

## Kit électrophorèse de l'ADN n°2

Réf. ELECCRDG

### A RECEPTION DU COLIS :

- Vérifier la composition** du colis indiquée ci-dessous
- Stocker** les articles du colis dans les bonnes conditions :

Ouvrir le sachet principal

- ⚠ Placer le sachet noté E à **- 20°C** ⚠
- ⚠ Placer le reste à **température ambiante** ⚠

**Attention :** conservation des produits du kit de 3 mois sous réserve du respect des conditions annoncées.

- Avant toute manipulation, étudier la fiche sécurité** en fin de notice

### COMPOSITION DU COLIS :

- 1 **sachet noté E** à stocker à **- 20°C** contenant :
  - 1 microtube à bouchon orange de 75 µL d'une solution d'ADN du phage lambda non muté
  - 1 microtube à bouchon marron de 75 µL d'une solution d'ADN du phage lambda portant une mutation « y »
  - 1 microtube à bouchon rouge de 75 µL d'une solution d'ADN du phage lambda non muté digéré par l'enzyme EcoRI
  - 1 microtube à bouchon noir de 75 µL d'une solution d'ADN du phage lambda portant une mutation « y » digéré par l'enzyme EcoRI
  - 1 microtube à bouchon bleu de 75 µL d'une solution d'ADN du phage lambda non muté digéré par l'enzyme HindIII
  - 1 microtube à bouchon naturel de 75 µL d'une solution d'ADN du phage lambda portant une mutation « y » digéré par l'enzyme HindIII
  - 1 microtube à bouchon vert de 75 µL d'une solution d'ADN du phage lambda non muté double digéré par les enzymes EcoRI et HindIII
  - 1 microtube à bouchon mauve de 75 µL d'une solution d'un morceau d'ADN du phage lambda portant une mutation « y » double digéré par les enzymes EcoRI et HindIII
- 1 flacon de TBE prêt à l'emploi
- 1 flacon contenant 400 ml d'Azure A prêt à l'emploi : **+ 4°C**
- 1 sachet contenant 1,6g d'agarose noté « agarose » à conserver à température ambiante

### MATERIEL NECESSAIRE :

- Flacon de 1 000 mL et 500 mL
- Flacon de 500 mL supportant le micro-onde
- Eprouvette de 1 000 mL, 500 mL et 250 mL
- Cuve à électrophorèse d'ADN pour gel immergé avec moule, peigne 8 puits et générateur de 70V
- Feutre
- Eau distillée
- Gant anti-chaleur ou manique de
- Micro-ondes ou bain-marie
- Ethanol absolu
- Papier aluminium
- Micropipette 5 à 50 microlitres et cônes adaptés
- Glace ou réfrigérant à microtube

## MATERIEL CONSEILLE :

- Portoir à microtubes

## OBJECTIFS COGNITIFS

Ce TP permet aux élèves de comprendre les principes d'électrophorèse d'ADN, de digestion enzymatique et de dépistage.

Ce kit peut être complété par le kit « Electrophorèse de l'ADN : digestion et carte de restriction ».

## Informations pour organiser au mieux le TP :

Avec le kit, il est possible de couler 5 gels de 20 ml avec 8 puits par gel et de faire manipuler 8 groupes d'élèves : chaque groupe dépose dans 8 puits l'ADN correspondant au phage lambda muté ou au phage lambda non muté : un puits pour l'ADN non digéré, un puits pour l'ADN digéré par EcoRI, un puits pour l'ADN digéré par HindIII et un puits pour l'ADN double digéré par EcoRI et HindIII.

☐NB☐ : un « groupe d'élèves » peut être un binôme ou bien un élève seul selon les besoins.

La conservation des gels est possible jusqu'à deux mois au réfrigérateur. Ils sont observables directement ou avec un rétroprojecteur.

## RAPPELS

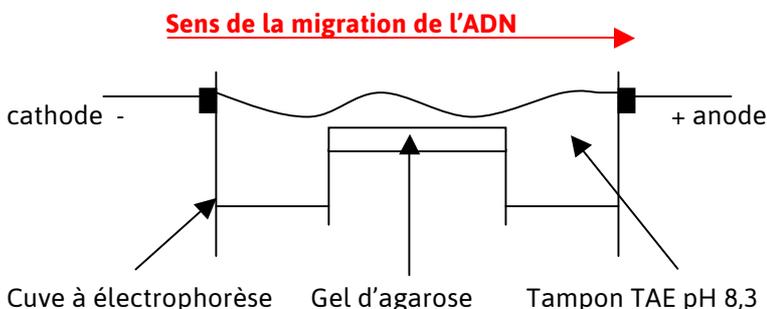
### PRINCIPE DE L'ELECTROPHORESE :

L'ADN est une molécule acide. Dans un tampon à pH = 8,3 comme le TAE<sub>x1</sub>, elle sera chargée négativement.

