

CHROM. 7553

CONTRIBUTION À L'ÉTUDE DE LA POLYMÉRISATION DES GELS DE POLYACRYLAMIDE DESTINÉS À ÊTRE UTILISÉS EN ÉLECTROPHORÈSE

I. ÉTUDE DE QUELQUES FACTEURS AYANT UNE INFLUENCE SUR LA CINÉTIQUE DE LA RÉACTION DE POLYMÉRISATION

Y. PEGON et Cl. QUINCY

Laboratoire de Chimie Analytique, U.E.R. des Sciences Pharmaceutiques, 69008-Lyon et Laboratoire de Biochimie, Hôpital Neurologique, 69394-Lyon (France)

(Reçu le 6 mai 1974)

SUMMARY

Studies on the polymerization of polyacrylamide gels used for electrophoresis. I. Effect of several factors on the kinetics of the polymerization reaction

The effects of acrylamide, bisacrylamide, N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine and persulphate concentrations and of pH on the kinetics of the polymerization reaction of polyacrylamide gels were studied. From the results obtained, it is possible to produce more quickly gels suitable for electrophoresis.

INTRODUCTION

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide est une méthode très utilisée pour réaliser la séparation des protéines et des peptides^{1,2} même de faible poids moléculaire^{3,4} tant à l'échelle microanalytique qu'à l'échelle préparative.

Le gel de polyacrylamide est formé par copolymérisation d'un monomère: l'acrylamide et d'un agent de pontage: le bisacrylamide, au moyen de différents systèmes catalyseurs. Le polymère obtenu présentant une structure poreuse, on peut ajuster la taille de ses mailles de façon à obtenir un effet de filtration moléculaire en faisant varier la concentration en monomère.

Mais la structure du gel va dépendre également des conditions dans lesquelles a lieu la réaction de polymérisation et, en particulier, de la vitesse de cette réaction. Peu de chercheurs se sont intéressés à l'influence des différents facteurs pouvant permettre de contrôler cette vitesse, bien qu'elle détermine en partie la structure du gel, comme l'ont montré Kingsbury et Masters⁵. Parmi les rares travaux effectués, ces mêmes auteurs ont étudié l'influence de la concentration en catalyseur (persulfate) sur la vitesse de polymérisation mesurée par le temps mis pour voir apparaître une surface nette à la limite supérieure du gel.

Watkin et Miller⁶ ont suivi la réaction de polymérisation par spectrophoto-

métrie, l'acrylamide présentant une bande d'absorption à 200 nm due à l'amide insaturée en positions α , β qui disparaît au cours de la réaction. Ces auteurs n'ont publié que très peu de résultats.

Le but de ce travail est l'étude de l'influence de plusieurs paramètres: pH, concentration en acrylamide, en bisacrylamide et en catalyseurs sur la cinétique de la réaction de polymérisation. Pour cela, nous avons utilisé, comme Watkin et Miller, une méthode spectroscopique basée sur la mesure de la variation de l'absorbance des gels en cours de polymérisation, à 280 nm, afin d'obtenir des valeurs compatibles avec l'appareillage utilisé (absorbance maximale 2 D.O.), l'absorbance à 200 nm étant trop élevée.

Sur les courbes représentant l'absorbance en fonction du temps, nous avons déterminé trois valeurs (Fig. 1):

(1) La période d'induction, P_I , qui est égale au temps pendant lequel l'absorbance de la solution reste constante. Elle correspond en pratique au temps nécessaire pour voir apparaître une surface nette à la limite supérieure du gel.

(2) La vitesse de réaction, V_R , évaluée en déterminant la pente de la partie linéaire de la courbe lors de la décroissance de l'absorbance.

(3) Le temps P_{95} pour avoir un degré d'avancement de la réaction de polymérisation égal à 95%, de celui obtenu lorsque la vitesse de la réaction peut être considérée comme nulle.

P_I et P_{95} sont exprimés en minute et V_R en unité d'absorbance par minute.

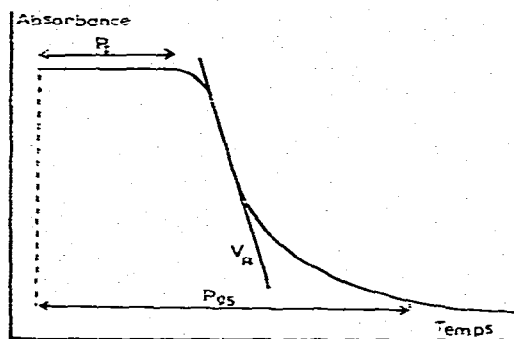


Fig. 1. Aspect des courbes. Absorbance en fonction du temps au cours de la réaction de polymérisation. Définition de P_I , V_R et P_{95} .

