

CHROM. 7554

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

II. ÉTUDE DE QUELQUES FACTEURS AYANT UNE INFLUENCE SUR LE DEGRÉ DE POLYMÉRISATION ET SUR LA SENSIBILITÉ DES GELS À LA PRESSION OSMOTIQUE

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.

II. Effect of several factors on the degree of polymerization and on the sensitivity of gels to osmotic pressure

In order to determine compositions of solutions giving gels suitable for electrophoresis, we studied the degree of polymerization and the volume changes of gels due to osmotic pressure as a function of reactant concentrations. On the basis of the results of this study, it is possible to obtain a more reproducible degree of polymerization and to increase the stability of the polyacrylamide gel.

INTRODUCTION

L'étude spectrophotométrique de la réaction de polymérisation des gels de polyacrylamide permet de préciser la composition de la solution qui donnera les gels les plus aptes à être utilisés en électrophorèse¹. Dans ce même but nous avons cherché à déterminer l'influence de quelques facteurs sur le degré de polymérisation et sur la sensibilité des gels à la pression osmotique exercée par le tampon d'électrophorèse.

ÉTUDE DE L'INFLUENCE DE QUELQUES FACTEURS SUR LE DEGRÉ DE POLYMÉRISATION

La réaction de formation des gels de polyacrylamide n'est jamais totale et la quantité de composés non polymérisés varie avec les conditions expérimentales. Aussi nous avons étudié l'influence de plusieurs facteurs sur le degré de polymérisation.

Rodbard et Chrambach² ont donné une méthode permettant de déterminer la

quantité d'acrylamide non polymérisé restant dans le gel. Elle comporte une étape d'extraction, une étape de purification, une hydrolyse alcaline et un dosage de l'ammoniaque libéré dans une cellule de Conway. Elle présente l'inconvénient d'être difficile à mettre en œuvre lorsqu'il faut réaliser un grand nombre d'essais systématiques.

La méthode spectrophotométrique que nous avons employée est moins précise car certains des produits secondaires formés en cours de polymérisation ont une absorbance à la longueur d'onde choisie. Mais elle permet d'obtenir facilement un nombre important de mesures et elle est suffisante pour connaître les variations relatives du degré de polymérisation en fonction de la composition de la solution initiale.

Matériel et méthodes

Chaque gel est préparé en mettant dans des tubes cylindriques en verre de 5 mm de diamètre interne, 2 ml de solution dont la composition est identique à celle utilisée pour l'étude de la réaction de polymérisation¹. Après vingt quatre heures, le gel est enlevé du tube, son volume est mesuré, puis on l'introduit dans une fiole jaugée de 10 ml et l'on complète avec de l'eau distillée. On laisse diffuser les substances solubles huit jours puis on mesure l'absorbance à 280 nm de la solution ainsi obtenue. La valeur trouvée est ramenée au millilitre de gel en tenant compte de son volume initial et de la dilution opérée pendant l'étape de diffusion.

Nous avons choisi ce mode d'expression parce que le volume du gel formé varie suivant les conditions de polymérisation, en particulier lorsque les concentrations en catalyseurs sont très élevées ou très faibles.

Résultats et conclusion

Nous avons tracé les courbes représentant l'absorbance par millilitre de gel en fonction des concentrations en acrylamide, en bisacrylamide, en N,N,N',N'-tétraméthylethylènediamine (TEMED) et en persulfate pour deux valeurs du pH, et en fonction du pH (Figs. 1-7). Ces courbes montrent que, aussi bien vers pH 3 que vers pH 9, il existe une zone de concentration en persulfate qui correspond à une polymérisation maximum et à un minimum de variation du degré de polymérisation.

Le degré de polymérisation ne dépend de la concentration en TEMED que pour les faibles valeurs de celle-ci.

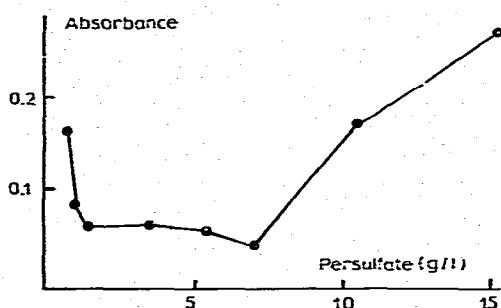


Fig. 1. Variation de l'absorbance en fonction de la concentration en persulfate en milieu acide.

