

REALISER EN CLASSE L'ELECTROPHORESE DE L'ADN : FICHE LABO

- Le tampon est une solution contenant du Tris [tris(hydroxyméthyl)aminométhane], du borate, de l'EDTA (Ethylène diamine tétraacétate) ajustée à pH 8,3 (tampon TBE).
- Le support de migration est un gel d'agarose dans lequel des puits sont formés à une extrémité pour recevoir les échantillons. En outre, le gel est ici immergé dans le tampon qui remplit également les deux réservoirs où se trouvent les électrodes. L'agarose constitue un milieu plus ou moins poreux : plus sa concentration est forte et plus les pores sont petits. La concentration à utiliser dépend donc de la taille des fragments à séparer.

Au pH de la solution tampon, l'ADN présente des charges négatives dues aux groupes phosphates et migre donc vers l'anode. Les fragments d'ADN migrent d'autant plus vite qu'ils sont plus petits en raison de la dimension des pores du gel et, à la fin de la migration, les fragments les plus petits correspondent aux bandes les plus éloignées du puits de départ.

Un colorant de charge, le bleu de bromophénol, permet de suivre visuellement l'avancement de la migration. Il est dissous dans une solution de saccharose concentrée qui, une fois mélangée à la solution d'ADN, densifie suffisamment le mélange pour qu'il ne s'échappe pas des puits vers le tampon contenu dans la cuve.

Le tableau ci-dessous montre la dimension des fragments issus de l'action de deux enzymes de restriction Hind III et EcoR I sur l'ADN du bactériophage lambda.

EcoR I	Hind III	EcoR I + Hind III
21226	23130	21226
7421	9416	5148
5804	6557	4973
5643	4361	4268
4878	2322	3530
3500	2027	2027
	564	1904
	125	1584
		1375
		947
		831
		564
		125

(D'après Didier Pol)

I Préparation des solutions :

1) Préparation du Tampon TBE: (Tris borate EDTA) pH 8.3

Pour 1000 mL d'eau distillée

Tris.HCl [tris(hydroxyméthyl)aminométhane] 90 mmol.L⁻¹ 10.89 g

Acide borique 90 mmol.L⁻¹ 5.56 g

EDTA 2 mmol.L⁻¹ 0.74 g (sel disodique de l'acide éthylène diamine tétra acétique)
(réutilisable plusieurs fois)

Une fois que la solution est prête, s'assurer que le pH est compris entre 8.2 et 8.3, sinon rectifier en ajoutant NaOH ou HCl.

Volume de tampon nécessaire par cuve Jeulin : 300 mL

2) Préparation et coulage du gel d'agarose:

1- Mélanger tampon TBE et agarose à raison de 1 g d'agarose pour 100 mL de tampon. (On trouve parfois d'autres valeurs : si il y a moins d'agarose la migration se fait plus vite mais le gel est beaucoup plus fragile, et inversement). Faire bouillir pour faire fondre l'agarose ou passer au four à micro-ondes en surveillant pour éviter les projections.

2- Laisser refroidir jusqu'à environ 60°C (jusqu'à ce qu'il devienne possible de saisir le flacon à main nue). Placer les joints prévus pour fermer le support de gel et positionner le peigne à 1 mm du fond et à environ 1 cm de l'extrémité du support.

3- Disposer 2 morceaux d'adhésif pour peintre, pas trop collants, un à chaque extrémité du support de gel pour le fermer complètement. S'assurer que l'adhésif utilisé est suffisamment résistant pour éviter la perte de solution.

4- Disposer le peigne sur le support en utilisant les encoches prévues à cet effet. Placer le plateau de moulage parfaitement à l'horizontale.

5- Couler lentement le gel en veillant à ce qu'il entoure bien les dents du peigne ; arrêter lorsque le niveau arrive juste au dessous de la jonction dents-peigne.

6- Laisser refroidir, attendre 10 min la prise du gel à température ambiante, puis 15 min au réfrigérateur. Enlever le peigne et les joints.

