



Biotechnology ExplorerTM

Empreintes protéiques

Manuel d'instructions

Référence
166-0100EDU

<http://explorer.bio-rad.fr>

Les composants de ce kit sont expédiés séparément. Stockez les marqueurs de poids moléculaire dans le congélateur pendant 4 semaines après leur réception.

La duplication de toute partie de ce document
n'est autorisée que pour l'usage en classe.



Pour le service technique, composez le 01.47.95.69.64

Introduction au cours et au kit des empreintes protéiques

En 1859, Charles Darwin a publié ses fameux travaux sur l'évolution, L'origine des espèces, où il a écrit :

"Quelle que soit la cause de chaque légère différence chez les enfants de mêmes parents et une cause pour chaque différence doit exister— c'est par l'accumulation régulière de telles différences, avec la sélection naturelle, que les innombrables êtres vivant à la surface de cette terre peuvent lutter les uns contre les autres et s' adapter pour survivre."

Depuis l'époque de Darwin, on a beaucoup appris sur la base génétique de l'évolution. Cette activité de travaux pratiques se projette au-delà de l'ADN et se concentre sur ce qu'il produit : les protéines qui codent pour la forme, la fonction et les caractères des organismes. Les élèves apprennent à utiliser l'un des outils clés de la recherche en biologie moléculaire— l'électrophorèse des protéines—pour analyser et visualiser les "empreintes" moléculaires de la teneur en protéines dans le tissu musculaire de poisson. Parce que les protéines sont codées par des séquences d'ADN spécifiques, les empreintes protéiques peuvent refléter des similarités génétiques ainsi que des différences parmi les organismes. Ce cours engage les élèves à réfléchir de manière critique à la base moléculaire de telles similarités et différences, à la relation qui existe entre les gènes et les fonctions, et aux implications des relations d'évolution entre les espèces, sur un plan plus profond que les formes extérieures des corps. La technique de l'électrophorèse des protéines fournit aux élèves un outil puissant pour produire leurs propres données moléculaires afin de tester des hypothèses sur la parenté d'échantillons d'espèces. Ce cours est une vue globale des processus moléculaires sous-jacents à l'évolution et il est approprié aux élèves ayant des connaissances de base en biologie moléculaire. Les élèves produisent des données pour étudier la théorie de l'évolution dans le contexte du cadre central de la biologie moléculaire, ADN->ARN->Protéines->Caractère. Les variations graduelles et accumulées de l'ADN, qui se traduisent en protéines modifiées et nouvelles et en caractères, sont influées par la sélection naturelle. Ces processus créent la diversité des formes vivantes et préservent et perpétuent celles qui réussissent dans leur environnement. Ceci est la version moderne de la théorie de l'évolution de Darwin, un concept central et unificateur dans la biologie d'aujourd'hui.

Le Guide de l'enseignant contient deux parties : des généralités sur la base moléculaire du contexte de l'évolution à propos des techniques introduites, et un mode opératoire au jour le jour des techniques de TP des élèves. Il y a beaucoup d'informations avec lesquelles vous pouvez travailler, aussi l'enseignant doit décider du niveau de complexité à présenter.

Stratégie d'enseignement – Etude guidée, basée sur des recherches

L'intention de ce cours est de guider les élèves dans les processus de réflexion d'une étude scientifique basée sur des travaux pratiques. La question centrale qui relie tous les aspects de cette étude est : Est-ce que les biomolécules reflètent les relations évolutives? Dans leurs analyses, les élèves comparent les similarités et les différences observées dans les profils des protéines de leurs échantillons par rapport à un arbre d'évolution.

Nous nous efforçons continuellement d'améliorer nos programmes de cours et nos produits et vos histoires et idées sont les bienvenues!

L'équipe Bio-Education
Bio-Rad division Bio-Recherche 3,
bd Raymond Poincaré
92430 Marnes-la-Coquette

Sommaire

Guide l'enseignant

Introduction aux empreintes protéiques

	Page
Introduction et personnes concernées	2
Déroulement des TP	3
Problèmes de sécurité	3

Liste de contrôle de la composition et des consommables du kit

..... 4

Sujets de cours préalables aux travaux pratiques

Contexte et principes pour les élèves	6
Base moléculaire de l'évolution	6
Structure moléculaire de la biologie : ADN->ARN->Protéines->Caractère	7
Evolution et classification des poissons	11
Généralités sur l'électrophorèse des protéines	14

Information sur la préparation des travaux pratiques

Idées sur comment présenter cette activité en classe	23
Guide de travaux pratiques pour l'enseignant.....	25
Préparation préalable de l'enseignant.....	26
Points du cours à souligner	27
Modes opératoires des travaux pratiques des élèves.....	30

Introduction et généralités pour l'enseignant

Ces travaux pratiques sont concentrés sur la théorie et la pratique de caractéristiques moléculaires en corrélation avec des relations d'évolution parmi les espèces. Dans cette activité des empreintes protéiques, vos élèves vont passer au-delà de l'ADN pour explorer des protéines en tant qu'indicateur de l'évolution et ils vont utiliser la technique de l'électrophorèse pour comparer des profils de protéines d'espèces de poissons étroitement apparentées ou distantes. La biologie moléculaire nous a fourni des preuves solides que toutes les formes diverses de la vie ont évolué à partir d'un ancêtre commun et elle nous fournit également un mécanisme plausible pour l'émergence de nouveaux caractères. Vous et vos élèves allez être étonnés de ce que vous allez découvrir!

Personnes concernées

Notre objectif est de fournir des cours et des activités de biotechnologie qui s'intègrent très progressivement aux cours de biologie, aux manuels et aux activités de TP existant déjà en faculté et au lycée. Cette activité des empreintes protéiques peut être indépendante ou compléter des cours et des activités de nos kits d'empreinte génétique, d'amplification d'ADN par PCR et de transgénèse bactérienne. Tous les kits et les cours Biotechnology Explorer sont conçus pour approfondir la compréhension par les élèves de concepts, techniques et problèmes actuels en biologie moléculaire et biotechnologie.

Sujets de cours en synergie, adaptés et apparentés

- Biologie moléculaire
- Biotechnologie
- Biologie
- Génétique Evolution

Connaissances recommandées pour les élèves

Avant d'exécuter cette activité, vos élèves doivent être assez familiers avec les concepts qui suivent. Veuillez parcourir ces parties et couvrir ces concepts avec vos élèves avant de commencer les travaux pratiques.

- Théorie darwinienne de l'évolution
- Relations phylogéniques
- Instructions génétiques de l'ADN exprimées sous la forme de protéines
- Normalisation de la structure chimique et du code l'ADN dans tous les organismes
- Mutation de l'ADN : types, causes et effets
- Synthèse des protéines : ADN->ARN->Protéines
- Structure des protéines : primaire, secondaire, tertiaire et quaternaire
- Fonctions des protéines : enzymatiques et structurales
- Principales protéines musculaires
- Electrophorèse : théorie de base et SDS-PAGE
- Unités de mesure à micro-échelle
- Utilisation de micropipettes

Résultats attendus

Après ces travaux pratiques, vos élèves doivent être capables :

- d'expliquer comment une électrophorèse sur gel de polyacrylamide donne des informations sur les protéines
- de décrire comment des mutations de l'ADN peuvent conduire dans le temps à de nouveaux caractères
- d'interpréter des profils de protéines en tant que preuves moléculaires de l'évolution
- de comparer des relations phylogéniques avec les résultats des gels des protéines
- d'appliquer la structure de la biologie moléculaire pour comprendre l'évolution : ADN->ARN->Protéines->Caractère
- de proposer un mécanisme moléculaire pour expliquer l'évolution

Déroulement des TP

Les trois sessions de travaux pratiques sont conçues pour être réalisées sur des périodes consécutives de 50 minutes. Nous recommandons d'ajouter au moins un jour avant pour mettre en place le cadre de ces travaux pratiques et au moins un jour à la fin pour les discussions et la présentation et l'interprétation des résultats par les élèves.

Jour 1 des TP	Préparation des échantillons – extraction des protéines musculaires
Jour 2 des TP	Electrophorèse – chargement, migration et coloration des gels de polyacrylamide
Jour 3 des TP	Conservation des gels; analyse et interprétation des résultats

Problèmes de sécurité

Les gels de polyacrylamide pré-coulés sont sans risque et non toxiques. Cependant, en pratique standard, les élèves doivent porter constamment des gants, des blouses et des lunettes pendant tous les travaux pratiques.

L'électrophorèse combine liquide et électricité et, par conséquent, elle présente un risque potentiel de choc électrique. Une utilisation correcte des instruments prévient tout risque mais les élèves doivent être conscients de la possibilité de ce risque et on doit leur apprendre à manipuler les instruments selon les instructions.

Les élèves souffrant d'allergies connues ou suspectées doivent éviter tout contact avec les échantillons de crustacés.

Le cours pour cette activité a été développé en collaboration avec :
Dr Kristi Decourcy
Fralin Biotechnology Center
Virginia Tech, Blacksburg VA

Travaux pratiques des empreintes protéiques – Liste de contrôle de la composition et des consommables du kit :

Cette partie liste les instruments et les réactifs nécessaires pour conduire une prise d'empreintes protéiques dans votre classe ou en travaux pratiques. Nous recommandons aux élèves de former des équipes de deux ou quatre par poste de travail. Le kit Biotechnology Explorer complet des empreintes protéiques (Référence 166-0100EDU) contient des composants consommables en quantité suffisante pour 24 équipes d'élèves. De nombreux composants ont une durée de conservation illimitée. Les marqueurs pré-colorés Kaleidoscope™ et les standards d'actine et de myosine sont expédiés à température ambiante et ils doivent être stockés dans le congélateur (-20°C) pendant les quatre semaines qui suivent leur réception.

Le nombre de gels, de cuves, de pipettes et d'alimentations électriques nécessaires dépendra du nombre de postes de travail que vous choisirez de préparer et ils doivent être commandés individuellement. Chaque module d'électrophorèse Mini Protean 3 (cuve) est conçu pour traiter un ou deux gels.

A NOTER Nous recommandons d'utiliser un gel à 10 puits par poste de travail d'élèves, chaque cuve pouvant traiter deux gels.

Composition du kit complet d'empreintes protéiques,	166-0100EDU
Embouts pipettes Prot/Elect pour chargement gel—portoir de 200	<input type="checkbox"/> Recharge, 5 portoirs/boîte 223-9917EDU <input type="checkbox"/>
Microtubes à essai de 1,5 ml EZ à bouchon — 120, 4 sachets de 30	<input type="checkbox"/> Recharge, 500/boîte 223-9480EDU <input type="checkbox"/>
Microtubes de 1,5 ml à bouchon à vis—200, 4 sachets de 50	<input type="checkbox"/> Recharge, 500/boîte
Pipettes jetables de 1 ml — 30, 3 sachets de 10	<input type="checkbox"/> Recharge, 500/boîte 223-9522EDU <input type="checkbox"/>
Tampon à échantillon de Laemmli — 30ml	<input type="checkbox"/> Recharge, 30 ml 161-0737EDU <input type="checkbox"/>
Marqueurs pré-colorés Kaleidoscope — 500 µl	<input type="checkbox"/> Recharge, 500 µl 161-0324EDU <input type="checkbox"/>
Tampon d'électrophorèse Tris-glycine-SDS 10X — 1 l	<input type="checkbox"/> Recharge, 1 l 161-0732EDU <input type="checkbox"/>
Colorant Coomassie Bio-Safe™ pour protéines — 1 l	<input type="checkbox"/> Recharge, 1 l 161-0786EDU <input type="checkbox"/>
Standards d'actine et de myosine — 500 µg lyophilisé	<input type="checkbox"/> Recharge, 500 µg/flacon 166-0010EDU <input type="checkbox"/>
Plateaux de coloration de gels — 24	<input type="checkbox"/>
Portoirs de microtubes flottants — 24	<input type="checkbox"/>

Remarque : Composants expédiés séparément.

Instruments de TP, gels, eau et échantillons nécessaires :

* Gels de polyacrylamide pré-coulés Ready Gel®, 15 %, 10 puits, un par poste de travail	161-1103EDU <input type="checkbox"/>
Module d'électrophorèse Mini-PROTEAN 3 (cuve)—traite un ou deux gels	165-3302EDU <input type="checkbox"/>
Alimentation électrique (200 volts constants)	
PowerPac Junior™ 100 V et 200 V constants—traite deux cuves en même temps	165-5048EDU <input type="checkbox"/>
ou	
PowerPac™ Basic : 0~300 V, 0~400 mA—traite quatre cuves en même temps	164-5050EDU <input type="checkbox"/>
Micropipette de 2 à 20 µl par poste de travail	166-0506EDU <input type="checkbox"/>
ou	
Pipette à volume fixe de 10 µl	166-0512EDU <input type="checkbox"/>
Eau distillée ou déminéralisée—4,5 l	magasin <input type="checkbox"/>
**Echantillons de poissons (5 à 8 types)—1 g de chaque par poste de travail	magasin, rivière ou lac <input type="checkbox"/>
Ciseaux ou couteau pour couper les échantillons de poissons	<input type="checkbox"/>

*** Les gels de polyacrylamide pré-coulés ont une durée de conservation de 12 semaines et doivent être commandés peu avant l'utilisation. ** Echantillons de poissons à analyser**

Accessoires recommandés (facultatifs) :

Guides de chargement des échantillons – peigne pour 10 puits	chacun	165-3146EDU	<input type="checkbox"/>
Support de cellophane GelAir™, 50 feuilles		165-1779EDU	<input type="checkbox"/>
Cadres de séchage GelAir (2 cadres, 16 attaches jusqu'à 6 gels par cadre)		165-1775EDU	<input type="checkbox"/>
Table d'assemblage GelAir		165-1776EDU	<input type="checkbox"/>
Sécheur GelAir–four de séchage de gels (contient 4 portoirs de séchage)		165-1777EDU	<input type="checkbox"/>
Bain-marie, température ambiante à 100°C		166-0524EDU	<input type="checkbox"/>
Gants			<input type="checkbox"/>
Lunettes de sécurité			<input type="checkbox"/>

Système d'électrophorèse des protéines – Matériel pour préparer deux postes de travail d'élèves complets

- 1 – Module d'électrophorèse Mini-PROTEAN 3 (poste de travail = 1 gel; 2 gels/cuve)
- 1 – Guides de chargement des échantillons pour des gels à 10 puits
- 1 – Alimentation électrique PowerPac Junior
- 2 - Micropipettes, 2 à 20 µl

Cet exercice de travaux pratiques est concentré sur les comparaisons de différentes espèces de poissons, dont toutes doivent être disponibles chez votre marchand, dans l'océan, les rivières, les lacs ou les courants. Veuillez vous reporter à la partie de la préparation de l'enseignant aux pages 11 à 14 pour les variétés recommandées. D'autres organismes aquatiques, tels que les crevettes, les moules, les crabes et le surimi fonctionnent aussi bien avec ce mode opératoire de travaux pratiques et leur utilisation peut élargir les discussions pour inclure différents embranchements.

