



CONFÉDÉRATION SUISSE
OFFICE FÉDÉRAL DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

Int. Cl.: C 08 L 5/12
G 01 N 27/26

Brevet d'invention délivré pour la Suisse et le Liechtenstein
Traité sur les brevets, du 22 décembre 1978, entre la Suisse et le Liechtenstein

⑫ **FASCICULE DU BREVET** A5

⑪

643 575

⑳ Numéro de la demande: 8497/79

⑦③ Titulaire(s):
Pharminindustrie, Gennevilliers (FR)

㉒ Date de dépôt: 20.09.1979

③① Priorité(s): 22.09.1978 FR 78 27179

⑦② Inventeur(s):
Egisto Boschetti, Chatou (FR)

㉔ Brevet délivré le: 15.06.1984

④⑤ Fascicule du brevet
publié le: 15.06.1984

⑦④ Mandataire:
Dr. A.R. Egli & Co., Patentanwälte, Zürich

⑤④ **Gels d'agarose conditionnés dans des tubes métalliques.**

⑤⑦ Les gels aqueux, conditionnés dans des tubes métalliques, contiennent 0,5 % à 3 % en poids d'agarose ou d'agar-agar, 0,001 % à 0,05 % en poids d'un agent bactériostatique et 0,1 % à 30 % en poids d'un composé non ionique hydroxylé neutre. Celui-ci a une masse moléculaire comprise entre 100 et 5000 daltons et une solubilité dans l'eau à la température de 4°C au moins égale à 0,10 %. Les gels contiennent éventuellement d'autres additifs tels que tampon, ampholyte support, polymère synthétique ou naturel hydrosoluble non ionique, agent dénaturant des protéines, protéine pour zymogramme et/ou éléments pour révélation enzymatique.

Ces gels sont utilisables dans toutes les techniques mettant en jeu des gels aqueux d'agarose ou d'agar-agar.

REVENDEICATIONS

1. Gels aqueux contenant 0,5 à 3% en poids d'agarose ou d'agar-agar et 0,001 à 0,05% en poids d'un agent bactériostatique, caractérisés en ce qu'ils contiennent en outre 0,1 à 30% en poids d'un composé non ionique hydroxylé ayant une masse moléculaire comprise entre 100 et 5000 daltons, une solubilité dans l'eau à la température de 4°C au moins égale à 0,10% en poids, et exempts de groupes fonctionnels acides ou basiques.
2. Gels aqueux selon la revendication 1, caractérisés en ce que le composé non ionique hydroxylé a une masse moléculaire comprise entre 100 et 1000 daltons, une solubilité dans l'eau à la température de 4°C et au moins égale à 4,50% en poids, et est solide à la température de 40°C.
3. Gels aqueux selon la revendication 2, caractérisés en ce que le composé non ionique hydroxylé est le sorbitol, le mannitol, le D(+) -glucose ou le saccharose.
4. Gels aqueux selon l'une des revendications 2 ou 3, caractérisés en ce qu'ils contiennent 4,5 à 15% en poids de composé non ionique hydroxylé.
5. Gels aqueux selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisés en ce qu'ils contiennent en plus un tampon.
6. Gels aqueux selon la revendication 5, caractérisés en ce que le tampon a un pH de 4 à 10 et en ce que sa concentration dans le gel est de 0,01 à 0,1M.
7. Gels aqueux selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisés en ce qu'ils contiennent en plus 3 à 15% en poids d'un polymère synthétique ou naturel hydrosoluble non ionique.
8. Gels aqueux selon la revendication 7, caractérisés en ce qu'ils contiennent 4,5 à 7% en poids de polymère synthétique ou naturel hydrosoluble non ionique.
9. Gels aqueux selon l'une des revendications 7 ou 8, caractérisés en ce que le polymère synthétique ou naturel hydrosoluble non ionique est l'amidon ou un polyacrylamide linéaire, soluble dans l'eau, dont la viscosité en solution aqueuse à 5% est à 22°C, inférieure ou égale à 17 000 cPo.
10. Gels aqueux selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisés en ce qu'ils contiennent en plus 0,1 à 10% en poids d'agent dénaturant des protéines.
11. Gels aqueux selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisés en ce qu'ils contiennent en plus 1 à 4% en poids d'un ampholyte-support.
12. Gels aqueux selon la revendication 11, caractérisés en ce que l'ampholyte-support est un acide carboxylique aliphatique ou alicyclique ayant une masse moléculaire comprise entre 200 et 1500 daltons et possédant plusieurs groupes fonctionnels COOH et plusieurs groupes amino, amino monosubstitué ou amino disubstitué, ou un mélange de tels acides.
13. Gels aqueux selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisés en ce qu'ils contiennent en plus des éléments pour révélation enzymatique.
14. Gels aqueux selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisés en ce qu'ils contiennent en plus 0,5 à 5% en poids de caséine ou de gélatine.
15. Gels aqueux selon l'une des revendications 1 à 14, caractérisés en ce qu'ils sont conditionnés dans un tube métallique.
16. Gels aqueux selon la revendication 15, caractérisés en ce que le tube a un volume de 10 à 500 ml, le rapport diamètre du tube/diamètre de la sortie étant compris entre 2 et 20.
17. Utilisation des gels aqueux selon l'une des revendications 1 à 14 dans les techniques analytiques se basant sur la diffusion ou la migration de substances ou de composés.
18. Utilisation selon la revendication 17 dans les techniques d'électrophorèse, d'immunoélectrophorèse, de double diffusion, d'immunodiffusion radiale, de contre-électrophorèse, d'électro-immunodiffusion, d'isoélectrofocalisation et leurs combinaisons.

