiques du Kaléidoscope

Bleu	250 kDa	
Violet	150 kDa	
Bleu	100 kDa	
Magenta	75 kDa	
Bleu	50 kDa	
Vert	37 kDa	
Magenta	25 kDa	
Bleu	20 kDa	
Bleu	15 kDa	
Jaune	10 kDa	