Contexte et principes pour les élèves

Pour cette activité, nous recommandons que votre exposé couvre les sujets discutés ci-dessous. Ces concepts enrichissent la compréhension des élèves pour ces travaux pratiques.

Base de cette étude : les élèves utiliseront l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide pour comparer des profils de protéines dérivées de tissu musculaire de différents poissons. Puisque les protéines sont spécifiées par des séquences d'ADN, lorsque des changements génétiques (ADN) se produisent et passent de génération en génération, il en est de même de la composition des protéines et la forme des organismes change avec le temps. A un certain degré, des similarités et des différences génétiques peuvent être détectées et déduites de ces profils électrophorétiques des protéines.

L'hypothèse pour cette activité : plus deux espèces sont proches sur un arbre d'évolution basé sur les caractères morphologiques, plus les empreintes de leurs protéines seront similaires.

Base moléculaire de l'évolution

L'évolution génétique peut être définie comme le changement dans le temps dans un groupe de gènes (ADN collectif des espèces). Les altérations de l'ADN, appelées mutations, peuvent altérer les protéines de sorte qu'elles fonctionnent différemment. Ces changements peuvent conduire à de nouveaux caractères et produire une diversité – différences individuelles parmi les membres d'une population. Occasionnellement, une mutation génétique altèrera la structure d'une protéine pour conférer un avantage fonctionnel, l'augmentation de la survie d'un organisme dans un habitat, un environnement particulier ou la relation prédateur-proie. Ainsi, la diversité génétique rend l'évolution possible, puisque la sélection naturelle favorise certains individus et d'autres pas, et ceci conduit à des changements dans le temps dans la composition du groupe de gènes. L'ADN permet la continuité des caractères d'une génération à la suivante et constitue la variation qui peut conduire à des différences au sein d'une espèce – et même à une espèce totalement nouvelle. Comme l'a dit Francis Crick, l'un de ceux qui ont découvert la structure de l'ADN, au sujet des découvertes faites par lui-même et James Watson :

"Nous avons découvert le secret de la vie." Francis Crick, Eagle Pub, Cambridge, 1953

La théorie scientifique de **l'évolution génétique** est basée sur la supposition que toute la vie a évolué à partir d'un ancêtre unicellulaire commun, par des modifications et des diversifications des toutes premières lignées vers les formes qui existent aujourd'hui. Cette théorie est fortement étayée par la découverte qu'une grande similarité des séquences d'ADN existe parmi les gènes de tous les organismes des temps modernes. Par exemple, les scientifiques ont été étonnés de découvrir que la famille de gènes (gènes Hox) contrôle le développement embryonnaire d'animaux aussi divers que les moucheron, les poissons-zèbres et les hommes.

"Au niveau de l'embryologie, nous sommes des mouches glorifiées." Matt Ridley, Genome, 1999

Les hauts niveaux de similarité des séquences des gènes parmi les divers organismes ne peuvent être dus qu'à un ancêtre commun, ou **homologie**. (Ce terme est également utilisé en référence à des structures anatomiques avec une dérivation commune, telle que les mains des primates, les ailes des chauves-souris et les nageoires des baleines.) Les protéines complexes des organismes supérieurs ont évolué par la réorganisation et l'altération de domaines de protéines fonctionnelles qui avaient pour origine des formes de vie anciennes. Les familles de canaux ioniques, activateurs de gènes, réplicateurs de

gènes, protéines musculaires et d'autres fonctions se trouvent partout dans les organismes, y compris chez ceux vivant dans la mer, sous des rochers et même volant au-dessus de nous dans le ciel.

Des spécialistes de l'évolution de l'homme ont longtemps argumenté sur quel primate nous est le plus étroitement apparenté, les chimpanzés ou les gorilles. Avec les techniques modernes pour analyser l'ADN, il a été démontré que les chimpanzés partagent 98,4 % de leur ADN avec les hommes, légèrement plus que les uns ou les autres avec les gorilles (King et Wilson 1975).

Les classifications traditionnelles des organismes, y compris le règne, la branche, la classe, l'ordre etc., ont été basées principalement sur des caractéristiques morphologiques — les caractères qui peuvent s'observer à l'œil nu ou au microscope. La biologie moléculaire nous permet de réévaluer ces classifications avec une connaissance plus profonde de la constitution génétique commune de tous les organismes. Au cours de cette activité de travaux pratiques, vos élèves exploreront l'évolution à ses racines — en observant les molécules génétiquement déterminées qui donnent leurs caractères aux organismes.

Structure moléculaire de la biologie

ADN->ARN->Protéines->Caractère

L'**ADN** a été récemment un centre de recherche principal, mais l'ultime fonction de l'ADN est de spécifier quelles protéines sont fabriquées. En fait, des études récentes des séquences du génome des hommes et d'autres organismes ont révélé que le nombre de protéines exprimées par une espèce contribue plus à sa complexité que le nombre de gènes (Jasny et Kennedy 2001, International Human Genome Consortium 2001).

Les molécules des protéines effectuent une diversité étonnante de fonctions, de la catalyse de réactions chimiques à la formation des structures de notre corps.

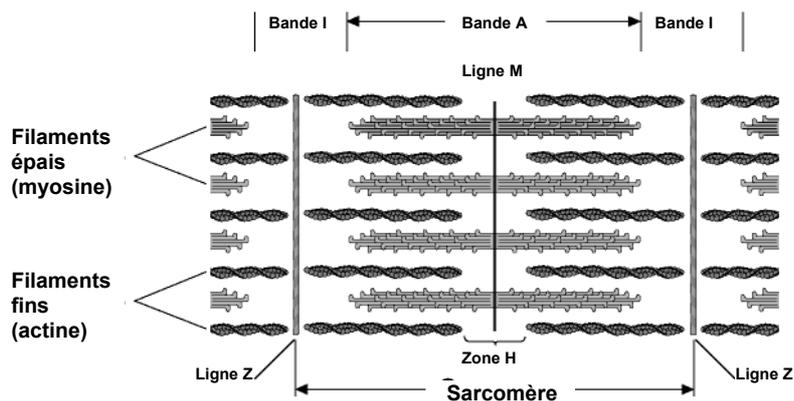
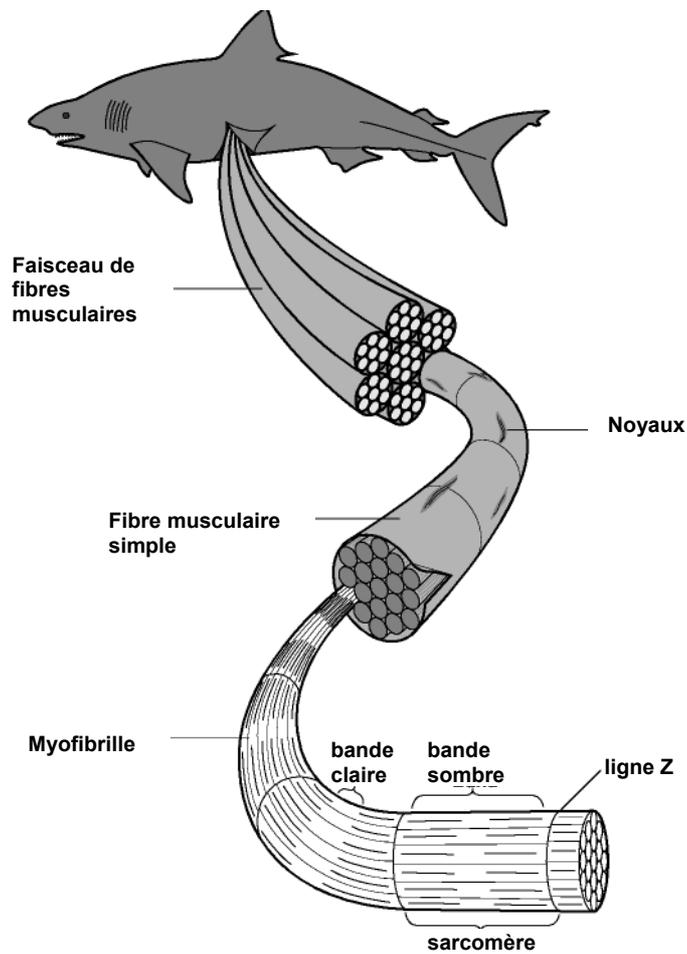
Universellement, toute cellule vivante a besoin d'enzymes spécifiques pour les milliers de réactions chimiques qui maintiennent la vie. Chaque enzyme est une protéine avec une séquence unique d'acides aminés, qui est spécifiée par un gène avec une séquence unique d'ADN.

Les protéines forment également des unités structurales telles que le cartilage et le tissu musculaire. Par exemple, la contraction des muscles résulte de l'interaction de deux protéines principales, l'actine et la myosine. Comme les enzymes, les protéines musculaires, telles que l'actine et la myosine, sont spécifiées par des gènes avec des séquences uniques d'ADN. A la fois l'actine et la myosine et les structures uniques selon lesquelles elles sont organisées, sont conservées parmi tous les animaux, quelle que soit leur diversité. Cette conservation implique que les séquences codantes d'ADN ont peu changé tout au long de l'évolution.

Tout comme les similarités de structure indiquent une origine commune, les variations et les différences indiquent la divergence sur l'arbre d'évolution. Dans ces travaux pratiques, les élèves produisent des empreintes protéiques de muscles provenant de plusieurs espèces différentes de poissons et ils les utilisent pour en déduire des relations d'évolution. Avant de fournir quelques notions sur l'évolution des poissons, nous allons donner plus de détails sur les types de protéines trouvées dans le tissu musculaire.

Protéines musculaires

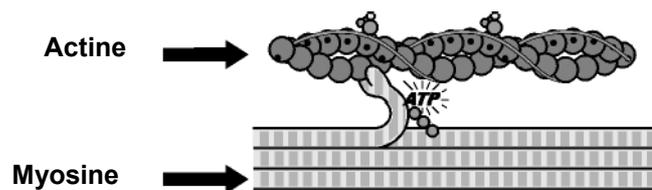
Nos mouvements quotidiens les plus familiers, de la marche à la respiration simple, sont dirigés par les interactions entre des protéines spécialisées dans nos fibres musculaires. Les éléments contractiles basiques des cellules musculaires sont les myofibrilles qui sont rassemblées en fibres musculaires. Chaque myofibrille est composée d'une série linéaire d'unités contractiles appelées sarcomères.



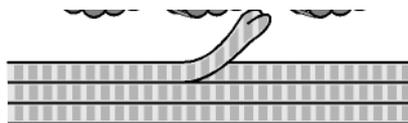
(Figure modifiée de Campbell 1996 avec permission)

Figure 1. Vue télescopique de la structure musculaire : Les filaments épais de myosine et les filaments fins d'actine forment des myofibrilles qui sont rassemblés pour constituer les fibres musculaires.

Les sarcomères sont des assemblages, arrangés de manière précise, de filaments des protéines actine et myosine. Les filaments fins d'actine sont alignés avec les filaments épais de myosine d'une manière parallèle et partiellement chevauchante. Le sarcomère se raccourcit lorsque la myosine hydrolyse l'ATP pour glisser le long du filament d'actine, ramenant les extrémités du sarcomère l'une vers l'autre. La contraction combinée de nombreux sarcomères le long d'une fibre musculaire provoque la contraction du muscle entier. Il est important de noter que, bien que l'actine et la myosine soient les composants principaux, d'autres protéines se trouvent également dans le tissu musculaire.



(Figure modifiée de Campbell 1996 avec permission)



(Figure modified from Campbell 1996 with permission)

Figure 2. L'hydrolyse de l'ATP fait glisser les filaments de myosine et d'actine les uns sur les autres, raccourcissant le sarcomère et contractant le muscle.

Autres protéines musculaires

De nombreuses protéines en dehors de l'actine et de la myosine sont également nécessaires à la contraction musculaire (voir le tableau ci-dessous). Alors que l'actine et la myosine sont hautement conservées parmi toutes les espèces animales, d'autres protéines musculaires présentent plus de variabilité. Ces variations des protéines musculaires d'un organisme peuvent refléter des raffinements de la fonction et des performances musculaires qui s'adaptent à des habitats, environnements et stress physiologiques particuliers.

Protéines musculaires caractérisées, par ordre de taille décroissante, adaptées d'après Alberts et al. 1994.

Protéines	MM (en kd)	Fonction
titine	3000	centre la myosine dans le sarcomère
dystrophine	400	ancrage à la membrane plasmique
filamine	270	réticule les filaments d'actine dans un gel
chaîne lourde de myosine	210	fait glisser les filaments d'actine
spectrine	265	fixe les filaments à la membrane plasmique
M1/M2	190	produit de dégradation de la myosine
M3	150	produit de dégradation de la myosine
protéine C	140	produit de dégradation de la myosine
nébuline	107	régule l'assemblage de l'actine
α -actinine	100	groupe les filaments d'actine
gelsoline	90	fragmente les filaments d'actine
fimbrine	68	groupe les filaments d'actine
actine	42	forme des filaments
tropomyosine	35	renforce les filaments d'actine
troponine (T)	30	régule la contraction
chaînes légères de myosine	24, 17, 15	fait glisser les filaments d'actine
troponine (I)	19	régule la contraction
troponine (C)	17	régule la contraction
thymosine	5	séquestre des monomères d'actine

Dans ces travaux pratiques des empreintes protéiques, l'actine et la myosine seront présentes dans toutes les espèces mais la présence d'autres protéines sera plus variable. Les élèves compareront les protéines variables des différents échantillons de poissons pour évaluer la parenté d'évolution parmi les espèces. Une fois que les élèves ont réalisé cette analyse, ils peuvent comparer leurs résultats avec des arbres d'évolution basés sur des données morphologiques.

Ensuite, nous soulignerons l'évolution des poissons avant de couvrir comment les empreintes protéiques fonctionnent.