La présente invention a pour objet des gels aqueux d'agarose ou d'agar-agar. Elle concerne également les associations constituées par les gels en question et le tube métallique qui les contient.

L'agarose et l'agar-agar sont des polysaccharides qui sont solubles à chaud dans l'eau et forment, lors du refroidissement des solutions aqueuses à température inférieure à environ 40°C, des gels aqueux durs. De tels gels sont stables jusqu'à environ 70-80°C.

L'agarose et l'agar-agar sont utilisés, sous forme de gels aqueux à faible teneur en agarose ou en agar-agar (teneur inférieure à 5% et habituellement comprise entre 1 et 2%), dans des techniques telles que l'électrophorèse, l'immunoélectrophorèse, la double diffusion, l'immunodiffusion radiale, la contre-électrophorèse, l'électro-immunodiffusion, l'isoélectrofocalisation et leurs combinaisons. Un autre domaine d'application de ces gels est la culture de cellules en général et la bactériologie.

La préparation, à partir de poudre d'agarose ou d'agar-agar, de gels aqueux homogènes pour la mise en œuvre des techniques mentionnées ci-dessus est une opération longue, dont la réussite nécessite d'opérer suivant un mode opératoire bien précis.

Afin d'éviter aux utilisateurs des pertes de temps et des erreurs de manipulation, il a été proposé de leur présenter l'agarose ou l'agar-agar soit sous forme de plaques de gel aqueux prêtes à l'emploi, soit sous forme de plaques de gel aqueux déshydratés, utilisables après une simple réhydratation. Mais ce faisant, on impose à l'utilisateur la forme du gel et son épaisseur. De plus, il n'est pas toujours possible d'incorporer dans les plaques de gel déshydratées tous les constituants nécessaires à la mise en œuvre de la technique considérée car les constituants de faible masse moléculaire diffusent hors du gel lors de la réhydratation.

Afin d'éviter les inconvénients ci-dessus, la titulaire a pensé à présenter aux utilisateurs des gels aqueux homogènes d'agarose ou d'agar-agar prêts à l'emploi et conditionnés dans des tubes métalliques.

Toutefois ce type de conditionnement pose un problème important concernant la conservation du gel. En effet, dans les conditions normales d'utilisation des tubes, l'eau d'hydratation des gels a tendance à se séparer par évaporation et condensation sur les parois du tube, d'où une augmentation progressive de la concentration en agarose ou en agar-agar du gel. La titulaire évite ce phénomène en incorporant dans les gels aqueux d'agarose ou d'agar-agar un composé non ionique hydroxylé à faible masse moléculaire.

Les composés non ioniques hydroxylés utilisables sont ceux ayant une masse moléculaire comprise entre 100 et 5000 daltons, de préférence entre 100 et 1000 daltons, une solubilité dans l'eau à la température de 4°C au moins égale à 0,10%, de préférence au moins égale à 4,50% en poids, et parfaitement neutres (c'est-à-dire exempts de groupes fonctionnels acides, tels que les groupes COOH et SO₃H, et de groupes fonctionnels basiques, tels que les groupes amino ou amino substitué). Les composés non ioniques hydroxylés utilisés sont de préférence solides à la température de 40°C; comme tels on peut citer par exemple le sorbitol, le mannitol, le D(+) -glucose et le saccharose.