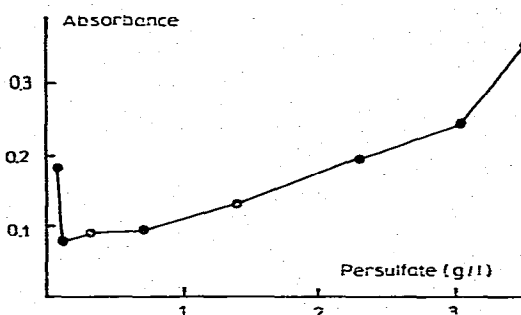


Fig. 2. Variation de l'absorbance en fonction de la concentration en persulfate en milieu alcalin.

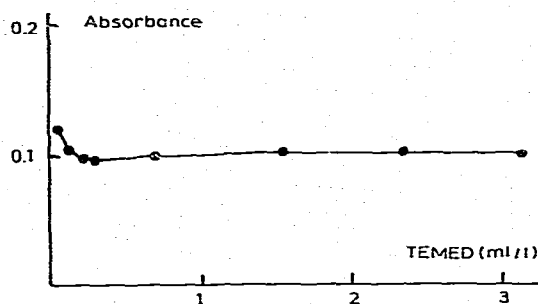


Fig. 3. Variation de l'absorbance en fonction de la concentration en TEMED en milieu alcalin.

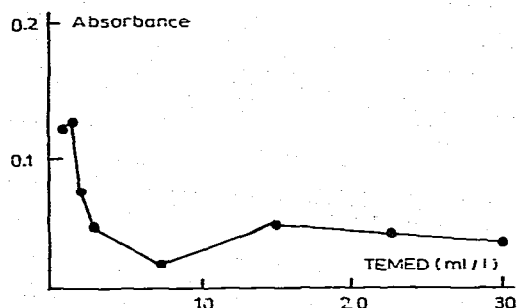


Fig. 4. Variation de l'absorbance en fonction de la concentration en TEMED en milieu acide.

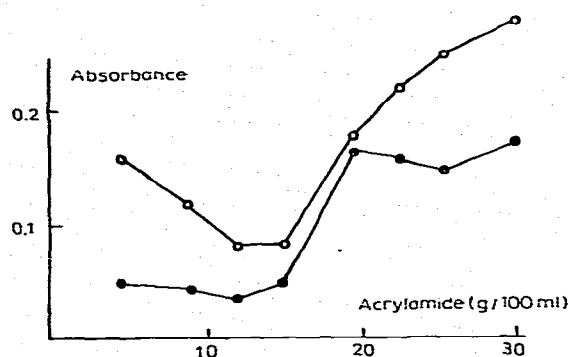


Fig. 5. Variation de l'absorbance en fonction de la concentration en acrylamide en milieu alcalin (—○—) et en milieu acide (●—●).

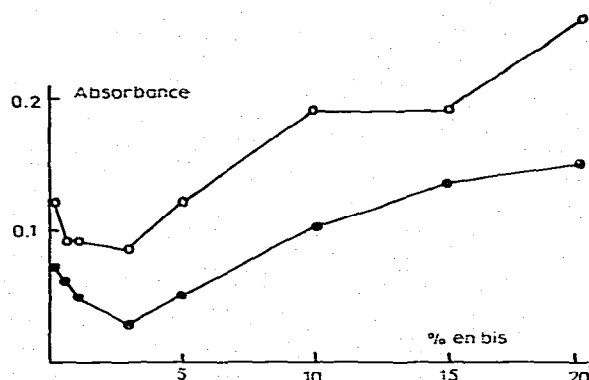


Fig. 6. Variation de l'absorbance en fonction du pourcentage de bisacrylamide par rapport à l'acrylamide en milieu alcalin (—○—) et en milieu acide (●—●).

La polymérisation est maximum lorsque la concentration en acrylamide est située entre 12 et 13 % et la concentration en bisacrylamide est située autour de 3 %.

Le degré de polymérisation augmente avec la valeur du pH mais il varie peu en milieu acide et neutre.

Dans la plupart des cas il n'est pas utile de connaître le degré exact de poly-

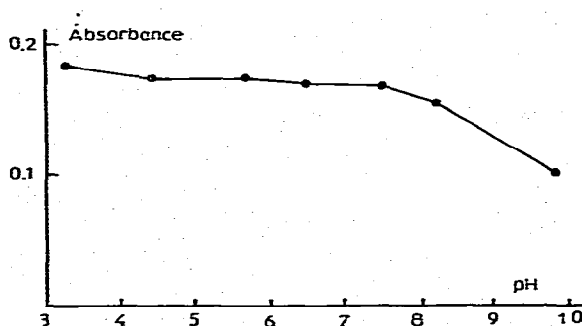


Fig. 7. Variation de l'absorbance en fonction du pH.

mérisation. Il n'est pas non plus nécessaire d'avoir une polymérisation complète car si la réticulation du gel est insuffisante on peut augmenter la concentration en acrylamide. Mais il est indispensable d'assurer le maximum de reproductibilité car la taille des mailles du gel conditionne la valeur de la séparation par électrophorèse. Pour cela il faut choisir, pour les paramètres étudiés une valeur correspondant à la partie de la courbe où la pente est minimum afin qu'une faible variation de composition du milieu réactionnel n'entraîne pas une forte variation du degré de polymérisation. Chacune des courbes présente une telle zone.