Evolution et classification des poissons

Pour aider la sélection des poissons pour les travaux pratiques et pour aider à l'interprétation des données moléculaires, les élèves ont besoin de comprendre quelque peu l'évolution des poissons. Le diagramme de l'évolution ci-dessous vous aidera à choisir les variétés appropriées. L'idée est de comparer des poissons étroitement apparentés et distants. Nous recommandons que vous, ou vos élèves, recherchiez des informations supplémentaires sur l'histoire de l'évolution des poissons, en utilisant Internet et des livres de biologie et de zoologie.

Arbres d'évolution

Un arbre d'évolution montre les lignées d'évolution de différentes espèces dans le temps. Les arbres d'évolution qui suivent ne sont pas précis ou représentés à l'échelle mais ils ont pour but de servir de référence pour choisir un mélange varié d'échantillons de poissons disponibles dans votre région. La Figure 3 montre la relation parmi un certain nombre d'embranchements d'animaux.

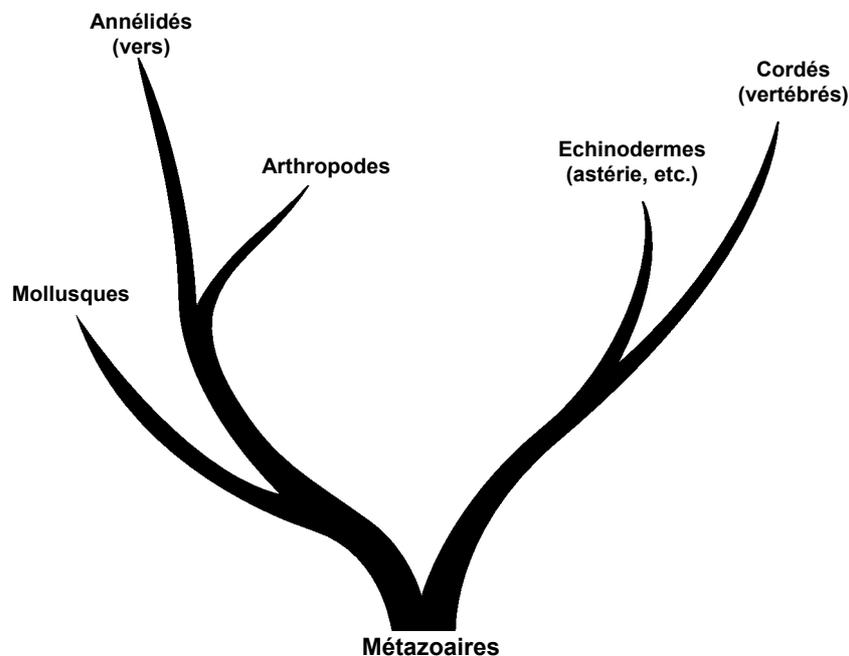


Figure 3. Arbre d'évolution montrant les relations parmi les vertébrés (cordés, y compris tous les poissons), les mollusques, les vers, les échinodermes et les arthropodes.

Les poissons actuels sont divisés en plusieurs classes, les Chondrichthyens (poissons cartilagineux) et les Ostéichthyens (poissons osseux), avec les lamproies et les myxines dans la classe distincte des Agnathes (vertébrés dépourvus de mâchoires) qui ont divergé plus tôt des poissons ancestraux. Les Chondrichthyens comprennent les requins et les raies et les Ostéichthyens comprennent tous les autres poissons actuels. Suivent des descriptions brèves de certains des groupes principaux de poissons, dans l'ordre du plus ancien à celui qui a divergé le plus récemment.

Agnathes. Les **lamproies** et les **myxines** sont des poissons sans mâchoires qui ressemblent à des anguilles et qui ont des styles de vie parasites et de charognard. Ils n'ont ni écailles ni nageoires paires. Ils ont évolué à partir de l'ancêtre vertébré le plus ancien avant l'apparition et la diversification des poissons pourvus de mâchoires. La banque de données des fossiles pour les Agnathes remonte à près de 500 millions d'années.

Chondrichtyens. Les **requins** les **raies** appartiennent à cette classe. Leur squelette cartilagineux plutôt qu'osseux reflète un état plus ancestral dans l'évolution. Leur peau est épaisse et sans véritables écailles et ils n'ont pas de vessie natatoire ou de poumons.

Ostéichtyens. Les poissons osseux sont la classe de poissons la plus diversifiée. La classe est caractérisée par un squelette osseux, des écailles véritables, des nageoires paires et des rayons mobiles dans les nageoires et la queue. Les Ostéichtyens se divisent en deux sous-classes, les poissons à nageoires charnues (Sarcoptérygiens) et les poissons à nageoires rayonnées (Actinoptérygiens).

Les **Sarcoptérygiens** sont les poissons les plus étroitement apparentés aux amphibiens, reptiles, oiseaux et mammifères actuels, et cette sous-classe comprend les cératodiformes et les coelacanthes. On pensait que les coelacanthes s'étaient éteints à peu près en même temps que les dinosaures, jusqu'à ce que l'on trouve un spécimen vivant en 1938 (Glausiuz 1999)!

Les poissons les plus actuels sont des membres de la sous-classe des Actinoptérygiens à nageoires rayonnées.

Les **esturgeons**, les **poissons-castors** et les **orphies** sont considérés comme des poissons osseux reliques. De nos jours, il existe environ 50 espèces de ces poissons reliques dans le monde entier bien que la banque de données des fossiles montre qu'il en existait beaucoup plus dans le passé.

Téléostéens. Le reste des poissons osseux est classé dans la sous-division des **Téléostéens**, qui comprend 42 ordres et plus de 23000 espèces. Les ordres qui comprennent les **harengs** et les **anchois** et les **anguilles** sont considérés comme des branches spécialisées des téléostéens et ils comprennent environ 6 % de la sous-division.

Autres sous-divisions des Téléostéens :

- Super-ordre des Ostariophyses
 - Ordre des Cypriniformes (goujons, carpes)
 - Ordre des Siluriformes (poisson-chat)
- Super-ordre des Protacanthoptérygiens
 - Ordre des Esociformes (brochet)
 - Ordre des Osmériformes (éperlan)
 - Ordre des Salmoniformes (saumon, truite, lavaret)
- Super-ordre des Paracanthoptérygiens
 - Ordre des Gadiformes (morue, merlu, colin)
- Super-ordre des Acanthoptérygiens
 - Ordre des Percoïdés (perches, bouline, serranidés)
 - Ordre des Pleuronectiformes (flet, soles)
 - Ordre des Perciformes (maquereau, thon, espadon)

Quels poissons devez-vous choisir pour ces travaux pratiques?

L'objectif est de choisir des spécimens de poissons qui fourniront des résultats frappants et distincts que vos élèves auront à analyser. La Figure 4 est un arbre d'évolution des poissons plus détaillé, avec les noms courants pour vous aider à identifier les exemples chez le poissonnier. Nous vous recommandons de choisir certains poissons étroitement apparentés provenant de la même branche de l'arbre, tels que le saumon et la truite, ainsi que des poissons distants provenant de branches différentes, tels que le requin et le thon.

Remarque : ces arbres d'évolution ont été dessinés pour représenter les relations parmi les espèces de poissons. Ils ne sont pas censés être strictement exacts.

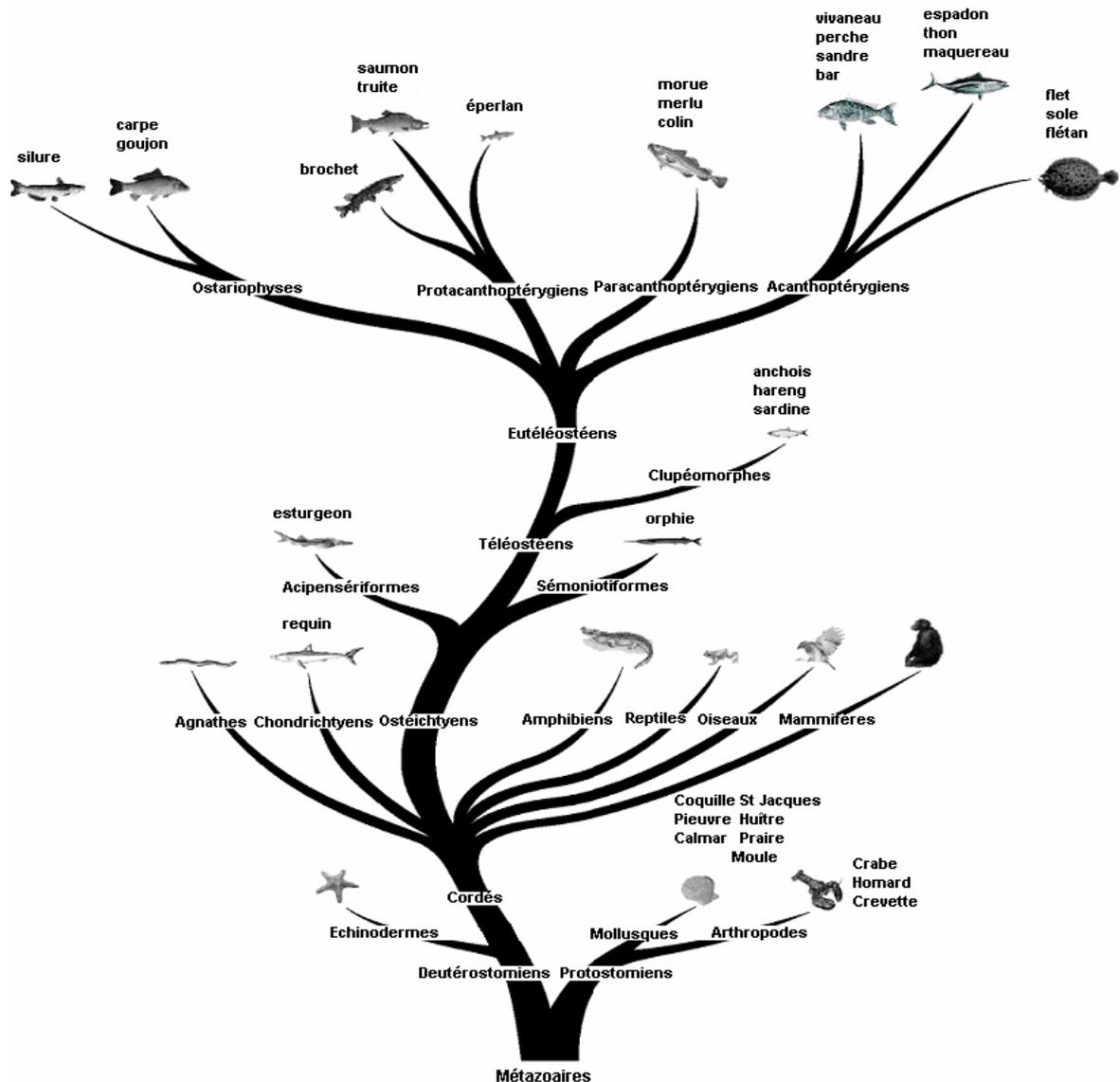


Figure 4. Arbre d'évolution des poissons représentatifs montrant les relations parmi les espèces de poissons, d'après des sources du web sur l'arbre de la vie (phylogeny.arizona.edu).

D'autres organismes aquatiques qui pourraient être utilisés dans cette expérience comprennent des mollusques (*par exemple*, les coquilles Saint-Jacques, les pieuvres, les praires, les huîtres) et des arthropodes (*par exemple*, le crabe, la crevette, le homard, l'écrevisse). Ces organismes sont distants du point de vue évolution, aussi ils fourniront des résultats comparatifs intéressants sur des relations d'évolution plus larges.

A NOTER Lorsque vous achetez des poissons, il faut que vous gardiez à l'esprit que vous n'avez besoin que d'un gramme de chaque échantillon. Au comptoir de votre poissonnier, vous pourrez probablement obtenir des petits échantillons pour une petite somme ou gratuitement. Les poissons congelés marchent aussi bien que les frais. Assurez-vous de bien garder la trace de chaque poisson !

Armé d'une sélection d'échantillons étroitement apparentés et distants, l'étape suivante est d'apprendre la méthode des empreintes protéiques.

Généralités sur l'électrophorèse des protéines

Ces concepts sont importants pour que les élèves comprennent cette activité de travaux pratiques.

- Les protéines sont des molécules chargées dont les séquences sont déterminées par l'ADN.
- Les gels de polyacrylamide sont utilisés pour séparer des petites molécules, telles que des protéines, tandis que les gels d'agarose sont utilisés pour séparer des molécules plus grosses, telles que l'ADN.
- Le pourcentage de gel de polyacrylamide à utiliser dépend de la plage des tailles des protéines d'intérêt. Plus le pourcentage est élevé, plus la matrice est dense. Il en résulte que des gels avec des pourcentages supérieurs sont utilisés pour séparer des molécules plus petites et des gels avec des pourcentages inférieurs sont utilisés pour séparer des protéines plus grosses.
- Les protéines sont séparées selon leur taille lorsqu'elles sont soumises à une SDS-PAGE, une forme d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) qui incorpore le détergent dodécylsulfate de sodium (SDS). Si des protéines de poids moléculaire connu, appelées marqueurs, sont également traitées sur le gel, leur migration peut être utilisée pour estimer le poids moléculaire de protéines inconnues.
- Les échantillons de protéines pour la SDS-PAGE sont prétraités en les chauffant en présence de détergent SDS chargé négativement, de sorte que les protéines et les complexes de protéines sont rompus ou dénaturés et toutes les protéines acquièrent un rapport charge sur poids uniforme. Ensuite les protéines migrent à des vitesses dépendant de leur poids moléculaire, sans que leur forme tridimensionnelle native et leur charge soient des facteurs.

Quelques faits historiques ...

Les empreintes protéiques ont été réalisées pour la première fois en 1956 pour montrer que la maladie génétique de la drépanocytose est provoquée par le changement d'un seul acide aminé de la protéine de l'hémoglobine (Ingram 1956). La technique d'électrophorèse sur gel que vous utilisez, l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide avec SDS (SDS-PAGE), a été développée par l'anglais

Laemmli, dont l'article en 1970 dans Nature présente le plus grand nombre de citations de tout article scientifique (Laemmli 1970). La SDS-PAGE est encore la méthode prédominante utilisée en électrophorèse sur gel verticale des protéines.