Nous allons faire migrer l'ADN dans un gel d'agarose immergé dans un tampon soumis à un courant électrique. Dans ces conditions, les molécules d'ADN se dirigent vers le pôle positif (anode) plus ou moins vite en fonction de la taille des fragments. Plus les fragments sont petits, plus ils se déplacent rapidement dans le gel.

Après migration, l'ADN est coloré par l'Azure A.

☐NB☐ : l'Azure A est un colorant moins sensible qu'un agent intercalant de l'ADN comme le bromure d'éthidium (BET) proposé dans certains kits d'électrophorèse d'ADN à migration rapide et révélation immédiate mais l'Azure A n'est pas mutagène ni cancérogène !



Lorsque l'on digère une molécule d'ADN avec diverses enzymes de restriction, on obtient un "code barre" qui peut varier pour une même espèce en fonction des séquences nucléotidiques.

C'est une technique très utilisée dans la détection des maladies génétiques. Une mutation dans une séquence d'un gène peut supprimer ou ajouter un site de coupure pour l'enzyme (rappelons que les enzymes de restriction sont des endonucléases qui coupent l'ADN lorsqu'elles rencontrent des séquences précises) et ainsi entraîner la formation d'un segment plus grand ou de deux segments à la place d'un.

## MARQUEUR DE MIGRATION UTILISE ; LE BLEU DE DEPOT :

C'est un colorant de charge qui permet de suivre visuellement l'avancée de la migration.

Le suivi de la migration se fait grâce aux poids moléculaire des constituants du bleu : le bleu de bromophénol (bleu foncé) migre aussi vite que les plus petits fragments d'ADN et le bleu de xylène cyanol (bleu clair) migre aussi lentement que les plus gros fragments d'ADN.

Une fois mélangé à l'ADN, la solution de bleu de dépôt densifie le mélange pour éviter que l'ADN ne s'échappe des puits.

## ADN UTILISE : GENOME DE PHAGE λ

C'est un bactériophage qui peut infecter *Escherichia coli*. Son ADN est bicaténaire et est constitué de 48502 paires de bases. Son ADN a été entièrement séquencé et l'on connaît les sites de coupures des deux enzymes de restriction EcoRI et HindIII. Cela permet de disposer de marqueurs de longueurs connues. On peut également, grâce à l'électrophorèse, comprendre l'action des enzymes de restriction en comparant l'action de EcoRI, HindIII et de EcoRI+HindIII sur l'ADN de ce bactériophage.

## SITES DE COUPURES DES ENZYMES DE RESTRICTION UTILISEES :

Site de coupure pour l'enzyme de restriction :	
EcoRI	HindIII
$  \begin{array}{c}  \downarrow \\  5'-G-A-A-T-T-C-3' \\  3'-C-T-T-A-A-G-5' \\  \uparrow  \end{array}  $	$  \begin{array}{c}  \downarrow \\  5'-A-A-G-C-T-T-3' \\  3'-T-T-C-G-A-A-5' \\  \uparrow  \end{array}  $

Numéros du nucléotide de coupure d'EcoRI sur l'ADN de	
Phage lambda non muté	Phage lambda avec la mutation y
EcoRI coupe l'ADN 5 fois : 21226, 26104, 31747, 39168, 44972	EcoRI coupe l'ADN 5 fois : 21226, 26104, 31747, 39168, 44972

Numéros du nucléotide de coupure de HindIII sur l'ADN de	
Phage lambda non muté	Phage lambda avec la mutation y
HindIII coupe l'ADN 6 fois 23130, 25157, 27479, 36895, 37459, 37584, 44141	HindIII coupe l'ADN 7 fois 23130, 25157, 27479, 33498, 36895, 37459, 37584, 44141

## PREPARATION

### PREPARATION DE L'AGAROSE POUR 4 GELS DE MIGRATION A 0,8 % D'AGAROSE

(Opération réalisable à l'avance : gel pouvant être conservé quelques semaines à + 4°C dans un flacon bouché)

☐NB☐ : les 4 gels à 8 puits permettent de faire manipuler 8 groupes d'élèves car chaque groupe pourra faire 4 dépôts.