MATERIEL ET MÉTHODES

L'acrylamide et le bisacrylamide utilisés (Canalco, Rockville, Md., É.U.) sont purifiés par la méthode de Loenig⁷.

Le système catalyseur que nous avons employé est le système persulfate d'ammonium-N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine (TEMED), des essais préalables³ nous ayant montré qu'il était celui qui se prêtait le mieux à l'utilisation dans des conditions variées de pH et de concentration des réactifs.

Le tracé des courbes représentant l'absorbance en fonction du temps est obtenu de la façon suivante.

TABLEAU I

COMPOSITION DES SOLUTIONS A UTILISÉES POUR TRACER LES COURBES REPRÉSENTANT L'ABSORBANCE EN FONCTION DU TEMPS PENDANT LA RÉACTION DE POLYMÉRISATION

En milieu alcalin le tampon utilisé est un tampon Tris-HCl 0.0625 N, pH 8.9 et en milieu acide le tampon utilisé est un tampon acide acétique-KOH 0.015 N, pH 2.3. Dans le cas de l'étude de l'influence du pH, celui-ci est obtenu grâce à une solution préparée en mélangeant en proportion variable une solution tampon Tris 4 M-HCl, pH 10 et une solution tampon KOH 0.1 N-acide acétique, pH 2.3. Température: 25°.

Paramètre étudié	Concentration acrylamide (g/100 ml)	Pourcentage de bisacrylamide par rapport à l'acrylamide (g/100 g)	Concentration persulfate (g/l)	Concentration TEMED (ml/l)	pH
Concentration persulfate					
Milieu acide	15	0.5	0.35 à 15.05	1.437	3.2
Milieu alcalin	15	0.5	0.07 à 3.5	0.287	9.0
Concentration TEMED					
Milieu acide	15	0.5	3.5	0.1 à 30	3.25 ± 0.05
Milieu alcalin	15	0.5	0.175	0.078 à 3.125	9.1 ± 0.05
Concentration acrylamide					
Milieu acide	4.5 à 30	0.5	3.5	1.437	3.15 ± 0.04
Milieu alcalin	4.5 à 30	0.5	0.175	0.287	9.0 ± 0.03
Pourcentage bisacrylamide					
Milieu acide	15	0.1 à 20	3.5	1.437	3.1 ± 0.02
Milieu alcalin	15	0.1 à 20	0.175	0.287	9.0 ± 0.02
pH	15	0.5	0.525	0.862	3.25 à 9.83

On prépare 4 ml de solution à polymériser A dont la composition, donnée dans le Tableau I, dépend des paramètres étudiés et du pH et 4 ml de solution B ayant la même composition que A mais ne comprenant ni acrylamide, ni bisacrylamide. L'opération est faite en deux temps:

(1) On introduit dans deux tubes à essais les réactifs nécessaires à la préparation de A et de B sauf la solution de persulfate d'ammonium. On dégaze par un vide poussé.

(2) On ajoute rapidement la solution de persulfate aux deux autres solutions en agitant le moins possible.

On met respectivement 3 ml de A et 3 ml de B dans deux cuves en quartz de 1 cm de chemin optique et on superpose à la solution A 0.5 ml d'eau distillée pour éviter le contact de la solution avec l'air. L'enregistrement de l'absorbance en fonction du temps pour la solution A est effectué à 280 nm en prenant la solution B comme référence et en utilisant un spectrophotomètre Unicam SP 1800 muni d'un porte-cuve thermostaté et un enregistreur Unicam AR 25. Le pH avant polymérisation est déterminé sur des solutions de même composition que A.

RÉSULTATS ET CONCLUSION

Nous avons étudié l'influence des concentrations en persulfate, en TEMED, en acrylamide et en bisacrylamide pour deux valeurs du pH, la séparation par électrophorèse pouvant avoir lieu aussi bien en milieu acide qu'en milieu alcalin.