Les gels aqueux selon la présente invention, qui sont des produits nouveaux, contiennent:

- 0,5 à 3% en poids d'agarose ou d'agar-agar,
- 0,1 à 30% en poids, de préférence 4,5 à 15% en poids, d'un composé non ionique hydroxylé tel que défini plus haut, et
- 0,001 à 0,05% en poids d'un bactériostatique.

Comme bactériostatiques utilisables on peut citer par exemple l'azoture de sodium, le merthiolate de sodium, le trichloro-1,1,1 méthyl-2 propanol-2 (produit connu sous la dénomination commerciale chlorétone) et le bis-p-chlorophényldiguanidohexane (produit connu sous la dénomination commerciale chlorhexidine). On utilise de préférence comme bactériostatique un composé non ionique.

Outre les trois constituants signalés ci-dessus et l'eau d'hydratation, les gels aqueux selon l'invention peuvent renfermer éventuellement d'autres éléments qui sont nécessaires à la mise en œuvre des techniques signalées précédemment, tels que tampons, ampholytes-

supports, polymères synthétiques ou naturels hydrosolubles non ioniques, agents dénaturants des protéines, protéines pour zymogrammes, éléments pour révélation enzymatique, etc.

Les concentrations et teneurs auxquelles ces divers éléments optionnels peuvent figurer dans les gels aqueux selon l'invention sont les suivants:

- tampons: concentration préférentielle dans le gel: 0,01M à 0,1M,
- ampholyte-support: 1 à 4% en poids,
- polymère synthétique ou naturel hydrosoluble non ionique: 3 à 15% en poids, de préférence 4,5 à 7% en poids,
- agent dénaturant: 0,1 à 10% en poids, de préférence environ 1% en poids, et
- protéine pour zymogramme: 0,5 à 5% en poids, de préférence environ 2,5% en poids.

Comme exemples de tampons que l'on peut incorporer dans les gels selon l'invention on peut citer les tampons ayant un pH compris entre 4 et 10 et en particulier le tampon tris-(hydroxyméthyl)amino-méthane (en abrégé tris)/glycocolle pH 8,2, le tampon tris/acide éthylènediaminetétracétique pH 8,2, le tampon diéthylmalonylurée (barbital)/sel de sodium de la diéthylmalonylurée (barbital sodique) pH 8,4, le tampon tris/barbital/lactate de calcium pH 8,4, le tampon tris/HCl pH 9,7 et les tampons phosphate monobasique/phosphate dibasique pH 6,5 à 8,5.

Comme exemples d'ampholytes-supports que l'on peut incorporer dans les gels selon l'invention on peut citer les acides carboxyliques, de préférence aliphatiques ou alicycliques, ayant une masse moléculaire comprise entre 200 et 1500 daltons et possédant plusieurs groupes fonctionnels COOH et plusieurs groupes amino, amino monosubstitué ou amino disubstitué, et leurs mélanges, en particulier les mélanges d'acides aminocarboxyliques polyprotiques ayant au moins quatre groupes protolytiques, dont l'un au moins est un groupe carboxylique et l'un au moins est un atome d'azote basique, décrits dans le brevet anglais N° 1106818.

Comme exemples de polymères synthétiques ou naturels hydrosolubles non ioniques que l'on peut incorporer dans les gels selon l'invention on peut citer l'amidon et les polyacrylamides linéaires, solubles dans l'eau, dont la viscosité en solution aqueuse à 5% est à 22°C, inférieure ou égale à 17000 cPo, décrits dans la demande de brevet en France N° 75/00922, publiée sous le N° 2297879.

Comme exemples d'agents dénaturants des protéines que l'on peut incorporer dans les gels selon l'invention on peut citer le dodécylsulfate de sodium, l'urée, le déoxycholate de sodium, le β -mercaptoéthanol, le p-isooctylphénoxypropyléthoxyéthanol connu sous la dénomination commerciale triton X-100.

Comme protéines pour zymogrammes on peut citer la caséine et la gélatine.