NB *On peut préparer le gel à l'avance et le conserver solide au réfrigérateur dans un flacon en verre (rempli aux 2/3 maximum). Au moment de l'emploi, refondre le gel au four à micro-ondes (en surveillant pour éviter les projections) ou au bain-marie bouillant.*

3) Préparation de l'ADN :

La solution d'ADN peut être conservée indéfiniment à - 20 °C. Il vaut mieux la répartir en aliquots de 20 µL dans des microtubes avant congélation.

Avant la séance, décongeler l'ADN. Placer le tube Eppendorf le contenant environ 5 min sous l'eau chaude, puis le plonger dans l'eau glacée pendant 2 min. (séparation par choc thermique des fragments qui auraient pu se coller ensemble)

Chez certains fournisseurs la solution d'ADN est prête à l'emploi, il suffit d'ajouter la solution de charge. Chez d'autres il faut la préparer.

- **Dilution de la solution mère d'ADN digéré par ECO R1 ou HIND III:**
Attention : replacer le plus vite possible l'ADN non utilisé au congélateur, même non densifié.

Dans un autre tube Eppendorf, diluer la solution d'ADN de façon à obtenir 80 μL de solution de concentration égale à 0,07 μg d'ADN par μL (utiliser une $\mu\text{pipette}$).

- C_1 = concentration en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de la solution mère d'ADN. (Attention: donnée par le fournisseur en $\mu\text{g}/\text{mL}$)
- C_2 = concentration à obtenir = 0,07 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
- V_1 = volume d'ADN à prélever, en μL
- V_2 = volume final de la solution, soit 80 μL

$$V_1 = (C_2 \times V_2) / C_1$$

- prélever un volume V_1 en μL tel que $V_1 = (C_2 \times V_2) / C_1$, avec $C_2 = 0,07 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ et $V_2 = 80 \mu\text{L}$.
- pour diluer ajouter à V_1 de l'eau distillée qsp 80 μL .

▪ **Densification de l'ADN:**

A l'ADN ainsi préparé, ajouter la solution de charge pour densifier l'échantillon et permettre son dépôt dans les puits immergés.

Cette solution contient en plus un indicateur de migration, le bleu de bromophénol (BBP), qui migre à une vitesse voisine d'un fragment d'ADN double brin de 300 pb, soit plus vite que tous les fragments (sauf un) impliqués ici.

Respecter les proportions suivantes: 1 vol (20 μL) de solution de charge pour 4 vol (80 μL) de solution d'ADN.

Bien mélanger.

Colorant de charge pH 8 :

Pour 10 mL d'eau distillée

Bleu de bromophénol 3 mmol.L^{-1} 0,2 g

Saccharose 1,5 mol.L^{-1} 5,1 g

Tris. HCl 10 mmol.L^{-1} 0,01 g

RECAPITULATIF:

	HIND III	ECO R1
Concentration solution mère	199 $\mu\text{g} / \text{mL}$	281 $\mu\text{g} / \text{mL}$
$V_1 = (C_2 \times V_2) / C_1$	$V_1 = (0,07 \times 80) / 0,199 = 28,14 \mu\text{L}$	$V_1 = (0,07 \times 80) / 0,281 = 19,93 \mu\text{L}$
PREPARATION DE L'ADN		
V_1	28,2 μL	20 μL
H ₂ O qsp 80 μl	51,8 μL	60 μL
Sol de charge	20 μL	20 μL
Total :	100 μL	100 μL

Mise en place du gel dans la cuve:

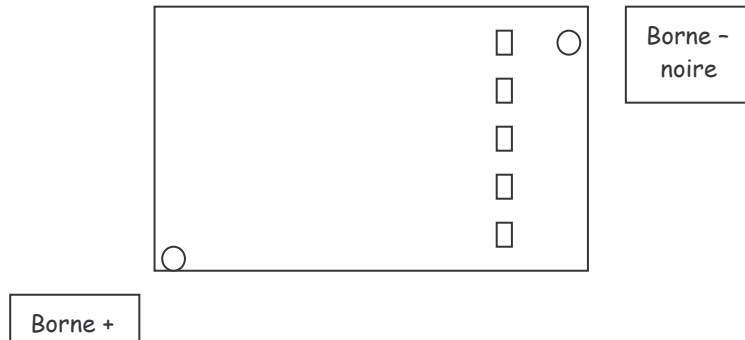
Placer le gel, toujours sur son support, dans la cuve: puits du côté de la cathode (-)

Remplir la cuve avec le tampon TBE de façon que le niveau du tampon vienne effleurer le niveau supérieur du gel. (le tampon ne doit en aucun cas recouvrir le gel)

Dépôt de l'ADN:

Déposer 10 μL de la solution d'ADN densifiée au fond de chaque puits (= 450 ng d'ADN). Disposer dans chaque puits ou dans un puits sur 2. (certains protocoles indiquent un dépôt de 6 μL , mais le résultat est beaucoup moins beau)

On peut mettre une feuille de papier noir en dessous pour mieux visualiser les puits.



