

Immunologie

Réf :
115 038


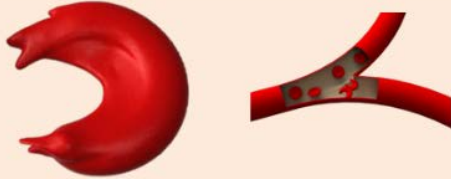
Français – p 1

Kit électrophorèse drépanocytose HBA-HBS

Version : 4110

1 Introduction

La drépanocytose ou anémie falciforme est due à une anomalie de l'hémoglobine, une protéine présente dans les hématies qui assure le transport du dioxygène des poumons aux organes.

PHÉNOTYPE MOLÉCULAIRE Dépistage par électrophorèse	Hémoglobine normale	Hémoglobine drépanocytaire
PHÉNOTYPE CELLULAIRE Dépistage par la forme des hématies	 Hématies en forme de coussin	 Hématies en forme de faucille
Fonction et pathologie	Souples, elles peuvent se déformer pour passer dans les capillaires, et assurer le transport d'O ₂	Déformées par l'hémoglobine drépanocytaires et rigides, ces hématies finissent par obstruer les capillaires. L'individu souffre d'anémie, d'accidents vasculaires et d'infections bactériennes graves.

2 Objectifs et Principes

- Mise en évidence de la différence de migration des hémoglobines S et A
- Variation du phénotype

3 Mode opératoire

Durée de préparation : 20 minutes

Durée de réalisation en classe : 1 heure 30

4 Composition

- 1 **sachet** à stocker au congélateur (-20 °C) pour conservation jusqu'à 3 mois. Sinon, se conserve 1 semaine au réfrigérateur (+4 °C).
- Microtube **bleu** : Solution Hémoglobine **A** 300 µL
- Microtube **rouge** : Solution Hémoglobine **S** 300 µL
- 1 **carton** contenant les consommables **chimiques suivants** :
 - 1 flacon de Rouge ponceau 500 mL
 - 1 sachet de Tampon Tris Glycine
 - 1 sachet de 25 bandes polyphorèses

5 Matériel complémentaire

- 1 bac pour imprégnation des bandes polyphorèses
- Pour le mélange A/S : 1 microtube et une micropipette (100 µl)
- Micro capillaires 100 µl
- Coloration : acide éthanoïque 80 %, bac de coloration
- Papier absorbant

6 Préparation

6.1 Préparation du tampon

Verser le contenu du sachet de tampon TRIS GLYCINE dans 1,5 litre d'eau déminéralisée.

6.2 Préparation des bandes d'acétate de cellulose (bandes polyphorèses)

Les bandes de cellulose sont conservées dans le méthanol. Elles sont placées entre deux lames de protection en plastique translucide et conservées dans le méthanol à 35 %.

Remplacer ce conservateur par du tampon Tris glycine afin que la migration des protéines soit possible dans un champ électrique.

Dans un récipient, verser environ 250 mL de tampon, sortir du paquet le nombre de bandes nécessaires à l'expérience. Prélever une à une le nombre de bandes nécessaires à l'aide d'une pince. Déposer les bandes dans le récipient et les laisser immergées 10 à 15 minutes dans le tampon pour l'imprégner et éliminer le méthanol. Le reste des bandes peut être stocké dans une solution de méthanol.

6.3 Préparation des solutions d'hémoglobine

Les hémoglobines HbS et HbA sont prêtes à l'emploi.

Reconstituer dans un microtube l'hémoglobine A/S en prélevant 100µl de HbA et 100µL de HbS.

Mélanger à l'aide de la micropipette en effectuant plusieurs aspirations/ expulsions successives.

7 L'électrophorèse

7.1 Le montage

Préparer 3 bandes d'acétate par groupe (8 groupes sont possible à partir du kit).

La quantité d'hémoglobine fournie est largement supérieure au besoin.

Si vous disposez de bandes polyphorèse supplémentaires, il est possible de faire d'autres groupes. (Une alternative sur gel d'agarose est également réalisable, voir ci-après)



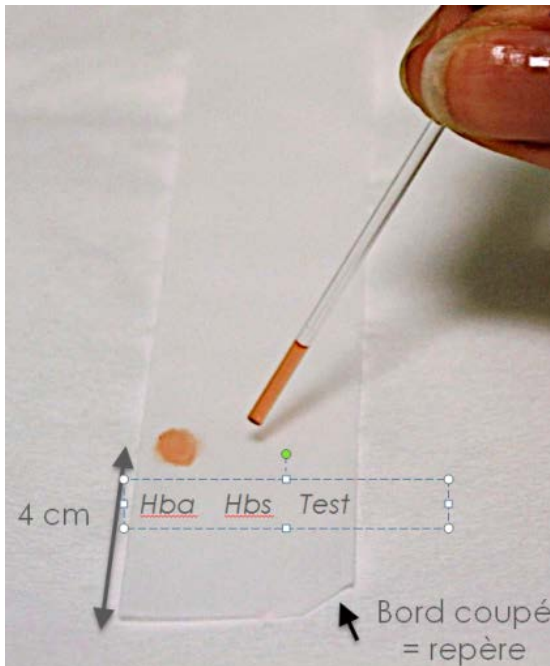
Attention : Le méthanol est une substance très toxique, le manipuler avec précaution



7.2 Mise en place des bandes d'acétate de cellulose dans la cuve

- Remplir chaque compartiment de la cuve de tampon en évitant tout débordement.
- Sortir les bandes des bacs à l'aide d'une pince plate. Les placer entre deux feuilles de papier filtre et les sécher à l'aide d'un mouvement rapide de la main.
- Prendre le portoir de la cuve à électrophorèse.
- Poser les bandes sur le portoir : le coin coupé de la bande en bas à droite (ainsi, la bande est sur la face mate qui est absorbante).
- Tendre les bandes en tirant sur l'extrémité libre à l'aide de la pince plate.
- Les bandes doivent être parallèles entre elles et perpendiculaires à l'axe du portoir pour permettre une migration des protéines dans l'axe de la bande.
- Poser le portoir dans la cuve et vérifier que les extrémités de chaque bande trempent dans le tampon de chacun des deux compartiments.