Pour préparer les gels aqueux homogènes selon l'invention et les conditionner dans les tubes on opère en général comme suit.

On réalise une solution aqueuse contenant les quantités voulues des divers constituants autres que l'agarose ou l'agar-agar, puis on ajoute à cette solution la quantité voulue d'agarose ou d'agar-agar et on chauffe la solution jusqu'à ébullition pour solubiliser complètement l'agarose ou l'agar-agar. On filtre ensuite la solution chaude (cette filtration peut éventuellement être stérilisante de façon à obtenir des gels stériles) et on répartit la solution filtrée dans les tubes. On laisse refroidir la solution filtrée dans les tubes jusqu'à gélification et on ferme les tubes.

Dans le cas particulier où l'on désire obtenir un gel aqueux contenant un polyacrylamide linéaire, on commence par réaliser, en suivant le mode opératoire précédent, une solution aqueuse contenant les constituants (y compris l'agarose ou l'agar-agar) autres que le polyacrylamide. Puis on filtre à chaud cette solution et ramène sa température à 60°C environ. On ajoute alors à la solution filtrée la quantité voulue d'acrylamide et un initiateur de polymérisation et on effectue la polymérisation de l'acrylamide à température supérieure à la température de gélification, par exemple 60°C. Une fois la

polymérisation terminée, on répartit la solution dans les tubes, on laisse gélifier et ferme les tubes.

Pour de plus amples détails sur le mode de préparation des gels selon l'invention on se reportera aux exemples de réalisation décrits plus loin.

Les tubes utilisés pour le conditionnement des gels aqueux selon l'invention sont des tubes métalliques du type tubes pour pommade, dont l'intérieur est de préférence revêtu d'une mince pellicule de vernis. Le volume de ces tubes peut aller de 10 à 500 ml, le rapport diamètre du tube/diamètre de la sortie étant compris entre 2 et 20, de préférence entre 3 et 8. Les tubes métalliques ont la propriété de s'écraser lorsqu'on les presse pour faire sortir le produit. Leur volume diminue de manière irréversible au fur et à mesure du prélèvement du gel et de ce fait il n'y a pas de rentrée d'air, ce qui est fondamental pour la bonne conservation du gel restant dans le tube et permet d'avoir un gel de composition constante pendant toute la durée d'utilisation du tube. Les tubes en matière plastique, qui sont élastiques et qui reprennent leur forme initiale après utilisation, ne conviennent pas au conditionnement des gels selon l'invention.

Les gels aqueux selon l'invention conviennent pour toutes les techniques qui impliquent l'utilisation de gels aqueux d'agarose ou d'agar-agar. Leur mise en œuvre est extrêmement simple et rapide. Au moment de l'utilisation, il suffit de prélever dans un petit récipient la quantité voulue de gel en pressant le tube, de placer le récipient quelques secondes à quelques minutes dans un bain-marie bouillant pour faire fondre le gel et couler le gel fondu, par exemple, sur une plaque ou une lame de verre où on le laisse gélifier à nouveau par refroidissement.

La fusion du gel est une opération rapide, qui ne dure que quelques secondes à quelques minutes suivant la quantité de gel prélevée. En effet, du fait de la petitesse du diamètre de la sortie par rapport à celui du tube, le gel prélevé se présente sous forme de granules relativement petits, qui offrent une surface importante pour les échanges thermiques.

Les exemples suivants illustrent l'invention sans la limiter.

Exemple 1:

Préparation d'un gel aqueux d'agarose en tube pour électrophorèse et immunoélectrophorèse.

Dans 3 l d'eau déminéralisée, on dissout 24,72 g du sel de sodium de la diéthylmalonylurée (barbital sodique), 4,8 g de diéthylmalonylurée (barbital), 150 g de sorbitol et 300 mg de merthiolate de sodium. On ajuste le pH à 8,4 si nécessaire puis on place la solution dans un bain-marie à 60°C et on disperse sous agitation dans la solution 39 g d'agarose pour électrophorèse. On chauffe le bain-marie progressivement jusqu'à ébullition et poursuit l'agitation jusqu'à solubilisation complète de l'agarose. On amène ensuite la température de la solution à 70-80°C et filtre la solution sous vide à chaud. On répartit la solution chaude dans des tubes métalliques d'un volume de 150 ml dont l'intérieur est revêtu d'un vernis, puis on laisse refroidir jusqu'à gélification de la solution et ferme les tubes. On obtient ainsi un gel aqueux tamponné, conditionné dans des tubes, qui contient environ 1,2% d'agarose et 4,7% de sorbitol. Ce gel en tube se conserve pendant plusieurs mois, à une température de 4 à 30°C. Il ne doit pas être amené à température inférieure à 0°C.