Principes généraux de l'électrophorèse des protéines et de la SDS-PAGE

L'électrophorèse ("porter avec l'électricité") est la migration de molécules chargées dans un champ électrique vers l'électrode de charge opposée. Cette technique est largement utilisée dans la recherche en biologie moléculaire pour étudier des protéines afin de répondre à toute une diversité de questions. Par exemple :

- **Quelles sont les protéines présentes dans mon échantillon?**
- **Quels sont les poids moléculaires des protéines?**
- **Quelles différences existent dans les protéines provenant de sources différentes?**
- **Quelle est la pureté de la protéine d'intérêt?**
- **Quelle est la quantité de protéine que j'ai obtenue?**

Laemmli a développé son système d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide avec deux phases de gel, de manière à ce que toutes les protéines présentes dans un gel commencent à se séparer en même temps. Puisque les volumes des échantillons peuvent varier d'un couloir à l'autre, en formant verticalement des bandes étroites ou larges dans les puits, toutes les protéines présentes dans un échantillon ne pénètrent pas simultanément dans la zone du gel de concentration. Toutefois, le faible pourcentage (4 %) du gel de concentration permet aux protéines de migrer rapidement et de s'accumuler au bord du gel de séparation plus dense, indépendamment de leur taille. Les échantillons de protéines mélangées sont ainsi concentrés dans des bandes uniformément fines dans chaque couloir avant de progresser dans le gel de séparation plus dense (5 à 20 %) et de commencer à se séparer selon leur poids.

Il n'existe pas de frontière visuelle évidente entre les zones de concentration et de séparation du gel Ready, mais si vous observez vos échantillons immédiatement après avoir allumé l'alimentation électrique, vous verrez les échantillons de protéines se concentrer en une bande étroite au niveau de l'interface. Les marqueurs pré-colorés Kaleidoscope se concentrent d'abord en une bande serrée et ensuite les protéines pré-colorées individuelles deviennent distinctes alors que les protéines commencent à se séparer selon leur poids moléculaire.

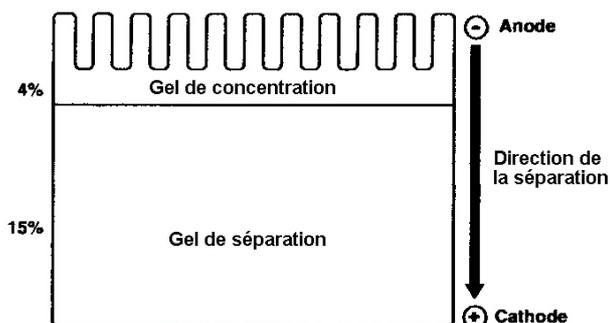


Figure 5. Les gels pré-coulés Ready Gel de Bio-Rad sont des gels de polyacrylamide très fins pris en sandwich entre des plaques transparentes. Chaque gel présente deux zones distinctes, le gel de concentration et le gel de séparation. Dans l'électrophorèse sur gel verticale, les échantillons sont chargés dans des puits en haut du gel de concentration et les protéines progressent vers le bas en direction de l'électrode chargée positivement.

Pourquoi utilisons-nous des gels de polyacrylamide, et non pas d'agarose, pour analyser les protéines?

La matrice du gel formée de polyacrylamide est beaucoup plus serrée et capable de séparer des molécules beaucoup plus petites que les gels d'agarose. Les gels de polyacrylamide ont des tailles de pores semblables aux tailles des protéines. Les molécules d'ADN ont des ordres de grandeur supérieurs aux protéines, et pour les acides nucléiques, l'agarose est généralement le milieu de gel préféré. Toutefois, lors de la séparation de très petits fragments d'ADN, par exemple au cours du séquençage de l'ADN, le polyacrylamide est la matrice de gel de choix.

Principes de chimie et de physique en électrophorèse

La taille des biomolécules est exprimée en daltons, une mesure du poids moléculaire. Un dalton équivaut au poids d'un atome d'hydrogène qui pèse $1,66 \times 10^{-24}$ gramme. La plupart des protéines ont des poids de l'ordre de milliers de daltons, aussi le terme kilodalton (kd) est utilisé pour le poids moléculaire des protéines. Les protéines se situent dans la plage de tailles de plusieurs kilodaltons à des milliers de kilodaltons. Au contraire, les acides nucléiques que nous étudions sont souvent constitués de plus de 1000 paires de bases, ou 1 kilobase (kb), et chaque kilobase a un poids d'environ 660 kd. Par exemple, lors du clonage de l'ADN, un fragment de 2 kb d'ADN peut être inséré dans un vecteur plasmidique de 3 kb, ce qui donne une longueur totale de plasmide de 5 kb. Le poids de ce plasmide de 5 kb est d'environ 3,3 millions de daltons ou 3300 kd, ce qui est beaucoup plus gros qu'une protéine moyenne!

La charge électrique d'une molécule et son poids affectent sa mobilité dans un gel au cours d'une électrophorèse. Le rapport de la charge sur le poids est appelée la **densité de charge**. Puisque chaque protéine est constituée d'une combinaison unique d'acides aminés, dont chacun peut avoir une charge positive, négative ou neutre, la charge nette de chaque protéine est naturellement différente. Les charges inhérentes des protéines doivent être éliminées en tant que facteur affectant la migration afin que l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide soit efficace en tant que méthode de détermination du poids moléculaire des protéines.

Les charges intrinsèques des protéines sont occultées en plaçant un détergent fortement anionique (chargé négativement), le SDS, à la fois dans le tampon à échantillon et dans le tampon de migration du gel. Le SDS se lie à et revêt les protéines et il les maintient dénaturées sous la forme de chaînes linéaires. Sous cette forme, les protéines migrent dans un gel de polyacrylamide comme si elles avaient des densités de charge négative et le poids devient la seule variable affectant la vitesse de migration de chaque protéine. Cette technique est appelée **SDS-PAGE**.

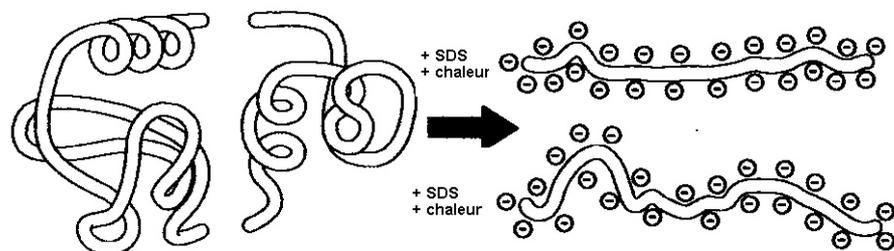


Figure 6. La structure d'un complexe de protéines est rompue lorsque du SDS se lie aux protéines en présence de chaleur. Les protéines individuelles chargées négativement peuvent être séparées par taille sur un gel pour SDS-PAGE.

Le gel de polyacrylamide fonctionne comme un tamis moléculaire

Le degré de tamisage au sein d'un gel peut être contrôlé en ajustant la concentration en polyacrylamide. Les concentrations supérieures de polyacrylamide séparent des plages de poids moléculaires plus petites. Par exemple, un gel de polyacrylamide à 5 % sépare des grosses protéines de 100 à 300 kd, tandis qu'un gel de polyacrylamide à 18 % est mieux pour séparer des protéines plus petites situées dans la plage de 5 à 30 kd.

Pour cette activité, nous recommandons d'utiliser des gels de polyacrylamide à 15 % qui fournissent une séparation excellente pour des protéines situées dans la plage de 10 à 100 kd. Notre attention va se concentrer sur les variations existant parmi les protéines plus petites, situées dans la plage de 15 à 50 kd, parce qu'il est plus facile de discerner des différences parmi ces protéines. Les protéines plus petites migrent plus loin dans le gel et sont mieux séparées que les protéines avec des poids moléculaires plus élevés.

Fonctionnement d'un gel de polyacrylamide

Pour faire fonctionner un gel de polyacrylamide, une cassette Ready Gel est préparée selon les instructions données à la page 32 et le peigne formant les puits est retiré. La cassette préparée est bloquée dans une cuve verticale et le tampon de migration est ajouté aux chambres de tampon supérieure et inférieure. Les échantillons, les contrôles et les marqueurs de poids moléculaire sont chargés dans les puits préformés du gel. Un couvercle est placé sur la cuve de l'électrophorèse et les fils électriques sont branchés sur une alimentation électrique. Un courant est appliqué à une tension constante, des bulles surgissent des électrodes et le colorant bleu ainsi que les protéines présentes dans les échantillons commencent à pénétrer dans le gel.

Préparation des échantillons – Rupture de la structure des protéines

Sample Preparation – Disrupting Protein Structure

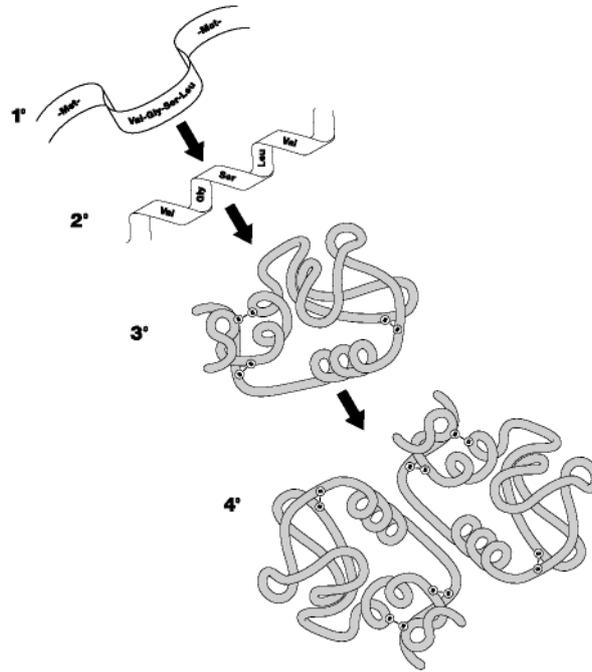


Figure 7. La structure secondaire (2°), tertiaire (3°) et quaternaire (4°) des protéines peut être rompue ou dénaturée pour séparer les protéines par taille.

Pour déterminer efficacement les poids moléculaires de protéines, les structures secondaire (2°), tertiaire (3°) et quaternaire (4°) des complexes de protéines au sein d'un extrait protéique sont rompus avant l'électrophorèse. Ce procédé de rupture de structure est appelé **dénaturation**.

- **Structure primaire** = chaîne linéaire d'acides aminés
- **Structure secondaire** = domaines de structures répétitives, telles que les feuillets β et les hélices α
- **Structure tertiaire** = forme tridimensionnelle d'un polypeptide replié, maintenue par des ponts disulfure, des interactions électrostatiques, des effets hydrophobes
- **Structure quaternaire** = plusieurs chaînes polypeptidiques associées ensemble pour former une protéine fonctionnelle

Les structures secondaires, tertiaires et quaternaires sont rompues par la combinaison de la chaleur et du SDS. Un agent réducteur, tel que le β -mercaptoéthanol (BME) ou le dithiothréitol (DTT), peut être ajouté pour assurer une cassure complète des ponts disulfure. Ces trois facteurs – chaleur, détergent ionique et agent réducteur – rompent complètement les structures 2°, 3° et 4° des protéines et des complexes de protéines, en produisant des chaînes linéaires d'acides aminés. Ces molécules serpentent à travers le gel à des vitesses proportionnelles à leur poids moléculaire.

A NOTER Le BME et le DTT sont potentiellement dangereux et ont une odeur affreuse. Heureusement, aucun des deux n'est nécessaire pour cette activité. Les aspects des bandes des protéines des tissus musculaires de poissons ne sont pas affectés de manière visible par l'inclusion d'agents réducteurs dans le tampon à échantillon de Laemmli. Le tampon à échantillon de Laemmli qui est fourni dans le kit est prêt à l'emploi.

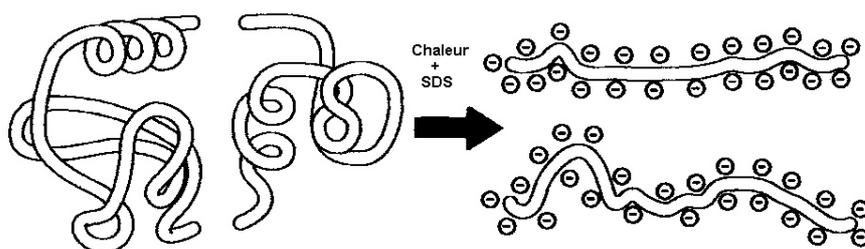


Figure 8. La combinaison de la chaleur et du détergent SDS dénature les protéines pour l'analyse par SDS-PAGE.

Les échantillons de poissons sont dénaturés en les chauffant dans du tampon à échantillon de Laemmli qui contient du SDS.

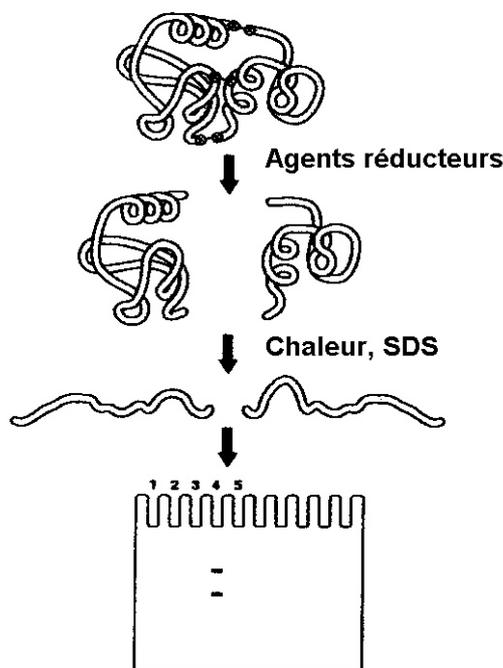


Figure 9. Un complexe quaternaire de protéines dénaturées avec des agents réducteurs, de la chaleur et du SDS, peut être séparé en protéines individuelles selon les tailles par SDS-PAGE.

Visualisation des protéines

Au terme de l'électrophorèse, le gel Ready Gel est coloré de sorte que les bandes de protéines colorées en bleu apparaissent contre un fond transparent. Pour un enregistrement de l'expérience, le gel coloré peut être pris en sandwich entre deux feuilles de cellophane pour sécher ou scellé dans un sac en plastique et maintenu hydraté. En variante, le gel humide peut être photographié ou photocopié pour conserver un enregistrement permanent.

Marqueurs de poids moléculaire

Les marqueurs de protéines pour l'électrophorèse, ou marqueurs de poids moléculaire, sont constitués d'un mélange de protéines de poids moléculaire connu. Ils sont disponibles dans un certain nombre de plages de tailles de protéines. Les marqueurs à utiliser doivent correspondre aux tailles des protéines d'intérêt.