7.3 Dépôt des hémoglobines



À l'aide d'un capillaire 100 µl (ou une micro pipette) prélever une hémoglobine dans le microtube (les tampons applicateurs standards sont le plus souvent trop larges pour accéder au fond du microtube).

Le dépôt est effectué rapidement, faire un trait de 5 à 8 mm de long perpendiculairement à l'axe de la bande et situé à un centimètre du support de la bande du côté de la cathode (borne noire). Le dépôt ne doit pas couler d'où la nécessité de bien tendre la bande ni former une grosse goutte.

Pour effectuer une comparaison entre les 3 types d'hémoglobines : faire une bande Hb A, Une Hb S et une Hb A/S

Il faut identifier les bandes HbA, HbS et Hb A/S soit à l'aide d'un marqueur soit en faisant un repère à l'aide de ciseau. Il est également important de repérer le point de dépôts en faisant une encoche à l'aide d'un ciseau pour permettre de comparer les distances parcourues entre HbA et HbS.

7.4 Mise en route de l'électrophorèse

Fermer la cuve à l'aide du couvercle.

Relier la cuve au générateur à l'aide des cordons.

Régler la tension sur 160 volts et mettre sous tension le générateur. Laisser au minimum 1 heure pour visualiser la séparation du mélange A/S.

8 Résultats

8.1 Arrêt de l'électrophorèse (au bout d'1 heure) et coloration des bandes

Pendant le temps de migration, remplir le premier compartiment du bac à coloration de rouge Ponceau. Remplir les compartiments restants du bac à coloration d'acide éthanoïque à 5 % (5 mL d'acide éthanoïque 80 % dans 100 mL d'eau distillée).

Arrêter l'électrophorèse. Débrancher les cordons reliés à la cuve et retirer le couvercle.

Sortir le portoir de la cuve.

Vous pouvez réaliser une observation directe de la migration pour comparer les distances parcourues.

Prendre chaque bande à l'aide d'une pince plate pour la coloration.

Immerger la bande dans le compartiment contenant le rouge Ponceau.

Laisser la bande se colorer pendant environ 1 minute.

Puis tremper la bande dans des bains successifs d'acide éthanoïque à 5 %. La bande est changée de compartiment lorsque la solution d'acide éthanoïque est saturée en rouge Ponceau.

Dans le dernier compartiment d'acide éthanoïque à 5 %, le fond de la bande doit être redevenu blanc, seules les protéines apparaissent sous forme de tâches rouges.

Sortir la bande du dernier compartiment et la sécher entre 2 feuilles de papier filtre.

8.2 Résultats attendus

Pour comparer les migrations, veiller à positionner les encoches au même niveau.



1 seul dépôt par bande



Plusieurs dépôts par bande

9 Électrophorèse sur gel d'agarose

On peut réaliser cette électrophorèse en remplaçant les bandes d'acétate par un gel d'agarose.

Pour cela il est nécessaire d'intégrer un marqueur pour suivre la migration.

10 Service après-vente

Pour toute question, veuillez contacter :

JEULIN – S.A.V.
468, rue Jacques Monod
CS 21900
27019 EVREUX CEDEX France

0 825 563 563 *

* 0,15 € TTC/ min à partir d'un poste fixe

Assistance technique en direct

Une équipe d'experts
à votre disposition
du lundi au vendredi
de 8h30 à 17h30

- Vous recherchez une information technique ?
- Vous souhaitez un conseil d'utilisation ?
- Vous avez besoin d'un diagnostic urgent ?

Nous prenons en charge
immédiatement votre appel
pour vous apporter une réponse
adaptée à votre domaine
d'expérimentation :
Sciences de la Vie et de la Terre,
Physique, Chimie, Technologie.

Service gratuit*

0 825 563 563 choix n°3**

* Hors coût d'appel. 0,15 € TTC/min à partir d'un poste fixe.

** Numéro valable uniquement pour la France
métropolitaine et la Corse. Pour les DOM-TOM et les EFE,
composez le +33 2 32 29 40 50.

Aide en ligne
FAQ.jeulin.fr

Direct connection for technical support

A team of experts
at your disposal
from Monday to Friday
(opening hours)

- You're looking for technical information ?
- You wish advice for use ?
- You need an urgent diagnosis ?

We take in charge your request
immediately to provide you
with the right answers regarding
your activity field : Biology, Physics,
Chemistry, Technology.

Free service*

+33 2 32 29 40 50**

* Call cost not included.

** Only for call from foreign countries.



468, rue Jacques-Monod, CS 21900, 27019 Evreux cedex, France

Métropole • Tél : 02 32 29 40 00 - Fax : 02 32 29 43 99 - www.jeulin.fr - support@jeulin.fr

International • Tél : +33 2 32 29 40 23 - Fax : +33 2 32 29 43 24 - www.jeulin.com - export@jeulin.fr

SAS au capital de 1 000 000 € - TVA intracommunautaire FR47 344 652 490 - Siren 344 652 490 RCS Evreux