

## Méthodes de visualisation du gel

Utilisez des solutions ou des tampons frais pour toutes les étapes (ou des solutions/ tampons conçus pour les échantillons de protéomique). Portez un sarrau de laboratoire, des gants, un bonnet et un masque propres pour manipuler le gel (particulièrement à la coupe des bandes/spots). Utilisez 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).

Couvrir autant que possible le contenant du gel avec une pellicule plastique (en fait, le gel ne doit pas être exposé à l'air trop longtemps). UTILISEZ UN CONTENANT EN VERRE.

### Coloration au nitrate d'argent :

Limite de détection (visuelle) d'environ 1 à 10 ng (méthode non quantitative)

SUIVEZ NOTRE PROTOCOLE DE COLORATION AU NITRATE D'ARGENT (voir plus bas). Il est peu coûteux, mais efficace (voir ci-dessous).

**N.B. Évitez la surcoloration (les bandes surcolorées peuvent être difficiles à identifier au moyen de l'analyse par LC-MS/MS). Tentez plutôt d'augmenter la quantité de protéines.**

- Ce protocole de décoloration crée des artéfacts (sulfonation/sulfatation) pour l'identification des sites phosphorylés. Utilisez plutôt une coloration au bleu de Coomassie ou au bleu de Coomassie colloïdal, ou encore une coloration fluorescente.

### Bleu de Coomassie (R-250) :

Protocole économique, semi-quantitatif et simple

Limite de détection : environ de 60 à 100 ng

Recouvrez le gel de solution de coloration (0,1% CBB R-250, 50 % méthanol, 10 % acide acétique) et incubez de 0,5 à 4 h. Décantez puis rincez rapidement le gel avec de l'eau analytique pour éliminer la coloration résiduelle, puis décantez à nouveau.

Décolorez le gel dans 30 à 50 % de méthanol : 5 à 10 % d'acide acétique: eau analytique, puis décantez.

Laissez tremper 30 minutes dans l'eau avant de découper les bandes.

### Bleu de Coomassie colloïdal (G-250) :

Recommandé pour la visualisation et la spectrométrie de masse

Limite de détection : environ de 2 à 10 ng

Nettoyez le gel (10-15 minutes) dans de l'eau analytique pour diluer le SDS, puis décantez.

Recouvrez légèrement le gel de bleu de Coomassie colloïdal (de 4 à 6 heures), puis décantez.

Rincez 2 fois avec de l'eau analytique (1 minute), puis décantez.

Décolorez le gel avec de l'eau de qualité analytique jusqu'à ce que la couleur de fond soit pâle (environ 4 heures).

Laissez tremper 30 minutes dans l'eau avant de découper les bandes.

### Méthodes de coloration fluorescente :

Sypro Ruby/Red/Orange/Tangerine, Ruthenium II, Deep Purple

Méthodes très sensibles, quantitatives (ordres de magnitude), simples, plus coûteuses et nécessitant une plaque UV pour la visualisation et la coupe des bandes.

Limite de détection d'environ 1 à 10 ng, méthode privilégiée pour les protéines de faible abondance

Suivre le protocole du fabricant.

*Avertissement : La photo-instabilité survient à une « demi-vie » d'environ 15 minutes dans les transilluminateurs.*

Laissez tremper 30 minutes dans l'eau avant de découper les bandes.

### Coloration au nitrate d'argent pour l'analyse par LC/MS/MS

Utilisez un contenant en verre propre pour colorer le gel et **ne touchez pas le gel avec les mains**.

Un grand gel nécessitera entre 250 et 500 ml de chaque solution. Tous les lavages et rinçages nécessitent une légère agitation.

1. Fixez le gel dans 50 % méthanol : 10 % acide acétique pendant 30 minutes. Répétez une fois : au moins 2 heures ou pour la nuit.
  - 125 ml de méthanol + 25 ml d'acide acétique + 100 ml de H<sub>2</sub>O
2. Rincez le gel avec 20 % d'éthanol pendant 20 minutes.
  - 50 ml éthanol + 200 ml H<sub>2</sub>O
3. Rincez le gel dans l'eau pendant 20 minutes.
4. Procédez à la réduction du gel avec du thiosulfate de sodium (0,2 g/L) pendant 2 minutes.
  - 0,05 g de thiosulfate de sodium + 250 ml de H<sub>2</sub>O

**N.B. Réservez 25 ml pour l'étape 8 (pour la solution de développement).**
5. Rincez deux fois à l'eau pendant 20 secondes.
6. Incubez dans du nitrate d'argent (2 g/L) pendant 30 minutes.
  - 0,5 g de nitrate d'argent + 250 ml de H<sub>2</sub>O
7. Rincez une fois à l'eau pendant 20 secondes.

- Nettoyez le gel au moyen de la solution de développement (environ de 100 à 200 ml), jetez la solution et développez à l'intensité désirée avec le reste de la solution de développement.

La solution de développement contient du carbonate de sodium (30 g/l), du formaldéhyde (1,4 ml d'une solution à 37 %/l) et du thiosulfate de sodium (10 mg/l, soit 25 ml de la solution précédente, étape 4, pour 500 ml).

- 15 g de carbonate de sodium + 475 ml d'eau (H<sub>2</sub>O)
  - 25 ml de thiosulfate de sodium (0,2 g/L) – étape 4
  - 700 µl de formaldéhyde
- Cessez la réaction en remplaçant la solution de développement par 1 % (v/v) d'acide acétique. Incubez pendant au moins 30 minutes.
    - 2,5 ml d'acide acétique + 250 ml H<sub>2</sub>O

**IMPORTANT :** Évitez de développer le gel pendant plus de 4 minutes, puisque la coloration réduit la sensibilité au niveau de l'analyse protéomique (notez le temps de développement).

Entreposez à -80 °C. Les bandes peuvent être congelées pendant des mois.

## Produits

Thiosulfate de sodium	S446-500	Fisher
Nitrate d'argent	S181-25	Fisher
Carbonate de sodium	S263-3	Fisher
Formaldéhyde	F79-4	Fisher
Acide acétique, glacial	A38 212	Fisher