Le gel ainsi préparé convient à l'électrophorèse en plaque de substances biologiques (cf. Hjerten, S., «Biochim. Biophys. Acta», 53 (1961), 514-517) et à l'immunoélectrophorèse classique (cf. Grabar, P., Williams, C.A., «Biochim. Biophys. Acta», 10 (1953), 193-194). Au moment de l'utilisation on ouvre le tube, fait sortir par simple pression sur le tube la quantité voulue de gel et recueille le gel extrudé dans un récipient (tube à essai en verre ou Erlenmeyer). On chauffe le récipient quelques secondes à quelques minutes dans un bain-marie bouillant pour assurer une parfaite fusion du gel, prélève à l'aide d'une pipette graduée la quantité voulue de gel fondu et la coule sur une lame de verre (par exemple lame porte-objet de microscope). Ensuite on laisse gélifier, perce les

puits ou les gouttières à l'aide d'un emporte-pièce et effectue l'électrophorèse ou l'immunoélectrophorèse de manière classique.

Exemple 2:

Préparation d'un gel aqueux d'agarose en tube pour électrophorèse ou immunoélectrophorèse.

On opère comme à l'exemple 1 sauf que l'on n'ajoute pas au départ de barbital sodique et de barbital, et que l'on utilise 78 g d'agarose au lieu de 38 g. On obtient un gel aqueux non tamponné contenant environ 2,4% d'agarose et 4,7% de sorbitol. Ce gel en tube se conserve pendant plusieurs mois à 4°C.

Au moment de l'utilisation le gel extrudé est mélangé, en parties égales, avec le tampon choisi pour l'électrophorèse ou l'immunoélectrophorèse.

Exemple 3:

Préparation d'un gel aqueux d'agar-agar pour immunoélectrophorèse.

On opère comme à l'exemple 1 en remplaçant l'agarose par l'agar-agar et les 150 g de sorbitol par 180 g de mannitol. On obtient ainsi un gel aqueux tamponné contenant environ 1,2% d'agar-agar et 5,5% de mannitol. Ce gel en tube se conserve à une température de 4 à 30°C et convient à l'immunoélectrophorèse sur gel d'agar selon la technique de Grabar et Williams (voir référence citée plus haut).

Au moment de l'utilisation le gel est extrudé, fondu et coulé comme indiqué à l'exemple 1. Après refroidissement et gélification on découpe, à l'aide d'un emporte-pièce, les deux puits et la gouttière centrale et effectue l'immunoélectrophorèse de manière classique.

Exemple 4:

Préparation d'un gel aqueux d'agarose pour microfractionnement électrophorétique.

Dans 3 l d'eau déminéralisée on dissout 24,72 g de barbital sodique, 4,8 g de barbital, 150 g de sorbitol et 300 mg de merthiolate de sodium. On ajuste le pH à 8,4 si nécessaire, puis on place la solution dans un bain-marie à 60°C et on disperse sous agitation dans la solution 39 g d'agarose pour électrophorèse. On chauffe le bain-marie progressivement jusqu'à ébullition et poursuit l'agitation jusqu'à solubilisation complète de l'agarose. On amène ensuite la température de la solution à 70-80°C et filtre sous vide à chaud. On amène la solution filtrée à 60°C et ajoute 150 g d'acrylamide puis, sous agitation, 1 ml de N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine (TEMED) et 800 mg de persulfate d'ammonium. On poursuit l'agitation lentement, à 60°C, pendant 2 h. On répartit la solution visqueuse et chaude dans des tubes métalliques, puis on laisse refroidir jusqu'à gélification de la solution dans les tubes et ferme les tubes. On obtient ainsi un gel aqueux tamponné, conditionné dans des tubes, qui contient environ 1,2% d'agarose, 4,5% de sorbitol et 4,5% de polyacrylamide non réticulé hydrosoluble. Ce gel en tube se conserve plusieurs mois à une température de 4 à 30°C.