Les marqueurs de poids moléculaire sont disponibles soit pré-colorés soit non colorés. Les marqueurs non colorés ne sont pas visibles jusqu'à ce que le gel soit coloré par un colorant pour protéines, tel que le colorant Coomassie Bio-Safe™. Les marqueurs pré-colorés Kaleidoscope compris dans ce kit sont visibles alors qu'ils migrent sur le gel. Les colorants liés aux protéines marqueurs Kaleidoscope affectent les migrations des protéines et les tailles véritables des molécules colorées diffèrent légèrement de lot à lot. Veuillez vous reporter au tableau des tailles qui est joint à chaque flacon de marqueurs pré-colorés Kaleidoscope pour connaître le poids moléculaire calibré de chacune des protéines colorées.

Standards d'actine et de myosine

Les standards d'actine et de myosine sont inclus dans le kit en tant que référence pour aider à identifier les protéines musculaires principales conservées et pour servir de contrôle positif pour l'analyse sur gel. Cet échantillon de protéines est composé de myofibrilles (voir la Figure 1) qui ont été isolées de muscles squelettiques de lapin. L'actine, les chaînes lourde et légère de la myosine et la tropomyosine seront visibles une fois que le gel est décoloré. Cet échantillon contient suffisamment de protéines à voir nettement lorsque le gel est coloré et décoloré selon les instructions du kit. Si les seules protéines visibles sur le gel décoloré sont les marqueurs pré-colorés Kaleidoscope, il y a eu un problème avec le chargement, la coloration ou la décoloration du gel.

Les bandes épaisses à 210 kd et 43 kd, présentes dans tous les échantillons de muscles, correspondent, respectivement, à la chaîne lourde de la myosine et à l'actine. Leur présence dans tous les échantillons signifie que tous les poissons ont de l'actine et de la myosine en tant que composants principaux des muscles et que ces deux protéines ont été conservées dans toute l'évolution. La myosine elle-même est composée de plusieurs gros polypeptides (chaînes lourdes et légères) qui sont séparés sur les gels.

Analyse des résultats des électrophorèses des élèves

Pour tirer des conclusions significatives à propos des relations d'évolution parmi les espèces de poissons échantillonnées, les élèves doivent analyser et comparer les aspects des bandes des protéines. Un jeu typique de résultats provenant d'une SDS-PAGE de protéines musculaires de poissons est représenté ici :

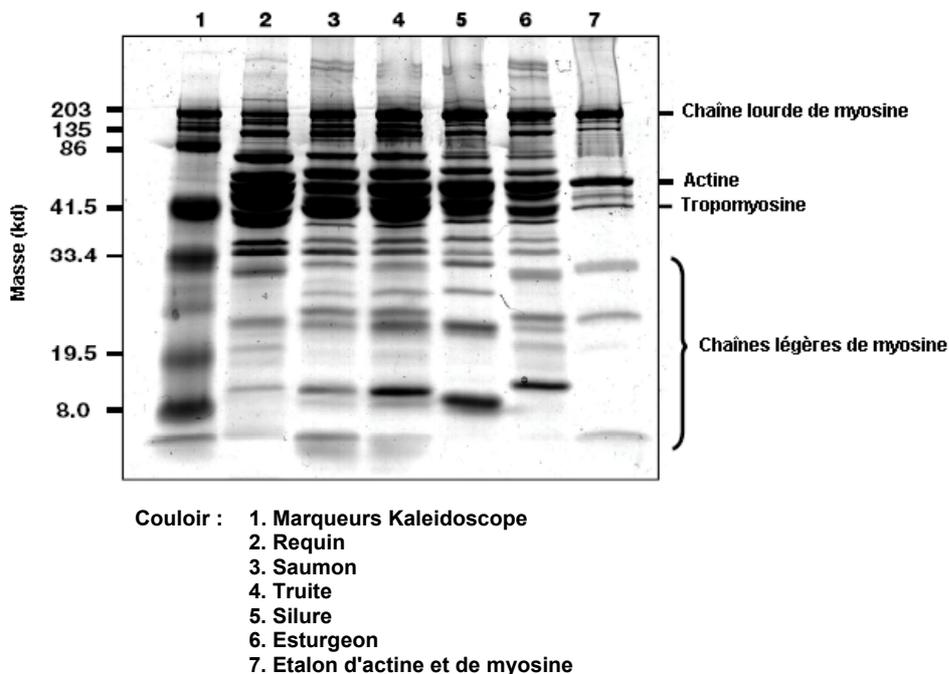


Figure 10. Gel de polyacrylamide Ready Gel soumis à une électrophorèse à 200 V pendant 30 minutes, coloré avec du colorant Coomassie Bio-Safe et décoloré dans de l'eau.

Les similarités et les différences évidentes entre les empreintes protéiques sont facilement repérées. En comparant les aspects des bandes du saumon (couloir 3) et de la truite (couloir 4), il est clair que ceux-ci sont très similaires. Par exemple, ils partagent une bande commune à approximativement 70 kd, ainsi qu'une paire de bandes à 20 kd. Cette similarité est cohérente avec l'arbre d'évolution des poissons qui est proposé (Figure 4), puisque le saumon et la truite se trouvent tous les deux sur la même branche. Au contraire, une comparaison du saumon (couloir 3) avec le silure (couloir 5) révèle des différences significatives dans leurs aspects. Une seule des bandes observées à approximativement 25 kd chez le saumon est présente chez le silure.

Construction d'une courbe étalon

Pour obtenir une description plus précise des empreintes protéiques, les bandes peuvent être analysées quantitativement. Tout comme l'électrophorèse sur gel d'agarose de fragments d'ADN, une courbe étalon de poids moléculaires est fabriquée en traçant les distances de migration (abscisse) des protéines dans un jeu de marqueurs contre leurs poids moléculaires connus (ordonnée) sur un tracé semi-log. Les poids moléculaires de protéines inconnues peuvent être alors estimés en mesurant leurs distances de migration et en trouvant les poids moléculaires correspondants sur la courbe étalon.

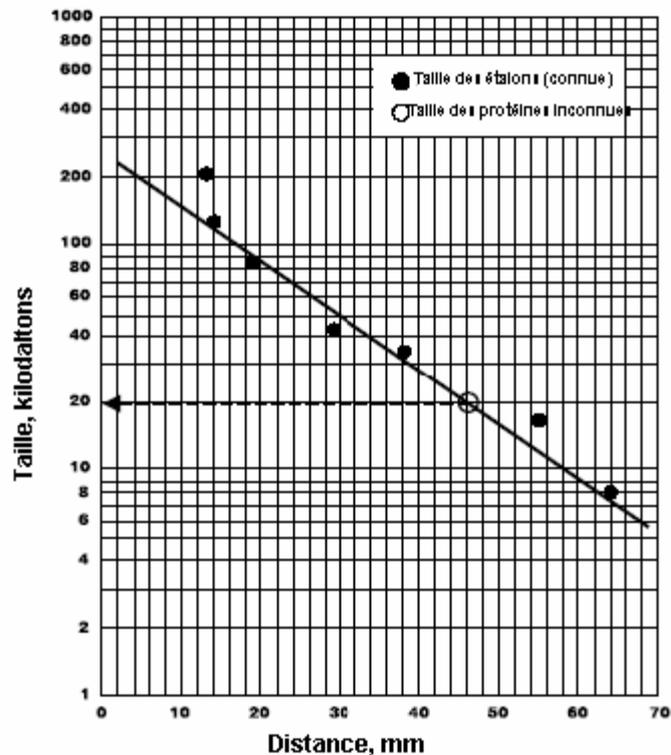


Figure 11. La distance parcourue par chaque protéine pré-colorée a été tracée contre sa taille sur le papier semi-log pour produire une courbe étalon.

Une autre détermination utile qui peut être faite à partir d'un gel de protéines est l'abondance relative en protéines. Les différentes protéines contenues dans un échantillon sont présentes dans des quantités différentes et la même protéine peut être présente à des concentrations différentes dans des échantillons différents. Une bande épaisse, large, colorée en foncé indique une abondance de molécules dans cette bande, par comparaison à une bande pâle ou étroite. A l'aide de ces informations, vous pouvez évaluer l'abondance de différentes protéines au sein d'un échantillon. Si des quantités égales de protéines totales sont chargées dans des couloirs d'échantillon différents, l'abondance d'une protéine particulière peut être comparée parmi des échantillons différents.

Identification de protéines dans un gel de polyacrylamide

Il est impossible d'identifier définitivement des protéines inconnues dans un gel de SDS-PAGE sans informations supplémentaires de confirmation. Dans une expérience comme celle-ci, chaque extrait protéique contient un mélange complexe de protéines. Les différentes protéines apparaissent sous la formes de bandes colorées en bleu distinctes sur le gel fini. D'après les positions et les intensités de ces bandes, nous pouvons déterminer la taille et l'abondance relative des protéines, mais nous ne pouvons faire que des suppositions éclairées à propos de l'identité de chaque protéine, d'après des références disponibles. Par exemple, parce que tous les échantillons proviennent de tissu musculaire, vous pouvez correctement supposer qu'il y aura de grandes quantités des protéines musculaires prédominantes, telles que l'actine et la myosine. L'échantillon d'actine et de myosine fourni dans ce kit vous permet de confirmer l'identité de ces deux protéines dans vos échantillons.

Même lorsque le poids moléculaire d'une protéine est connu et utilisé comme critère d'identification, il existe deux sources possibles d'erreur. La première, des bandes qui migrent presque identiquement sur un gel peuvent être en fait des protéines différentes de tailles très similaires. La seconde, des protéines de composition, de fonction et d'origine d'évolution très similaires peuvent être différentes en poids moléculaire, à cause de variations acquises lors de l'évolution. L'identification définitive d'une protéine nécessite la spectrométrie de masse, le séquençage ou l'immunodétection. Les techniques d'immunodétection, telles que l'analyse Western blot, utilisent des anticorps qui reconnaissent spécifiquement les protéines d'intérêt. De tels anticorps fournissent une identification positive lorsqu'il est impossible d'identifier des bandes uniquement par le poids moléculaire.

Ceci est la fin de la partie traitant de la théorie à la base des empreintes protéiques. Avant de se tourner vers le mode opératoire détaillé des travaux pratiques, nous proposons quelques idées sur comment présenter ces travaux pratiques en classe.

Idées sur comment présenter cette activité en classe

Approche de l'évolution : Les échantillons de muscles de poissons que vos élèves vont traiter sur leurs gels représentent de véritables produits de l'évolution. Avant que vos élèves commencent toute activité de travaux pratiques, faites-les observer l'arbre d'évolution pour voir les relations parmi les échantillons que vous avez choisis. Vous pourrez trouver dans les pages suivantes davantage d'informations et d'idées à propos des différentes familles de poissons que vous pourriez utiliser. Demandez à vos élèves de proposer des hypothèses quant à des différences auxquelles ils pourraient s'attendre dans les profils biochimiques parmi les échantillons. Par exemple, il faut s'attendre à ce que des espèces placées étroitement sur l'arbre montrent plus de similarités des protéines que les espèces placées à distance. Cette approche fait réfléchir les élèves sur comment des biologistes spécialisés en évolution ont reconstruit la progression de l'évolution et les lignées des espèces — traditionnellement grâce aux caractères morphologiques mais actuellement grâce à des données moléculaires. Après l'analyse sur les gels, voyez si les hypothèses des élèves étaient correctes.

Il existera beaucoup de similarités parmi les profils protéiques des échantillons, simplement parce qu'ils proviennent du même type de tissu. Néanmoins, il y aura des différences nettes parmi les échantillons — voir notre gel à la page 20. Vous pouvez voir que la truite et le saumon présentent des aspects très semblables, alors que les aspects du requin, de l'esturgeon et du silure sont distincts les uns des autres ainsi que de la truite et du saumon. D'autres organismes aquatiques, tels que la crevette, la moule, la praire et le crabe, peuvent être également incorporés dans ce mode opératoire de travaux pratiques pour une étude plus large de l'arbre d'évolution.

Approche des protéines : Vous pouvez tirer un avantage du fait que tous les échantillons proviennent de tissu musculaire et, par conséquent, les protéines plus abondantes dans chaque échantillon doivent être associées à la fonction musculaire. Cette approche, comme l'approche de l'évolution, peut être utilisée pour amener les élèves à réfléchir sur la corrélation entre les caractères au niveau tissu et organe, comme pour les muscles, et de quelles protéines ils sont composés.

Demandez à vos élèves de construire une courbe étalon en utilisant les marqueurs pré-colorés Kaleidoscope et/ou les standards d'actine et de myosine fournis dans ce kit. Ensuite faites-leur déduire les poids moléculaires des bandes "inconnues" prédominantes présentes dans leurs échantillons. Est-ce que l'un quelconque de ces poids moléculaires correspond aux tailles des protéines musculaires connues? Est-ce que certaines protéines sont plus abondantes chez un poisson par comparaison à un autre? Ou y a-t-il des protéines présentes chez des "vrais poissons" qui sont absentes chez les "crustacés"? Chez les poissons d'eau douce par rapport aux poissons d'eau de mer? Chez les poissons d'eaux froides par rapport aux poissons d'eaux chaudes? Et aussi en ce qui concerne des différences entre des poissons sédentaires et des poissons plus actifs? Même si un grand nombre de bandes de leurs échantillons ne peuvent pas être identifiées avec des noms et des fonctions, vous pouvez encourager vos élèves à réfléchir sur quels types de protéines peuvent se trouver chez des poissons d'environnements et de styles de vie différents. Par exemple, le flet est un poisson vivant sur les fonds et il est relativement inactif, tandis que le maquereau est un poisson des océans se déplaçant rapidement. Quels sortes de fonctions protéiques peuvent être associées à de tels styles de vie? Les espèces de poissons qui vivent dans des eaux très froides sont connues pour posséder des protéines "anti-congélation" (Davies et Hew 1990). Les protéines sont ce qui constitue les cellules, les tissus et les organes capables de fonctionner et de s'adapter de manières tellement diverses!

Approche de l'identification d'aliments : Voyez si vos élèves parviennent à découvrir la composition du surimi par comparaison à d'autres échantillons, tels que du vrai crabe, des crevettes, des écrevisses, des coquilles Saint-Jacques et de vrais poissons. Puisque le surimi est généralement constitué d'un poisson blanc, tel que le colin, vous devez pouvoir trouver des éléments semblables. Quels échantillons ressemblent le plus étroitement à l'échantillon de vrai crabe? Vous pouvez prévoir que des arthropodes, tels que le homard, l'écrevisse ou la crevette, montrent des aspects de bandes plus semblables avec le vrai crabe que les espèces de poissons. La détermination des profils des protéines et de l'ADN est utilisée dans l'industrie des produits de la mer dans cet objectif — pour détecter une dégradation ou un mauvais étiquetage des produits à base de produits de la mer conditionnés (Pifeiro et al. 1999).