Les courbes ainsi tracées (Figs. 2-16) permettent de connaître l'importance et le sens dans lequel varient les caractéristiques de la réaction de polymérisation lorsque l'on change la valeur de différents paramètres et mettent en évidence leur interdépendance.

Les courbes représentant P_1 et P_{95} en fonction des concentrations en persulfate (Figs. 2 et 3), en TEMED (Figs. 4 et 5) et en bisacrylamide (Fig. 6), ont la forme d'hyperboles asymptotiques aux deux axes et lorsque ces mêmes paramètres aug-

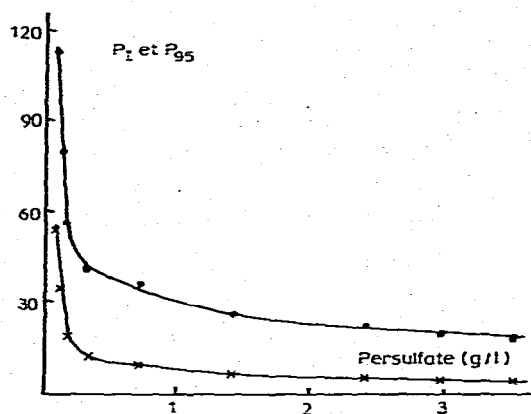


Fig. 2. Variation de P_1 (min) (x—x) et P_{95} (min) (●—●) en fonction de la concentration en persulfate en milieu alcalin.

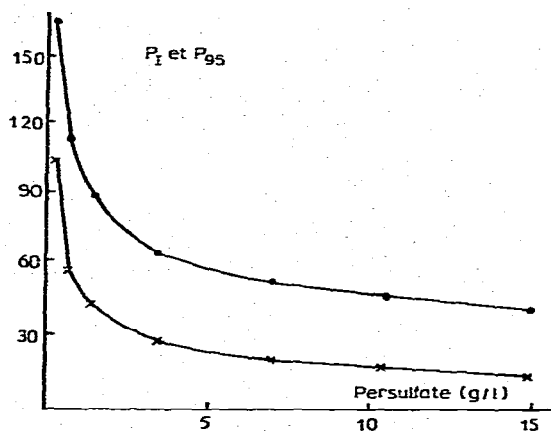


Fig. 3. Variation de P_1 (min) (x—x) et P_{95} (min) (●—●) en fonction de la concentration en persulfate en milieu acide.

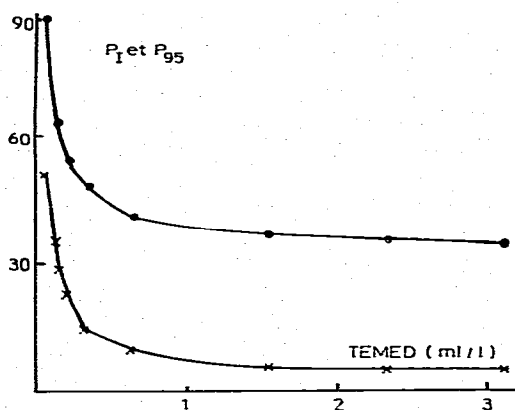


Fig. 4. Variation de P_1 (min) (\times — \times) et P_{95} (min) (●—●) en fonction de la concentration en TEMED en milieu alcalin.

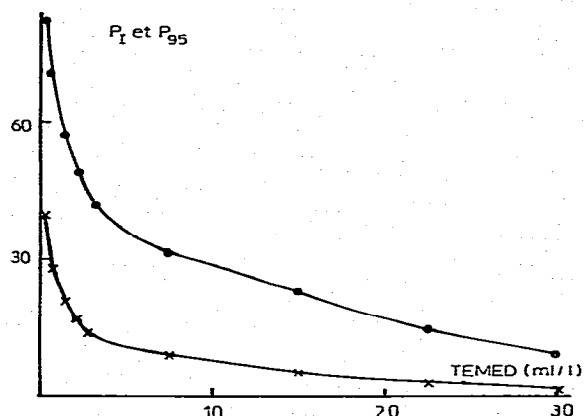


Fig. 5. Variation de P_1 (min) (\times — \times) et P_{95} (min) (●—●) en fonction de la concentration en TEMED en milieu acide.