ÉTUDE DE L'INFLUENCE DE QUELQUES FACTEURS SUR LA SENSIBILITÉ DES GELS À LA PRESSION OSMOTIQUE

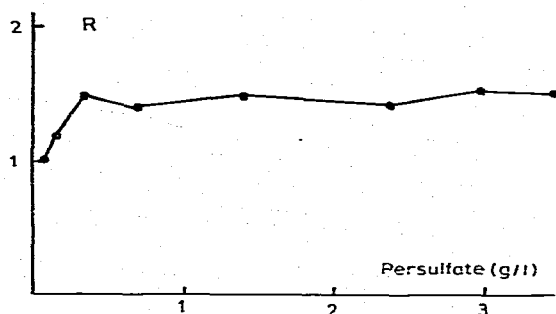
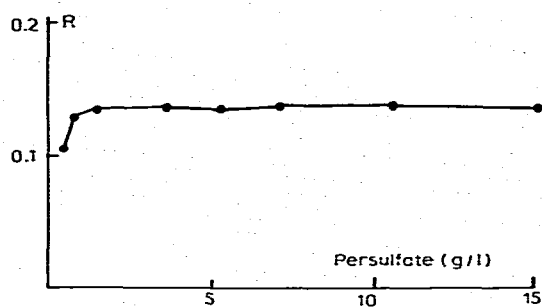
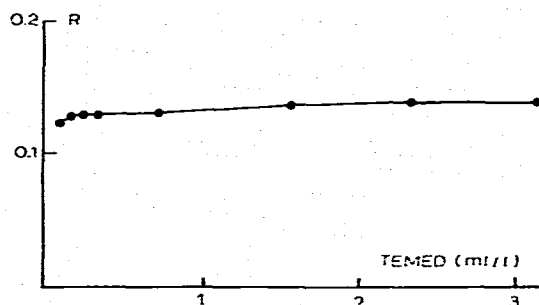
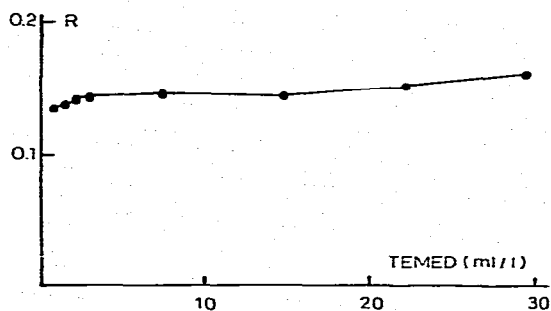
Le gel de polyacrylamide n'a pas une structure rigide. Il est formé de macromolécules de polymère reliées entre elles de façon plus ou moins lâche selon la quantité de bisacrylamide ajoutée avant polymérisation. Lorsqu'il se trouve dans le tampon d'électrophorèse, le gel est soumis à une pression osmotique qui est fonction de la constitution du tampon et de sa concentration en polymère, l'effet Donnan étant négligeable.

De ce fait il tend à occuper un volume tel qu'il y ait équilibre entre la pression osmotique et les forces de cohésion. Le changement de volume du gel en cours d'électrophorèse est préjudiciable à la qualité de la séparation. Aussi est-il important de connaître les facteurs susceptibles d'influencer la sensibilité des gels à la pression osmotique.

Pour étudier ce phénomène nous avons mesuré les variations de volume des gels lorsqu'ils sont mis en contact jusqu'à équilibre avec une solution aqueuse et les tampons d'électrophorèse qui sont le plus souvent employés étant faiblement concentrés, nous avons choisi l'eau distillée.

Matériel et méthodes

Les gels sont préparés dans les mêmes conditions et avec la même composition que dans l'étude précédente. Après polymérisation, on mesure le volume de gel, V_1 , on le met en contact avec 100 ml d'eau distillée pendant huit jours, on mesure le nouveau volume du gel, V_2 , et on fait le rapport $R = (V_2 - V_1)/V_1$.