Pourquoi les poissons?

Cet exercice de travaux pratiques se concentre sur des comparaisons d'espèces de poissons parce que les poissons représentent un groupe varié et ancien des vertébrés qui s'est adapté à tout un éventail d'habitats. En outre, une large diversité de spécimens est facilement disponible chez les poissonniers ou dans les eaux locales.

Pourquoi le tissu musculaire?

Les muscles de poissons sont faciles à préparer pour l'électrophorèse parce que, en général, ils sont pauvres en graisses et en tissu conjonctif résistant. Ceci permet d'extraire facilement les protéines et de produire des résultats fiables en trois étapes simples.

A NOTER Les tissus obtenus à partir d'insectes, d'animaux à sang chaud et de végétaux présentent un large éventail de textures et ils peuvent contenir des taux élevés, respectivement, de chitine, de lipides et de cellulose. Ces facteurs affectent la solubilité des protéines et peuvent produire des résultats médiocres.

Activité d'extension

1. Demandez à vos élèves d'utiliser les marqueurs protéiques pré-colorés Kaleidoscope et/ou les contrôles d'actine et de myosine pour créer une courbe étalon. Puis faites-leur estimer les poids moléculaires de plusieurs protéines inconnues présentes dans leurs échantillons de poissons. Utilisez le poids moléculaire estimé pour prédire le nombre d'acides aminés au sein d'une protéine, en utilisant 110 daltons comme le poids moyen d'un acide aminé. Par exemple : l'actine a un poids moléculaire de 43 kd (43000 daltons), aussi vous en déduisez qu'elle contient 391 acides aminés.
2. En utilisant une logique semblable, vous pouvez également demander à vos élèves d'estimer le nombre de paires de bases dans un gène qui code pour cette protéine de 43 kd. Etant donné que chaque acide aminé est codé par un triplet de nucléotides et que le poids moyen d'une paire de bases est de 660 daltons, vous pouvez donner une approximation de poids moléculaire du gène qui spécifie la protéine. Cette activité rappelle aux élèves la relation entre l'ADN et les protéines.
3. Discutez de toutes les différences trouvées entre les valeurs obtenues par les élèves et les valeurs connues. L'actine α de la carpe est en fait composée de 377 acides aminés qui sont codés par 1134 paires de bases.

Questions centrales

Q: De quelles informations avez-vous besoin pour calculer exactement le véritable poids moléculaire d'une protéine?

R: La véritable séquence d'acides aminés (ou d'ADN), et pas seulement le nombre d'acides aminés est nécessaire pour calculer exactement le véritable poids moléculaire d'une protéine.

Q: Pourquoi le poids que vous avez déterminé à partir d'un gel peut-il différer du véritable poids moléculaire?

R: Toutes les déterminations de poids moléculaire faites à partir d'un gel sont limitées par la précision de votre mesure qui peut ne pas être très exacte. Les valeurs estimées pour des protéines de poids moléculaire élevé seront moins exactes que pour de petites protéines parce que l'échelle de leur migration est tassée : c'est-à-dire plus les bandes progressent vers le bas du gel plus elles se séparent. L'actine (43 kd) et la chaîne lourde de la myosine (205 kd) fournissent un exemple instructif visible de cette discordance. Certaines protéines sont modifiées par des phosphates ou des glucides, ce qui les fait migrer d'une manière différente de celle attendue. Finalement, la courbe étalon n'est pas strictement linéaire, même lorsqu'elle est tracée sur du papier semi-log. Toutefois, la fonction log varie suffisamment lentement pour que la droite donne des estimations raisonnables du poids moléculaire.

Guide des travaux pratiques de l'enseignant

Cette partie présente les généralités de chaque jour de travaux pratiques. Sont fournis pour chaque journée de travaux pratiques, le cours, la préparation préalable, l'installation des postes de travail des élèves et les techniques et les concepts à souligner.

Préparation préalable des travaux pratiques des élèves

Emploi du temps suggéré pour les travaux pratiques des élèves

Les activités des travaux pratiques sont conçues pour être réalisées en trois périodes consécutives de travaux pratiques de 50 minutes ou en deux périodes de travaux pratiques de 2 heures, plus une période pour les discussions avant TP et après TP. Le mode opératoire détaillé des travaux pratiques pour chaque période se trouve dans les parties ci-dessous.

Déroulement de la mise en œuvre

2-3 jours	Avant TP	<ul style="list-style-type: none">• Lecture de fond• Considérations des élèves/questions centrales
50 minutes	Cours 1 des TP	<ul style="list-style-type: none">• Obtention des échantillons de muscles de toute une diversité d'espèces de poissons• Extraction et dénaturation des protéines des échantillons
50 minutes	Cours 2 des TP	<ul style="list-style-type: none">• Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE)• Coloration des gels, décoloration pendant une nuit
50 minutes	Cours 3 des TP	<ul style="list-style-type: none">• Analyse des empreintes protéiques

		<ul style="list-style-type: none"> • Construction des courbes étalons, détermination des poids moléculaires des protéines • Déduction des relations d'évolution d'après les résultats des élèves, comparaison aux arbres d'évolution
50 minutes	Analyse des données	<ul style="list-style-type: none"> • Discussion et/ou présentations des élèves

TP cours 1 – Extraction des protéines et préparation des échantillons

Préparation préalable de l'enseignant pour le cours 1 des TP

Généralités sur la préparation		Temps requis
Étape 1	Lire le matériel d'introduction dans les pages précédentes	2 à 3 heures
Étape 2	Obtenir des échantillons de poissons et de l'eau distillée en magasin	Selon les besoins
Étape 3	Installer les postes de travail des élèves et de l'enseignant	20 minutes

Liste de contrôle des travaux pratiques (✓)

Postes de travail des élèves. Les matériaux, consommables et instruments suivants doivent être présents à chaque poste de travail des élèves avant de commencer les activités de travaux pratiques. Les matériaux contenus dans ce kit sont prévus pour équiper 24 postes de travail de TP d'élèves.

Station de travail de l'enseignant. Les matériaux, consommables et instruments suivants doivent être présents à un emplacement commun accessible à tous les groupes d'élèves. C'est à l'enseignant de décider si les élèves doivent avoir accès aux solutions tampons et aux instruments qui sont communs ou s'il doit distribuer les solutions dans des microtubes.

Postes de travail des élèves		(✓)
Microtubes à essai de 1,5 ml EZ™	6 chacun	<input type="checkbox"/>
Microtubes à essai à bouchon à vis de 1,5 ml	7 chacun	<input type="checkbox"/>
Pipettes jetables de 1 ml	1 chacun	<input type="checkbox"/>
Echantillons de poissons (5 types)	~1 g de chaque	<input type="checkbox"/>
Marqueur indélébile, pointe fine	1	<input type="checkbox"/>
Tampon à échantillon de Laemmli	1,5 ml	<input type="checkbox"/>
Couteau ou ciseaux pour couper les échantillons de poissons	1	<input type="checkbox"/>
Poste de travail commun de l'enseignant		(✓)
Bain-marie ou plaque chaude réglée à 95°C	1	<input type="checkbox"/>
Tampon à échantillon de Laemmli — 30 ml	1	<input type="checkbox"/>
*Standards d'actine et de myosine — réhydraté	1 flacon	<input type="checkbox"/>
*Marqueurs pré-colorés Kaleidoscope — 500 µl	1 flacon	<input type="checkbox"/>

* Les marqueurs pré-colorés Kaleidoscope et les standards d'actine et de myosine peuvent être préparés avec les échantillons de poissons pendant le cours 1 des TP ou l'enseignant peut choisir de préparer ces deux réactifs préalablement pendant le cours 2 des TP.

Points du cours à souligner – Cours 1 des TP

Choix des spécimens de poissons

Ces travaux pratiques se concentrent sur la comparaison de différentes espèces de poissons qui sont disponibles dans votre région (en magasin ou dans l'environnement naturel). Veuillez vous reporter aux tableaux phylogéniques à la page 13 pour choisir les variétés appropriées pour l'expérience. Choisissez une diversité de différentes espèces de poissons, y compris des représentants provenant d'autant de branches que possible. L'idée est d'observer des poissons étroitement apparentés (même branche) et distants (branches différentes) à des fins de comparaison. Dans notre exemple à la page 20, nous avons utilisé du saumon, de la truite, du silure, de l'esturgeon et du requin. Les aspects des bandes des protéines pour différents groupes de poissons doivent révéler des similarités et des différences qui peuvent être comparées à l'arrangement de l'arbre d'évolution à la page 14. D'autres organismes aquatiques, tels que les crevettes, les moules, les praires, le crabe et le surimi peuvent être inclus dans cette activité pour analyser une partie plus large de l'arbre d'évolution.

Lorsque vous achetez vos poissons, gardez à l'esprit que vous n'avez besoin que d'une très petite quantité de chaque échantillon. Assurez-vous de bien garder la trace de chaque poisson !

Précautions de sécurité

Aucun produit chimique toxique n'est utilisé dans ces travaux pratiques. Toutefois, les bonnes pratiques de laboratoire doivent être suivies lors de la réalisation de tous les aspects de toute technique de laboratoire. Nous recommandons que les élèves portent des gants et des lunettes de sécurité lorsqu'ils manipulent les échantillons de poissons, les gels de polyacrylamide, le colorant des protéines et les autres réactifs utilisés dans cet exercice. Les gants ne protègent pas seulement les élèves d'une exposition aux réactifs, tels que le colorant bleu des protéines, mais ils protègent également les échantillons et les gels d'une contamination non souhaitée par les mains de vos élèves.

Assurez-vous que les élèves se lavent les mains et les paillasse après avoir travaillé avec les poissons!

Remarque : Les élèves souffrant d'allergies connues doivent éviter tout contact avec les échantillons de crustacés.

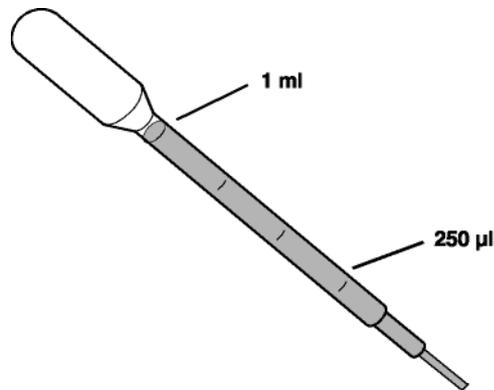


Figure 12. La pipette de transfert jetable est marquée à des intervalles de 250 µl

Avant de commencer les sessions de travaux pratiques, demandez aux élèves d'observer les graduations sur la pipette. La marque de 250 µl sera utilisée comme unité de base de mesure au cours de ces travaux pratiques.

Utilisation des micropipettes

Expliquez l'action à 2 arrêts de la micropipette digitale ajustable. Les micropipettes sont exactes et coûteuses, aussi insistez sur le fait qu'elles doivent être manipulées avec précaution. Expliquez également l'importance d'utiliser des embouts nouveaux pour empêcher toute contamination croisée et l'élimination appropriée des embouts usagés. La micropipette avec un volume fixe de 10 µl offre une alternative moins coûteuse et plus facile à utiliser, si vous le souhaitez.

Réactifs utilisés pendant le cours 1 des TP

Le **tampon à échantillon de Laemmli** est utilisé pour solubiliser les protéines dans les échantillons de muscles de poissons. Chaque bouteille contient 30 ml et il s'agit d'un mélange de tampon Tris, de détergent anionique SDS, de colorant de marquage de l'électrophorèse (Bleu de Bromophénol) et de glycérol. Le glycérol augmente la densité des échantillons de sorte qu'ils sombrent au fond des puits lorsqu'ils sont chargés.

A NOTER L'addition de β-mercaptoéthanol (BME) n'est pas recommandée pour ce mode opératoire de travaux pratiques. N'ajoutez pas de BME au tampon à échantillon. Suivez les instructions simples pour préparer les échantillons pour l'électrophorèse.

Marqueurs de poids moléculaire. Les marqueurs pré-colorés Kaleidoscope, également appelés marqueurs de poids moléculaire, arrivent dans un tube de microcentrifugeuse de 1,5 ml qui contient 500 µl de marqueurs en solution. Un tube contient assez de marqueur pour 40 gels. Stockez ce tube dans le congélateur jusqu'à ce que vous soyez prêt à l'utiliser. Décongelez les marqueurs Kaleidoscope à température ambiante et chauffez le tube brièvement à 37°C pour dissoudre tout SDS qui aurait précipité avant de distribuer les marqueurs. A la différence des standards d'actine et de myosine, les marqueurs Kaleidoscope n'ont pas besoin de chauffage à 95°C avant l'électrophorèse, bien que le chauffage n'affecte pas les marqueurs Kaleidoscope.

Vous pouvez choisir d'ajouter 12,5 µl des marqueurs Kaleidoscope, étiqueté EK, à chaque poste de travail d'élèves pendant le cours 1 des TP ou vous pouvez choisir d'ajouter 12,5 µl à chaque poste de travail d'élèves lorsque les élèves chargent leurs gels pendant le cours 2 des TP.

Standards d'actine et de myosine. Un échantillon contrôle contenant les protéines actine et myosine est fourni sous une forme lyophilisée qui est stable à température ambiante. Stockez ces protéines, avec les marqueurs Kaleidoscope, dans le congélateur pour une conservation à long terme sans risque. Pour réhydrater l'échantillon, ajoutez 500 µl de tampon à échantillon de Laemmli de Bio-Rad dans le flacon et incubez-le à température ambiante pendant 5 minutes. Transférez l'échantillon d'actine et de myosine réhydraté dans un tube à bouchon à vis étiqueté à l'aide d'une pipette de transfert en plastique jetable. Comme pour les échantillons de protéines de poissons, l'échantillon d'actine et de myosine doit être chauffé pendant 5 minutes à 95°C avant le chargement sur les gels.

Vous pouvez choisir de distribuer 12,5 µl de standards d'actine et de myosine réhydratés dans un tube avec un bouchon à vis, étiqueté AM, pour chaque poste de travail d'élèves à chauffer pendant le cours 1 des TP ou vous pouvez compléter vous-même la préparation des standards d'actine et de myosine et distribuer 12,5 µl à chaque poste de travail d'élèves juste avant que les élèves chargent leurs gels pendant le cours 2 des TP.