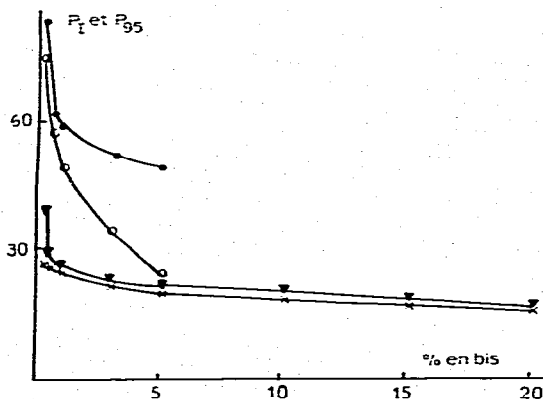


Fig. 6. Variation de P_1 (min) en milieu acide (\times — \times) et en milieu alcalin (∇ — ∇) et de P_{95} (min) en milieu acide (●—●) et en milieu alcalin (○—○) en fonction du pourcentage de bisacrylamide par rapport à l'acrylamide.

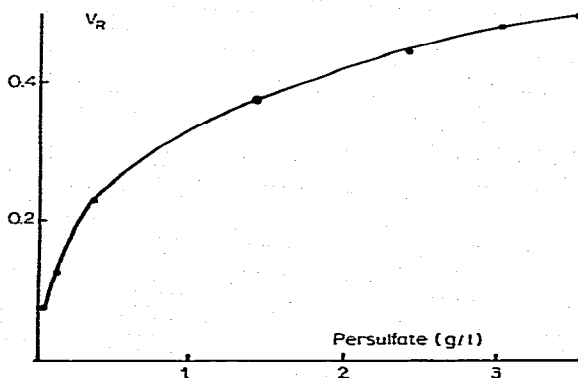


Fig. 7. Variation de V_R (unité d'absorbance/min) en fonction de la concentration en persulfate en milieu alcalin.

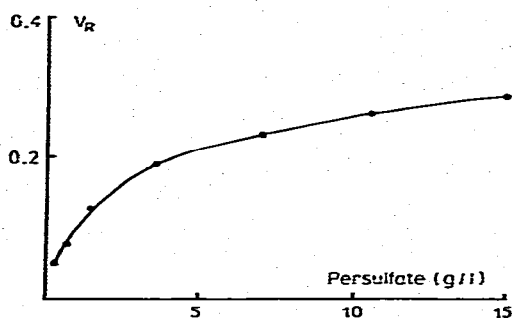


Fig. 8. Variation de V_R (unité d'absorbance/min) en fonction de la concentration en persulfate en milieu acide.

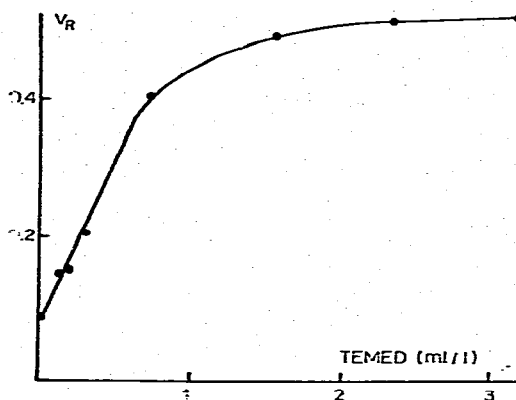


Fig. 9. Variation de V_R (unité d'absorbance/min) en fonction de la concentration en TEMED en milieu alcalin.

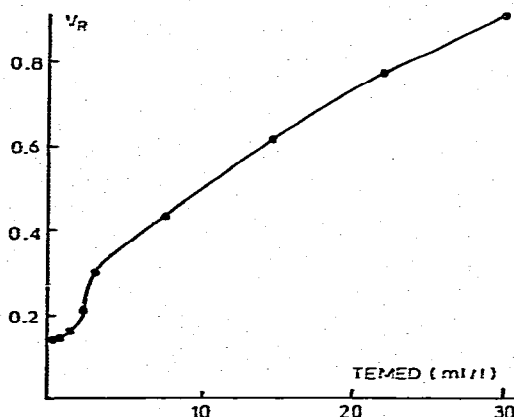


Fig. 10. Variation de V_R (unité d'absorbance/min) en fonction de la concentration en TEMED en milieu acide.

