

Directives de préparation des échantillons en gel pour les besoins de l'analyse par MS

Découpage et conservation des bandes de gel

Tout d'abord, nous recommandons d'utiliser de 100 à 500 ng d'étalons Bio-Rad non colorés comme marqueurs de poids moléculaire (numéro de catalogue 161-0317). Vous obtiendrez ainsi – et nous aussi – une idée générale de la quantité de protéines dans chaque bande.

Gardez au moins un puit vide entre chaque condition ou échantillon.

Portez un sarrau de laboratoire propre, des gants en **nitrile**, un bonnet et un masque propres pour manipuler le gel (particulièrement lors du découpage des bandes/pastilles [*spots*]).

Utilisez des tubes et des articles de verrerie propres (nettoyez 2 ou 3 fois avec un mélange 50/50 d'eau et d'acétonitrile de qualité HPLC) et des embouts de pipettes propres (nettoyez 2 ou 3 fois avec la solution de travail/tampon).

Taillez les bandes/spots dans une salle blanche (si possible) ou sur une paillasse propre, loin des endroits passants. **NE PAS TRAVAILLER DANS UNE HOTTE CHIMIQUE.**

Lorsque la coloration est terminée, prenez une image du gel dès que possible. Il est très important de nous fournir cette image lors de la soumission des échantillons. Le gel ne doit pas être exposé à l'air trop longtemps (couvrez-le autant que possible).

Il n'est pas recommandé d'entreposer le gel pendant une longue période. Avec le temps, les protéines s'oxyderont et se dégraderont, et la qualité des résultats en sera affectée.

De préférence, le gel doit être humide et maintenu dans **l'eau** si vous êtes prêt à découper les bandes de gel. Autrement, le gel peut se conserver dans une des solutions de décoloration suivantes pendant quelques jours, à 4 °C :

- 50:10:40 méthanol:acide acétique:eau
- 30:7:63 méthanol:acide acétique:eau
- 30:7:63 éthanol:acide acétique:eau

N.B. Immergez le gel dans l'eau pendant 30 minutes avant de découper les bandes/spots de gel.

Dès que possible, sélectionnez les bandes/spots de gel et découpez-les sur une plaque propre ou dans le bassin de décoloration, au moyen d'un scalpel et de pinces propres. Placez le morceau de gel découpé dans un tube propre de 1,5 ml (nous recommandons de le laver deux fois avec de l'eau qualité HPLC), puis ajoutez 10-20 uL d'eau de qualité supérieure. Coupez les bandes/spots de gel le plus près possible de la zone colorée, en conservant bien les dimensions suivantes :

Épaisseur du gel : 1 mm (épaisseur idéale pour nous)
Hauteur : de 2 à 5 mm
Largeur : de 5 à 10 mm

Pour les spots de gel 2D :
Minimum : 3 sur 3 mm
Maximum : 6 sur 6 mm

Épaisseur du gel : 1,5 mm
Hauteur : de 1 à 3 mm
Largeur : de 5 à 7 mm

N.B. Nous pourrions exclure les bandes trop petites. Pour les bandes trop grosses, elles seront divisées et considérées comme plusieurs échantillons, auquel cas des frais supplémentaires s'appliqueront.

Ne conservez pas le gel dans du glycérol – contamination.

Ne séchez pas le gel sur du papier filtre – contamination.

Évitez de sécher le gel entre des couches de pellicule transparente – contamination.

Conservez les bandes/spots de gel à 4 °C (si elles sont entreposées moins d'une journée), sinon à -80 °C.