II Mise en route de l'électrophorèse :

- Fermer la cuve, brancher les fils et mettre sous tension. Vérifier que les puits sont bien du côté de la cathode. Les systèmes de sécurité des cuves actuelles interdisent l'accès à l'intérieur de la cuve sous tension.
- Appliquer une tension constante de 100 volts pendant toute la durée de l'électrophorèse.
- Vérifier que l'électrophorèse a bien démarré : de la buée doit apparaître dans les 5 premières minutes.
- Laisser migrer jusqu'à ce que les tâches de bleu de bromophénol aient parcouru une distance de 3 à 5 cm.
- Couper l'alimentation, débrancher les connexions et récupérer le gel dans son support. Attention au transport : le gel glisse très facilement de son support.

III Révélation des bandes d'ADN

Attention, le gel doit être manipulé avec soin car il est très fragile. Il est d'autant plus fragile que la concentration d'agarose est faible.

- Plonger le gel dans la solution de coloration pendant 20 min.
- Récupérer le colorant (qui peut être réutilisé à condition d'être conservé à l'obscurité) et transférer le gel dans un cristalliseur rempli d'eau tiède. Changer l'eau de temps en temps. Autre possibilité : laisser couler un mince filet d'eau tiède sur le gel en veillant à ce que ce dernier ne sorte pas de son récipient et à ce qu'il ne se déchire pas (laisser couler l'eau très lentement, recouvrir le gel d'une grille éventuellement). Poursuivre jusqu'à décoloration du fond.

Selon la température de l'eau et sa vitesse de renouvellement, la décoloration du fond peut être plus ou moins complète en quelques heures.

- Les bandes d'ADN apparaissent en bleu foncé sur un fond bleu clair.

Solution de coloration pour les gels: Pour 100 mL d'eau distillée

Bleu de méthylène 2,6 mmol.L⁻¹ 0,1 g

Acétate de sodium 0,5 mol.L⁻¹ 4,1 g

La durée de décoloration du fond est longue et le gel conserve une couleur de fond assez soutenue qui gêne parfois la visualisation des bandes.

ELECTROPHORESE DES FRAGMENTS DE RESTRICTION DE HIND III ET DE ECO RI LISTE DU MATERIEL NECESSAIRE

Produits à commander chez SORDALAB (Prix Février 2006)

Page catalogue	Produit	Référence	Prix TTC
267	Agarose, 25g.	AGAROS	39.15
108	Kit Electrophorèse ADN		45.00
109	Kit détection des Ac par électrophorèse		41.00
267	Tampon TBE	TBE	4.35
		TOTAL :	129.50

Matériel et produits à préparer avant le TP :

- Cuves à électrophorèse : couler les gels
- Tampon électrophorèse TBE
- Solutions d'ADN digérées par Hind III et ECO RI
- Colorant de charge de l'ADN

Matériel et produits nécessaires le jour du TP :

Pour la mise en route de l'électrophorèse :

- Cuves à électrophorèse + alimentations + câbles
- Gels
- Solution Tampon TBE
- Micropipettes + cônes + récipients pour cônes sales
- 1 bécher + eau (pour faire tester les micropipettes)
- Feuille de papier noir pour visualiser les puits
- Solutions d'ADN
-

Pour la coloration :

- Cuvette ou petite boîte en plastique, à rebord bas si possible
- BBT (colorant)
- Gants
- Eau distillée
- Alcool à 70 ou alcool à brûler

Pour l'exploitation des résultats :

- Appareils photos
- Scanner et transparent photocopieuse pour intercaler entre gel et scanner
- Boîte de Pétri propres en verre pour récupérer les gels ADN