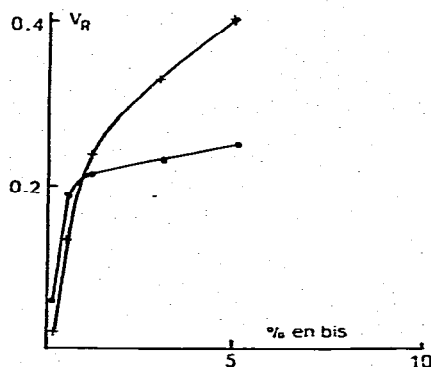


Fig. 11. Variation de V_R (unité d'absorbance/min) en milieu acide (●—●) et en milieu alcalin (—+—) en fonction du pourcentage de bisacrylamide par rapport à l'acrylamide.

mentent, V_R tend vers un maximum (Figs. 7–11). L'opacité des gels dont le pourcentage de bisacrylamide est supérieur à 5% ne permet pas, dans ce cas, de déterminer V_R et P_{95} .

Par contre, dans le domaine des concentrations en acrylamide étudiées, on ne trouve pas les mêmes formes de courbes (Figs. 12–14) et l'on peut noter des différences en milieu acide et en milieu alcalin.

L'augmentation de V_R (Fig. 15), la diminution de P_1 et de P_{95} (Fig. 16), lorsque l'on fait varier le pH de 3.25 à 7.5 sont dues au fait que le TEMED ne joue un rôle de catalyseur que sous forme libre, mais les caractéristiques de la réaction indiquent que lorsque l'on passe d'un milieu neutre à un milieu alcalin, l'influence du pH est plus complexe.

La connaissance des trois valeurs: P_1 , V_R et P_{95} a un intérêt direct pour la détermination des conditions optimales de polymérisation d'un gel de polyacrylamide en vue de son utilisation pour l'électrophorèse. En effet, l'expérience montre que pour obtenir de bonnes séparations, le temps P_1 nécessaire pour voir apparaître une surface

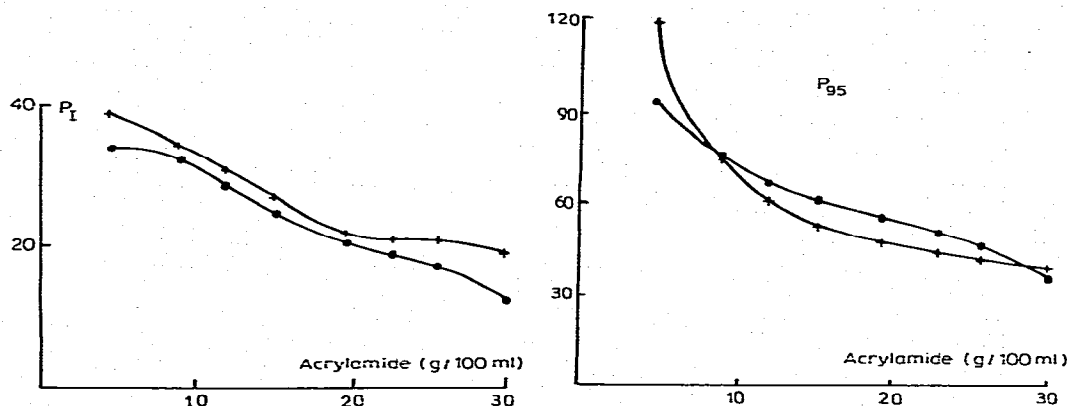


Fig. 12. Variation de P_1 (min) en fonction de la concentration en acrylamide en milieu acide (●—●) et en milieu alcalin (+—+).

Fig. 13. Variation de P_{95} (min) en fonction de la concentration en acrylamide en milieu acide (●—●) et en milieu alcalin (+—+).

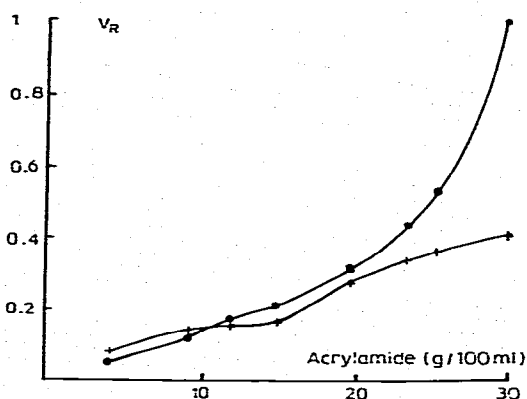


Fig. 14. Variation de V_R (unité d'absorbance/min) en fonction de la concentration en acrylamide en milieu acide (●—●) et en milieu alcalin (×—×).

nette à la limite supérieure du gel doit être comprise entre 5 et 20 min^2 . De même, la réaction de polymérisation étant exothermique, l'élévation de température du gel augmente avec V_R et peut provoquer des déformations irréversibles du polymère. D'autre part, P_{95} permet de connaître le moment où le gel est utilisable pour l'électrophorèse.