Au moment de l'utilisation le gel est extrudé, fondu et coulé comme indiqué à l'exemple 1. Après refroidissement et gélification on perce un réservoir de départ et effectue le microfractionnement électrophorétique selon la technique employée par Uriel avec les gels mixtes agarose-polyacrylamide réticulé (cf. Uriel, J., «Bull. Soc. Chim. Biol.», 48 (1966), 869).

Exemple 5:

Préparation d'un gel aqueux d'agarose pour la détermination de la masse moléculaire des protéines par électrophorèse.

On opère comme à l'exemple 4 en remplaçant au départ le tampon barbital sodique/barbital pH 8,4 par un tampon tris/glyco-

colle pH 8,2 et en introduisant en plus au départ dans les 3 l d'eau déminéralisée 30 g de dodécylsulfate de sodium et 3 g de β -mercaptoéthanol. On obtient ainsi un gel aqueux tamponné, conditionné dans des tubes, qui se conserve à +4°C et convient à la détermination de la masse moléculaire des produits biologiques, en particulier des protéines. Ce gel ne doit pas être amené à température inférieure à 0°C.

Au moment de l'utilisation le gel est extrudé, fondu et coulé comme indiqué à l'exemple 1. On laisse gélifier, puis effectue la détermination de la masse moléculaire des protéines en suivant la technique de Shapiro, A.L., «Anal. Biochem.», 29 (1969) 505.

Exemple 6:

Préparation d'un gel aqueux d'agarose pour isoélectrofocalisation.

Dans 2,8 l d'eau déminéralisée on dissout 180 g de D(+)-glucose et 100 mg de merthiolate de sodium (agent bactériostatique).

On place la solution dans un bain-marie à 60°C. On disperse sous agitation dans la solution 36 g d'agarose très pur ayant une électro-endo-osmose inférieure à 0,02 (agarose exempt de groupes anioniques sulfate et carboxylique). On chauffe le bain-marie progressivement jusqu'à ébullition et poursuit l'agitation jusqu'à solubilisation complète de l'agarose. On amène ensuite la température de la solution à 70°C, filtre la solution sous vide à chaud et ajoute à la solution filtrée chaude 200 ml d'une solution aqueuse à 40% du produit connu sous le nom d'Ampholine 3,5-10 (ampholyte-support constitué par un mélange d'acides aminocarboxyliques polyprotiques ayant au moins quatre groupes protolytiques, dont les points isoélectriques s'étalent entre pH 3,5 et pH 10, mélange décrit dans le brevet anglais N° 1106818). On agite quelques minutes et répartit la solution chaude dans des tubes métalliques d'un volume de 150 ml. Puis on laisse refroidir jusqu'à gélification de la solution et ferme les tubes. On obtient ainsi un gel aqueux, conditionné dans des tubes, qui contient environ 1,1% d'agarose, 5,6% de glucose et 1,2% d'ampholyte-support. Ce gel en tube se conserve plusieurs mois à 4°C. Il ne doit pas être amené à température inférieure à 0°C.

Au moment de l'utilisation le gel est extrudé, fondu et coulé sur la plaque comme indiqué à l'exemple 1. On laisse gélifier puis effectue l'isoélectrofocalisation en suivant la technique de Catsimpooolas, N. «Anal. Biochem.», 26 (1968), 480.

Exemple 7:

Préparation d'un gel aqueux d'agarose pour révélation enzymatique.

En opérant suivant un mode opératoire similaire à celui de l'exemple 1 et en introduisant dans la solution avant gélification les quantités voulues des constituants indiqués ci-dessous, on prépare un gel aqueux tamponné répondant à la composition suivante:

- agarose: 1,2% en poids
- sorbitol: 10% en poids
- azoture de sodium: 0,01% en poids
- tampon tris/HCl pH 9,7: concentration 0,05M
- MgCl₂: 0,05% en poids
- phosphate d' α -naphtyle: 0,04% en poids
- Fast Blue B (C.I. Azoic Diazo Component 48: C.I. N° 37235; sel de diazonium stabilisé de l'orthodianisidine): 0,05% en poids

Ce gel convient comme substrat pour la révélation enzymatique de la phosphatase alcaline.

Dans le gel précédent on peut remplacer le Fast Blue B par le Fast Blue BB (C. I. Azoic Diazo Component 20, C. I. N° 37175; sel de diazonium stabilisé de l'amine-4'-diéthoxy-2',5'-benzanilide).