Mode opératoire des travaux pratiques pour le cours 1

Extraction et dénaturation des protéines de poissons

Pour chaque poisson à analyser :

1. Utilisez un marqueur indélébile pour étiqueter un microtube à bouchon de 1,5 ml avec le nom de chaque échantillon de poisson préparé pour l'électrophorèse. Etiquetez aussi un microtube à bouchon à vis pour chaque échantillon de poisson.
2. Ajoutez 250 μ l de tampon à échantillon de Laemmli dans chaque tube à bouchon de 1,5 ml étiqueté.
3. Prenez un morceau de chaque échantillon de muscle de poisson à analyser et coupez-le en un morceau approximativement de 0,25 x 0,25 x 0,25 cm³ ; évitez de prendre de la peau, de la graisse ou des arêtes. Transférez l'échantillon de poisson dans le microtube à bouchon étiqueté de manière appropriée et bouchez.
4. Tapotez doucement d'un doigt le microtube 15 fois pour agiter le tissu dans le tampon à échantillon.
5. Incubez les échantillons pendant 5 minutes à température ambiante pour extraire et solubiliser les protéines.
6. Versez soigneusement le tampon à échantillon contenant les protéines extraites, mais pas le morceau de poisson solide, dans un tube à bouchon à vis de 1,5 ml étiqueté.

Remarque : Il n'est pas nécessaire de transférer la totalité du liquide dans le tube à bouchon à vis. Seul un petit volume (< 20 μ l) est vraiment nécessaire pour le chargement des gels.

7. Chauffez les échantillons de poissons et les standards d'actine et de myosine (AM), si votre enseignant vous l'a fourni, pendant 5 minutes à 95°C pour dénaturer les protéines en préparation pour l'électrophorèse.
8. Vous pouvez stocker tous les échantillons à température ambiante s'ils doivent être chargés sur les gels dans les 3 à 4 heures qui suivent ou stockez-les à -20°C pendant plusieurs semaines.

Cours 2 des TP – Electrophorèse : Chargement du gel, migration et coloration

Préparation préalable par l'enseignant

Généralités sur la préparation		Temps requis
Etape 1	Revoir la partie sur l'électrophorèse aux pages 15 à 20	30 minutes
Etape 2	Préparer les réactifs et les autres éléments pour les postes de travail des élèves	15 minutes
Etape 3	Installer les postes de travail des élèves et de l'enseignant	20 minutes

Liste de contrôle des travaux pratiques

Postes de travail des élèves – Liste de contrôle quotidienne		(✓)
Extraits de protéines de poissons au TP cours 1	5 chaque	<input type="checkbox"/>
Embouts de pipette Prot/Elec pour charger les gels	7 embouts	<input type="checkbox"/>
Module d'électrophorèse Mini-PROTEAN 3 (cuve) – traite un ou deux gels	1	<input type="checkbox"/>
Plaque fantôme (si traitement de seulement 1 gel/cuve)	0,5-1	<input type="checkbox"/>
Alimentation électrique (200 V constants)	1	<input type="checkbox"/>
Micropipette de 1 à 20 µl	1	<input type="checkbox"/>
Gel pré-coulé Ready Gel, 15 % — 10 puits	1	<input type="checkbox"/>
Guide de chargement des échantillons – peigne pour 10 puits	1	<input type="checkbox"/>
Spatule en métal fin de pesée	1	<input type="checkbox"/>
*Standards d'actine et de myosine	1 flacon	<input type="checkbox"/>
*Marqueurs pré-colorés Kaleidoscope	1 flacon	<input type="checkbox"/>
Poste de travail (commun) de l'enseignant (✓)		
Tris-glycine-SDS (TGS) 1X pour électrophorèse, par poste de travail	350 ml	<input type="checkbox"/>
Colorant Coomassie Bio-Safe pour protéines, par plateau de coloration	40 ml	<input type="checkbox"/>
Plateaux de coloration		<input type="checkbox"/>
Bain-marie		<input type="checkbox"/>
Eau (l'eau du robinet convient à la décoloration des gels)	Selon les besoins	<input type="checkbox"/>

***Les marqueurs pré-colorés Kaleidoscope et les standards d'actine et de myosine peuvent être préparés avec les échantillons de poissons pendant le cours 1 des TP ou l'enseignant peut choisir de préparer ces deux réactifs préalablement au cours 2 des TP. Voir les étapes de la préparation préalable au cours 1 des TP pour des instructions détaillées.**

Réactifs et matériaux utilisés au cours 2 des TP

Extraits des protéines de poissons. Si les échantillons ont été congelés depuis le cours 1 des TP, décongelez-les simplement à température ambiante, chauffez-les brièvement (1 minute à 37°C ou 30 secondes à 95°C) pour dissoudre le détergent SDS, puis conservez les échantillons à température ambiante jusqu'à ce que vous soyez prêt à les charger.

Gels pré-coulés Ready Gel. Les gels doivent être stockés dans un réfrigérateur jusqu'au moment de leur utilisation. **Ne** congelez **pas** les gels.

Pour installer les gels pour les travaux pratiques, ouvrez les emballages des gels en les découpant au-dessus d'un évier ou d'un récipient, laissez l'excès de tampon s'égoutter et jetez le papier filtre et l'emballage en plastique. Retirez le peigne placé entre les plaques en poussant doucement dessus du bout des doigts vers le haut. Utilisez une lame de rasoir pour découper le long de la ligne noire imprimée sur la bande située au bas devant la cassette de gel et décollez la bandelette de plastique couvrant le bas devant le gel, comme il est indiqué sur la cassette de gel. Assurez-vous que toute la bande est entièrement retirée pour permettre à la longueur entière du bas du gel d'être exposée au courant électrique. Pour de meilleurs résultats, utilisez une pipette de transfert et du tampon de migration TGS 1X pour rincer les puits de tous débris.

Tampon de migration de l'électrophorèse (TGS 1X). Le tampon de migration Tris-glycine-SDS (TGS) arrive sous la forme d'une solution concentrée 10X (TGS 10X). Pour préparer une concentration de travail 1X, diluez 1 partie du concentré de TGS 10X avec 9 parties d'eau distillée ou déminéralisée. De l'eau distillée ou déminéralisée est utilisée pour préparer le tampon 1X parce que les impuretés présentes dans l'eau du robinet peuvent augmenter la conductivité du tampon. Approximativement 350 ml de tampon pour électrophorèse TGS 1X sont nécessaires pour chaque cuve.

Colorant de Coomassie Bio-Safe pour protéines. Le colorant est prêt à l'emploi. Les gels peuvent être transférés directement dans du colorant Coomassie Bio-Safe une fois l'électrophorèse complète. Si le temps le permet, les gels peuvent être rincés 3 fois avec de l'eau avant la coloration, comme il est indiqué sur l'étiquette du colorant Coomassie Bio-Safe. Le colorant Coomassie Bio-Safe pour protéines n'est pas réutilisable et il doit être éliminé selon les règlements locaux d'élimination des déchets (voir l'étiquette pour les détails).

Le temps de coloration optimal des gels est de 1 heure sous agitation douce, mais les gels peuvent être laissés dans le colorant jusqu'à 8 heures. La coloration pendant une nuit provoque la diffusion des protéines de poids moléculaire basse et doit être évitée. Pour décolorer, rincez le gel coloré avec plusieurs changements d'un grand volume d'eau et décolorez pendant une nuit avec de l'eau.

Mode opératoire des travaux pratiques au cours 2

Etape 1 : Préparation des échantillons, des gels et des cuves pour l'électrophorèse

Remarque : Réchauffer les échantillons congelés à 80 à 95°C pendant 2 à 5 minutes pour dissoudre tout détergent précipité.

Installation des gels et des cuves pour l'électrophorèse

Remarque : Les enseignants peuvent choisir d'assembler les cuves jusqu'à une heure avant les travaux pratiques.

1. Assurez-vous que le peigne et la bande le long du bas de la cassette Ready Gel ont été retirés. Si deux gels doivent être traités dans une cuve d'électrophorèse, placez une cassette Ready Gel de chaque côté de l'assemblage des électrodes, avec les plaques courtes tournées vers l'intérieur de l'assemblage. Si vous ne traitez qu'un seul gel dans la cuve, placez une cassette Ready Gel sur un côté de l'assemblage des électrodes et une plaque fantôme de l'autre côté (voir la figure à la page 42). Assurez-vous de placer le côté de la plaque fantôme sur lequel est inscrit "BUFFER DAM" dirigé vers l'assemblage des électrodes.
2. Ouvrez les barrières (cames) sur le devant du cadre d'immobilisation. Maintenez les deux cassettes Ready Gel ou le gel Ready Gel et la plaque fantôme, contre l'assemblage des électrodes et glissez l'assemblage des électrodes dans le cadre d'immobilisation.
3. Appuyez sur le bord externe de l'assemblage des électrodes, pas sur les gels, tout en fermant les cames du cadre d'immobilisation pour assurer un joint sur le bord inférieur de chaque cassette.
4. Placez le cadre d'immobilisation assemblé contenant le(s) gel(s) dans le réservoir de la cuve. Remplir la chambre supérieure de tampon, l'espace entre les deux gels, avec ~ 150 ml de tampon pour électrophorèse TGS 1X de sorte que le niveau du tampon soit au-dessus des plaques courtes internes. Vérifiez l'absence de fuites. Si l'assemblage fuit, retirez le cadre d'immobilisation assemblé, videz le tampon, rouvrez les cames, et appuyez de nouveau sur l'assemblage des électrodes tout en fermant les cames avant de remplir à nouveau avec du tampon.*
5. Versez ~ 200 ml de tampon pour électrophorèse TGS 1X dans la chambre inférieure de tampon ou réservoir. Vérifiez par deux fois le niveau de remplissage du tampon dans la chambre supérieure de tampon.

*Remarque : Si les fuites de la chambre supérieure de tampon ne peuvent pas être corrigées en réassemblant le cadre d'immobilisation dans l'étape 4, il est possible de remplir la chambre inférieure au-dessus des petites plaques internes pour égaliser les niveaux de tampon dans les deux réservoirs. Ceci nécessite approximativement 900 ml de tampon pour électrophorèse TGS 1X.

Etape 2 : Chargement et migration des gels d'électrophorèse

Placez un guide jaune de chargement des échantillons sur le haut de l'assemblage des électrodes. Le guide dirigera l'embout de la pipette vers la position correcte pour charger chaque échantillon dans un puits.

Attribuez les échantillons à des puits en chargeant les échantillons au milieu du gel, où la séparation est meilleure avec les marqueurs de chaque côté. Par exemple, pour 5 échantillons de poissons sur un gel à 10 puits, vous pouvez choisir de suivre ce guide :

Couloir	Volume	Echantillon
1	vide	Aucun
2	vide	Aucun
3	10 µl	Marqueurs pré-colorés
4	10 µl	Echantillon de poisson 1
5	10 µl	Echantillon de poisson 2
6	10 µl	Echantillon de poisson 3
7	10 µl	Echantillon de poisson 4
8	10 µl	Echantillon de poisson 5
9	10 µl	Standards d'actine et de myosine
10	vide	Aucun

Pour charger chaque échantillon, utilisez un embout fin de micropipette de chargement de gel pour prélever 10 µl de chaque échantillon de protéines dans son tube et transférez-les doucement dans le puits du gel désigné. Après le chargement de tous les échantillons, retirez le guide de chargement des échantillons, placez le couvercle sur le réservoir et insérez les fils électriques dans l'alimentation électrique, en faisant correspondre le rouge avec le rouge et le noir avec le noir.

Laissez les gels migrer pendant 30 minutes à une tension constante de 200 V.

Etape 3 : Coloration des gels

Portez des gants lorsque vous désassemblez et colorez les gels pour éviter de contaminer les gels avec des protéines humaines, ainsi que pour éviter de vous colorer la peau. Lorsque les gels ont fini de migrer, jetez le tampon de la chambre interne, libérez les cames et retirez les cassettes de gel de l'assemblage. Posez chaque cassette de gel à plat sur la pailasse avec la plaque courte dirigée vers le haut. Coupez la bande le long des côtés de chaque cassette de gel. Séparez soigneusement les plaques de gel du bout des doigts ou en utilisant une spatule de pesée. Le gel adhèrera à l'une des plaques. Transférez la plaque avec le gel y adhérent dans un plateau de coloration contenant du colorant de Coomassie Bio-Safe. Le liquide de coloration provoquera le détachement du gel de la plaque. En variante, le gel peut être soulevé doucement de la plaque dans le colorant.

Remarque : Si le temps le permet, les gels des élèves peuvent être rincés 3 fois, 5 minutes à chaque fois sous une agitation douce dans un grand volume d'eau pour éliminer le SDS des gels avant la coloration. Le SDS résiduel provoque un fond bleu temporaire de colorant de Coomassie Bio-Safe. Ce fond disparaît complètement lorsque les gels sont décolorés dans un grand volume d'eau pendant une nuit.

Colorez les gels pendant 1 heure. Pour de meilleurs résultats, agitez doucement le plateau pendant la période de coloration.

Etape 4 : Décoloration des gels

Une fois que les gels ont été colorés pendant au moins 1 heure, versez le colorant de Coomassie Bio-Safe et éliminez-le selon les règlements locaux pour l'élimination des déchets. Décolorez les gels avec un grand volume d'eau, en la changeant plusieurs fois si possible. Laissez les gels se décolorer pendant une nuit dans de l'eau, sous agitation douce pour de meilleurs résultats.

Remarque : Les petites protéines peuvent diffuser si les gels ne sont pas décolorés avec beaucoup d'eau.

Après la décoloration, des bandes bleues doivent être distinctes sur un fond transparent. Les gels peuvent être stockés dans de l'eau pendant une semaine avant qu'ils se dessèchent ou soient photocopiés.

Cours 3 des TP – Conservation des gels

Préparation préalable par l'enseignant

Généralités sur la préparation		Temps requis
Etape 1	Revoir la partie sur l'électrophorèse aux pages 15 à 20	30 minutes
Etape 2	Disposer et préparer les instruments et les consommables pour les postes de travail des élèves	10 minutes
Etape 3	Installer les postes de travail des élèves	20 minutes

Liste de contrôle des travaux pratiques

Postes de travail des élèves – Liste de contrôle quotidienne		(✓)
Eau (eau du robinet)	1	<input type="checkbox"/>
Feuilles de support en cellophane GelAir	2	<input type="checkbox"/>
Récipient en plastique carré (si vous n'utilisez pas un cadre de séchage GelAir) et bandes de caoutchouc	1	<input type="checkbox"/>
Poste de travail (commun) de l'enseignant (✓)		
Cadres de séchage GelAir	1	<input type="checkbox"/>
Table d'assemblage GelAir (facultatif)	1	<input type="checkbox"/>
Sécheur GelAir (facultatif)	1	<input type="checkbox"/>

Protocole des travaux pratiques au cours 3

1. Les gels décolorés peuvent être stockés dans de l'eau pendant une semaine avant le séchage. Les gels décolorés peuvent être placés dans une solution de séchage de gel pendant 30 minutes avant le séchage pour réduire les risques de craquelures des gels lors du séchage.
2. Les gels peuvent être séchés dans des cadres de séchage GelAir ou en faisant des sandwichs de cellophane GelAir sur des récipients en plastique carrés.