- Transvaser le contenu du sachet noté agarose contenant 1,6 g d'agarose dans un flacon de 500 mL passant au micro-onde
- Ajouter 220 mL de tampon TBE

☐NB☐ : la quantité de tampon utilisée tient compte de l'évaporation due au passage au micro-onde.

- Placer le flacon au micro-onde puissance 1000w pendant 2 à 3 minutes
- Utiliser des gants anti-chaleur ou des maniques de préhension pour saisir en manipuler le flacon chaud
- Surveiller toutes les 30 s l'état de la préparation jusqu'à ce qu'elle soit transparente et sans grumeaux

☐NB☐ : A défaut de micro-ondes, vous pouvez utiliser un bain-marie et surveillant régulièrement le mélange. Mais la fonte est beaucoup plus lente.

- Faire refroidir le mélange fondu jusqu'à une température d'environ 55°C

👁👁 **ATTENTION** 👁👁 : la réussite du TP réside à 50% dans la qualité du gel

Vous pouvez couler les gels tout de suite ou bien conserver le flacon de gel bouché à + 4°C pendant 4 semaines maximum.

### PREPARATION DES GELS A 0,8 % D'AGAROSE ET INSTALLATION DANS LA CUVE A ELECTROPHORESE A ADN

(Opération réalisable un petit peu à l'avance : les gels se conservent environ 1 heure sur leurs supports)

- Disposer le peigne dans le moule à gel de manière à obtenir 8 puits
- Utiliser des gants anti-chaleur ou des maniques de préhension pour saisir et manipuler le flacon d'agarose chaud
- Couler dans le moule l'agarose fondu dont la température est proche de 55°C (cette quantité est prévue pour les moules et cuves de Sordalab). Le volume à couler est à adapter de manière à obtenir un gel d'environ 5 mm d'épaisseur.

☐NB☐ : Avec le contenu d'un sachet d'agarose, il est possible de couler 5 gels de 20 ml d'épaisseur 4 à 5 mm. Le volume réel dépend bien sûr de votre moule.

- Laisser refroidir jusqu'à solidification
- Laisser le peigne en place jusqu'au début du TP
- Humidifier le gel lorsqu'il est solide avec du tampon TBE de manière à ce que le gel ne se dessèche pas.
- Au moment du TP, démouler les puits et placer le gel dans la cuve à électrophorèse sans ou avec son support (s'il y a assez de support pour toute la classe) en veillant à ce que les puits du gel soient orientés du côté de l'électrode négative de la cuve (borne noire).
- Remplir la cuve de tampon TBE préparé au point 1 jusqu'à recouvrement du gel. Il n'est pas nécessaire de recouvrir énormément le gel, ceci ne ferait que rallonger la durée de la migration.

👁👁 **ATTENTION** 👁👁 : certaines cuves à électrophorèse du commerce ont un défaut de fonctionnement et disjonctent quand le gel est recouvert de liquide.

Cependant, le principe de l'électrophorèse nécessite le recouvrement du gel par le tampon de migration. Pour cette raison, les cuves et protocoles que nous proposons suivent le principe du recouvrement du gel par le tampon.

## **PREPARATION DE LA SALLE**

Compter 5 gels pour 8 groupes d'élèves (d'un ou deux élèves) et éventuellement des gels d'entraînement

- Décongeler au dernier moment les microtubes d'ADN
- Garder les microtubes dans de la glace ou dans un bac réfrigérant pour microtubes.
- Disposer des feutres pour identifier les microtubes.

↔ **Conseil** ↔: pour ne pas mélanger les cônes si vous souhaitez les réutiliser, vous pouvez coller des gommettes de couleur correspondante à la couleur du microtube de pipetage.

- Brancher les générateurs pour électrophorèse d'ADN aux cuves contenant éventuellement les gels recouverts de tampon TBE orientés tels que les puits soient du côté de l'électrode négative.
- Veiller à ce qu'il n'y ait pas de tension aux électrodes : ne pas brancher la prise électrique des générateurs.

## **APRES LE TRAVAIL DES ELEVES**

- Lancement de la migration :
- Brancher les générateurs
- Appliquer une tension de 70 à 120 V selon si on veut obtenir une migration précise (70 V) ou rapide et bien moins précise (120V)

👁👁 **ATTENTION** 👁👁: lancer la migration juste après les dépôts : ne pas attendre que les dépôts diffusent dans les gels.