Pour que P_1 et V_R se trouvent dans des limites données, il faut ajuster entre elles les concentrations en acrylamide, en bisacrylamide, en TEMED, en persulfate, ainsi que le pH, puisque ces deux valeurs sont fonctions des six paramètres. Lorsque l'on veut mettre au point une formule de gel, le pH et les concentrations en acrylamide et en bisacrylamide sont le plus souvent imposés par la nature de la séparation à effectuer et l'on pourra faire varier les concentrations en catalyseurs pour se trouver dans les conditions optimales de polymérisation. Si l'utilisation en électrophorèse du polymère oblige à modifier l'un des paramètres, comme par exemple la concentration en acrylamide lors d'essais de séparation de composés de poids moléculaire inconnu, les courbes ci-dessus permettent de déterminer la correction à apporter à l'un des autres paramètres pour maintenir des conditions de polymérisation équivalentes, évitant ainsi la multiplication des expériences.

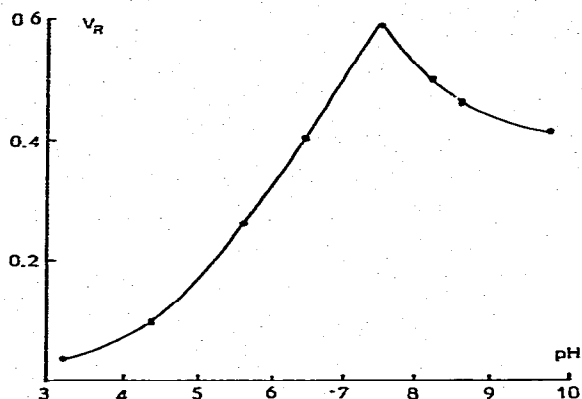


Fig. 15. Variation de V_R (unité d'absorbance/min) en fonction du pH.

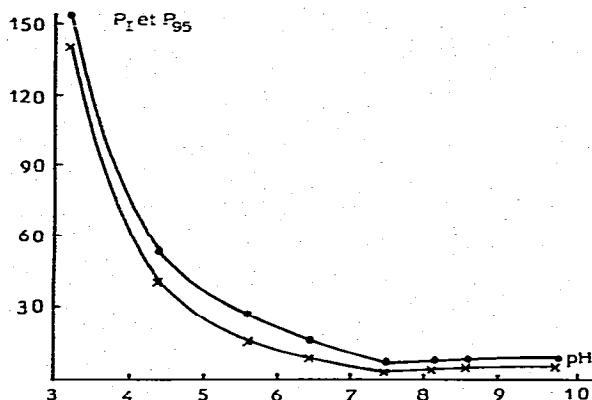


Fig. 16. Variation de P_1 (min) (\times — \times) et de P_{95} (min) (\bullet — \bullet) en fonction du pH.

RÉSUMÉ

Nous avons étudié l'influence du pH et des concentrations en acrylamide, en bisacrylamide, en persulfate et en N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine du milieu sur la cinétique de la réaction de polymérisation des gels de polyacrylamide. Les résultats de cette étude peuvent permettre d'obtenir plus rapidement des gels possédant des caractéristiques données nécessaires à leur emploi en électrophorèse.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 H. R. Maurer, *Disc Electrophoresis and Related Techniques of Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, De Gruyter, Berlin, 1971.
- 2 A. Chrombach et D. Rodbard, *Science*, 172 (1972) 440.
- 3 Y. Pegon, *Thèse*, Université Cl. Bernard, Lyon, 1972.
- 4 Y. Pegon, R. Later et Cl. Quincy, *Int. Symposium VII Chromatographie, Électrophorèse, Bruxelles 1972*, Presses Académiques Européennes, Bruxelles, 1973, p. 235.
- 5 N. Kingsbury et C. J. Masters, *Anal. Biochem.*, 36 (1970) 144.
- 6 J. E. Watkin et R. A. Miller, *Anal. Biochem.*, 34 (1970) 424.
- 7 V. E. Loenig, *Biochem. J.*, 102 (1967) 215.