Fig. 8. Variation de R en fonction de la concentration en persulfate en milieu alcalin.Fig. 9. Variation de R en fonction de la concentration en persulfate en milieu acide.Fig. 10. Variation de R en fonction de la concentration en TEMED en milieu alcalin.Fig. 11. Variation de R en fonction de la concentration en TEMED en milieu acide.

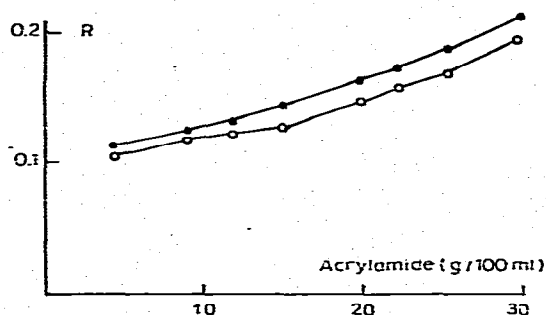


Fig. 12. Variation de R en fonction de la concentration en acrylamide en milieu alcalin (○—○) et en milieu acide (●—●).

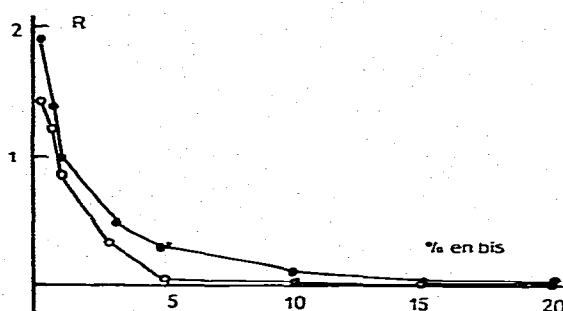


Fig. 13. Variation de R en fonction du pourcentage de bisacrylamide par rapport à l'acrylamide en milieu alcalin (○—○) et en milieu acide (●—●).

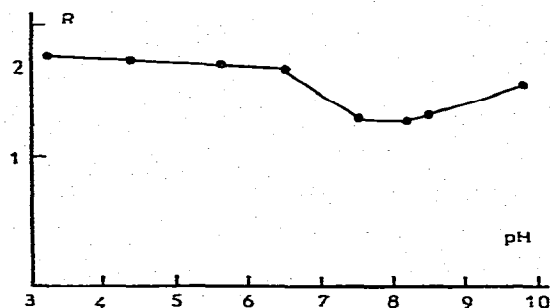


Fig. 14. Variation de R en fonction du pH.

Résultats et conclusion

Nous avons tracé les courbes représentant le rapport R en fonction des concentrations en acrylamide, en bisacrylamide, en TEMED et en persulfate pour deux valeurs du pH et en fonction du pH (Figs. 8-14).

Ces courbes montrent qu'aussi bien en milieu acide qu'en milieu alcalin, R est abaissé pour les faibles concentrations en persulfate, ceci pouvant s'expliquer par le fait que la polymérisation étant alors incomplète, la concentration en polymère est inférieure.

R varie de façon continue en fonction du TEMED.

R augmente avec le pourcentage de bisacrylamide puisque le pontage et donc la rigidité du gel augmente.

R diminue avec le pH jusqu'à pH 7 puis augmente alors que le taux de polymérisation augmente de façon continue avec le pH. Ceci est à rapprocher de l'étude de la vitesse de la réaction de polymérisation¹ et indique que la structure du gel doit être différente selon que la réaction a lieu en milieu neutre ou en milieu alcalin.

L'étude que nous avons entreprise permet de préciser les conditions assurant une meilleure reproductibilité de l'électrophorèse.

Elle montre qu'il faut utiliser un pourcentage de bisacrylamide élevé et qu'il faut l'augmenter avec la concentration en acrylamide. Ceci n'est pas toujours possible car les propriétés mécaniques et la transparence du polymère dépendent de ce pourcentage. Mais à l'échelle préparative où les déformations sont particulièrement importantes du fait du volume du gel et de la durée de l'expérience, on peut avec la plupart des techniques employer un polymère dont le taux de pontage soit tel qu'il évite ce phénomène.

RÉSUMÉ

Pour préciser quelle doit être la composition de la solution permettant d'obtenir par polymérisation les gels de polyacrylamide pour électrophorèse, nous avons étudié l'influence de la composition du milieu réactionnel sur le degré de polymérisation et sur les variations de volume du gel dues à la pression osmotique. En utilisant les résultats obtenus, on peut améliorer la reproductibilité du degré de polymérisation et la stabilité des gels de polyacrylamide.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 Y. Pegon et Cl. Quincy, *J. Chromatogr.*, 100 (1974) 11.
- 2 A. Chrambach et D. Rodbard, *Separ. Sci.*, 7 (1972) 663.