Remarque : Pour de meilleurs résultats, rognez le bord inférieur épais du gel avant le séchage.

Méthode du cadre de séchage GelAir :

A NOTER Utilisez cette méthode plus rapide si vous disposez de la table d'assemblage et des cadres de séchage GelAir (Référence 165-1776EDU). Autrement, utilisez le sandwich de cellophane GelAir et la méthode du récipient en plastique plus lente.

1. Pré-humidifiez 2 feuilles de cellophane dans un récipient d'eau pendant 15 à 20 secondes.
2. Placez un cadre de séchage en plastique sur la table d'assemblage GelAir. Centrez une feuille de cellophane sur la table d'assemblage.

3. Déposez et positionnez soigneusement les gels sur la cellophane. Jusqu'à 6 gels peuvent être disposés sur un cadre de séchage. S'il y a des bulles entre les gels et la cellophane, expulsez-les doucement par pression avec un doigt ganté.
4. Inondez les gels avec de l'eau. Déposez la seconde couche de cellophane au-dessus des gels, en essayant de ne pas emprisonner des bulles dans le sandwich. S'il y a des bulles, expulsez-les doucement par pression avec un doigt ganté. Les bulles provoqueront des craquelures dans le gel au cours du séchage!
5. Placez le cadre métallique carré au-dessus du sandwich de cellophane. Fixez les huit attaches sur le cadre, deux de chaque côté. Si vous n'utilisez pas un four de séchage GelAir, placez les cadres verticalement dans une zone bien ventilée pendant 12 à 36 heures.

Si vous disposez d'un sécheur GelAir, placez jusqu'à quatre cadres de séchage dans le four, allumez le four et régler le temps sur 3 heures. Le sécheur s'éteindra automatiquement.

6. Lorsque les gels sont complètement secs, ils seront plats. Retirez les attaches et prenez les sandwiches de gel et de cellophane du cadre. Avec des ciseaux, enlevez l'excès de cellophane entourant chaque gel séché.

En variante, vous pouvez utiliser la méthode GelAir du sandwich de cellophane et du récipient en plastique :

Humidifiez deux feuilles de cellophane dans un grand volume d'eau. Placez une feuille de cellophane au-dessus d'un récipient en plastique. Tendez la cellophane de sorte qu'elle forme une surface plate au-dessus du haut du réservoir et utilisez une bande en caoutchouc pour maintenir la feuille en place. Placez un gel sur la cellophane. Éliminez toutes les bulles d'air qui sont au-dessous ou autour du gel. L'inondation de la surface de la cellophane autour du gel aidera à l'élimination des bulles. Placez la seconde feuille de cellophane humidifiée sur le gel, en prenant soin de ne pas emprisonner des bulles. Maintenez la seconde feuille de cellophane sur la boîte avec une seconde bande en caoutchouc. Laissez le gel sécher pendant plusieurs jours dans une zone bien ventilée.

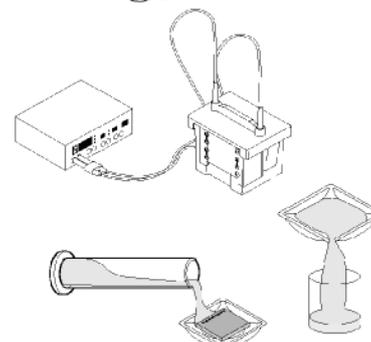
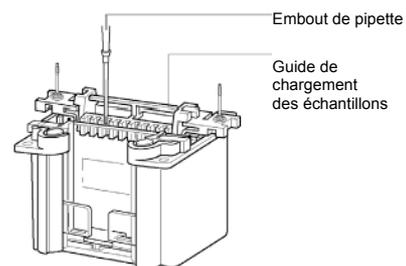
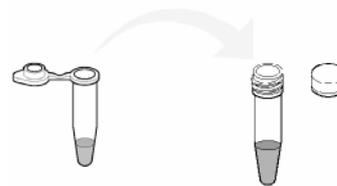
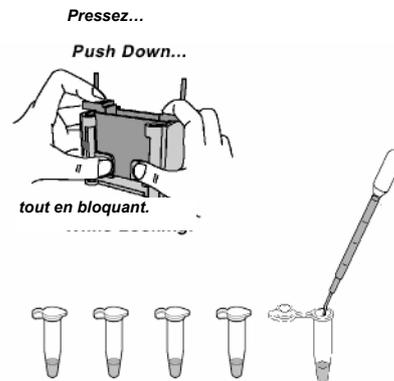
Kit des empreintes protéiques – Mode opératoire

1. Installez la cuve Mini-PROTEAN 3 et ajoutez du tampon pour électrophorèse TGS 1X dans la chambre.
2. Étiquetez un microtube à **bouchon** de 1,5 ml pour chacun des cinq échantillons de poisson. Étiquetez aussi un microtube à **bouchon à vis** pour chaque échantillon de poisson.
3. Ajoutez 250 µl de tampon à échantillon de Laemmli Bio-Rad dans chaque microtube à **bouchon**.
4. Coupez un morceau de chaque muscle de poisson d'environ 0,25 x 0,25 x 0,25 cm³ et transférez chaque morceau dans un microtube à essai à **bouchon** étiqueté. Bouchez les tubes.
5. Tapotez les microtubes 15 fois pour agiter le tissu dans le tampon à échantillon.
6. Incubez pendant 5 minutes à température ambiante.
7. Transférez soigneusement le tampon en le versant de chaque microtube à **bouchon** dans un microtube à **bouchon à vis** étiqueté. Ne transférez pas le poisson!
8. Demandez les marqueurs pré-colorés Kaleidoscope (KS) et les standards d'actine et de myosine à votre enseignant.
9. Chauffez les échantillons de poisson et les standards d'actine et de myosine (AM) dans les microtubes à bouchon à vis pendant 5 minutes à 95°C.

10. Chargez votre gel :

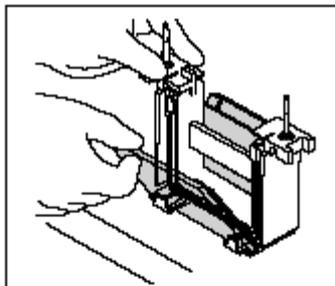
<u>Couloir</u>	<u>Volume</u>	<u>Echantillon</u>
1 et 2	vide	vide
3	10 µl	Marqueurs Kaleidoscope (KS)
4	10 µl	échantillon de poisson 1
5	10 µl	échantillon de poisson 2
6	10 µl	échantillon de poisson 3
7	10 µl	échantillon de poisson 4
8	10 µl	échantillon de poisson 5
9	10 µl	Standards d'actine et de myosine (AM)
10	vide	vide

11. Effectuer l'électrophorèse pendant 30 minutes à 200 V dans du tampon pour électrophorèse TGS 1X.
12. Après l'électrophorèse, retirez le gel de la cassette et transférez le gel dans un récipient avec 40 ml de colorant de bleu Coomassie BioSafe et colorez le gel pendant 1 heure, sous agitation douce pour de meilleurs résultats.
13. Jetez le colorant et décolorez les gels dans un grand volume d'eau pendant au moins 30 mn jusqu'à une nuit, en changeant l'eau au moins une fois. Les bandes colorées en bleu seront visibles sur un gel transparent après décoloration.
14. Séchez les gels avec la cellophane GelAir.



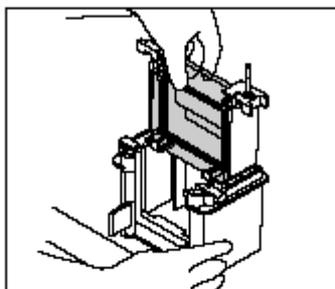
Assemblage du module d'électrophorèse Mini-PROTEAN 3

1. Préparez une cassette Ready Gel en coupant le long de la ligne noire imprimée sur le bas de la cassette avec une lame de rasoir et tirez sur la bandelette de plastique, comme il est indiqué sur la cassette de gel.



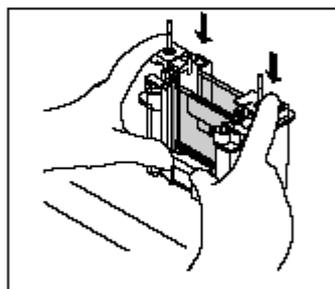
2. Retirez le peigne de la cassette Ready Gel.

3. Placez la cassette Ready Gel dans l'assemblage des électrodes avec la plaque courte tournée vers l'intérieur. Placez une plaque fantôme ou une autre cassette Ready Gel du côté opposé de l'assemblage des électrodes, avec l'encoche sur la plaque fantôme tournée vers l'intérieur.



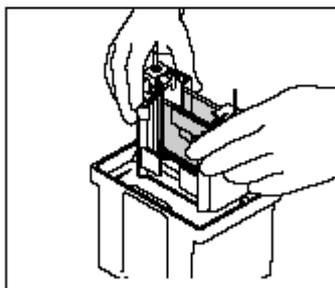
4. Glissez la cassette de gel, la plaque fantôme et l'assemblage des électrodes dans le cadre d'immobilisation.

5. Appuyez sur l'assemblage des électrodes tout en fermant les deux leviers de came du cadre d'immobilisation.



6. Abaissez la chambre interne dans le mini-réservoir.

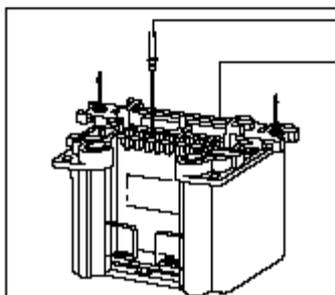
7. Remplissez complètement la chambre interne avec du tampon pour électrophorèse TGS 1X, en vous assurant que le tampon recouvre la plaque courte (~ 150 ml).



8. Remplissez le mini-réservoir avec approximativement 200 ml de tampon pour électrophorèse TGS 1X.

9. Placez le guide de chargement des échantillons en haut de l'assemblage des électrodes.

10. Chargez les échantillons et traitez le gel à 200 V pendant 30 minutes.



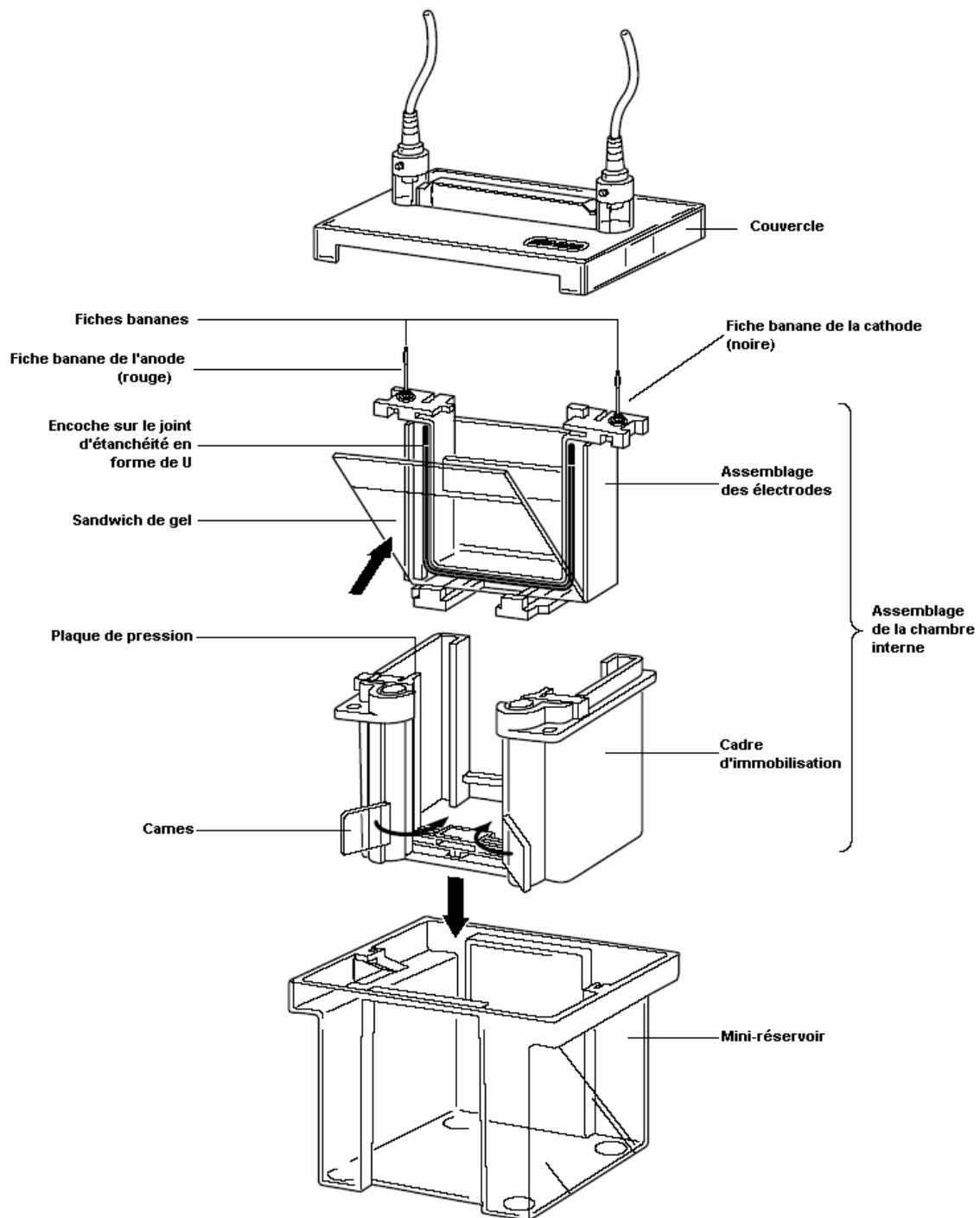


Figure 13. Assemblage de la cellule Mini-PROTEAN 3