- Arrêt de la migration :
- Laisser migrer jusqu'à ce que le marqueur bleu foncé (bleu de bromophénol) du bleu de dépôt soit environ à 1 cm de l'extrémité du gel (bord du côté opposé aux puits)

☐NB☐ : le temps de migration dépend de plusieurs paramètres : plus le gel est épais, plus le temps de migration est important et plus il y a de tampon de migration au dessus du gel, plus la durée de la migration augmente)

- Avec un gel de 5 mm d'épaisseur juste recouvert par le tampon de migration dans la cuve à électrophorèse Sordalab 1 gel, le temps moyen de migration est de 45 minutes.
- Eteindre le générateur
- Sortir le gel de la cuve

👁👁 ATTENTION 👁👁 : le gel glisse facilement et est fragile surtout s'il est séparé de son support.

### MANIPULATION :

Les mêmes dépôts seront réalisés sur tous les gels de la classe.

Un gel à 8 puits sert à 1 groupe qui va déposer de l'ADN de phage lambda non muté dans les 4 premiers puits de l'ADN de phage lambda muté dans les 4 derniers.

### DEMOULAGE DU PUIITS

👁👁 ATTENTION 👁👁 : vérifier que la cuve n'est pas sous tension avant de manipuler.

- Si les gels ne sont pas déjà dans les cuves, retirer délicatement le peigne des gels : tirer bien dans l'axe pour que les 8 puits calibrés soient bien formés.
- Les puits sont visibles dans le gel.
- Placer le gel dans les cuves, bien immergé dans le tampon. Rajouter éventuellement du TBE.
- Vérifier que les puits du gel sont du côté de la cathode (pôle négatif de couleur noire). Retourner éventuellement le gel.

### DEPOTS DANS LES PUIITS DU GEL IMMERGE

⇌ Conseils ⇌ :

Si vous ne voyez pas bien les puits, vous pouvez placer une feuille de papier noir sous la cuve.

👁👁 ATTENTION 👁👁 :

Veiller à ne pas percer les puits avec la pointe du cône de micropipette.

Déposer lentement pour que l'ADN ne sorte pas du puits.

Les tubes d'ADN sont prêts à l'emploi (le bleu de dépôt a déjà été ajouté)

- Déposer à la micropipette 15 µL des solutions d'ADN:
  - Dans le puit 1 : prélever dans le tube à bouchon orange (noté « λ A »)
  - Dans le puit 2 : prélever dans le tube à bouchon rouge (noté « E A »)
  - Dans le puit 3 : prélever dans le tube à bouchon bleu (noté « H A »)
  - Dans le puit 4 : prélever dans le tube à bouchon vert (noté « EH A »)
  - Dans le puit 5 : prélever dans le tube à bouchon marron (noté « λ B »)
  - Dans le puit 6 : prélever dans le tube à bouchon noir (noté « E B »)
  - Dans le puit 7 : prélever dans le tube à bouchon naturel (noté « H B »)
  - Dans le puit 8 : prélever dans le tube à bouchon mauve (noté « EH B »)

## **LANCER LA MIGRATION**

👁👁 **ATTENTION** 👁👁 : il ne faut pas attendre après les dépôts pour lancer la migration car il faut éviter que l'ADN diffuse dans le gel

- Fermer le couvercle de la cuve
- Brancher la cuve au générateur et le générateur à la prise de courant
- Régler la tension à 70V.

👁👁 **ATTENTION** 👁👁 : Si vous utilisez un voltage plus élevé, les bandes lors de la révélation ne seront pas nettes. Plus la tension est élevée et plus la migration est rapide mais elle devient moins précise.

- Arrêter la migration quand le bleu de bromophénol (bleu foncé) arrive à 1 cm de l'extrémité du gel (bord du côté opposé aux puits)
- Pour donner une évaluation de la durée de la migration, on peut compter entre  $\frac{3}{4}$  d'heure et 1h30. Ce temps dépend de l'épaisseur du gel et de la quantité de tampon le recouvrant ainsi que de la marque de la cuve utilisée.
- 

## **COLORATION ET RINCAGE**

- Rincer le gel à l'eau distillée
- Mettre des gants pour protéger ses mains du colorant !
- Effectuer la coloration :
  - o Placer le gel dans un récipient
  - o Recouvrir le gel de solution d'Azure A (solution prête à l'emploi, après ouverture, conserver à +4°C)
  - o Laisser le gel dans ce bain de colorant pendant environ 5 minutes
  - o Vider le colorant qui reste réutilisable
  - o Laisser reposer le gel pendant quelques minutes (5 à 10 minutes)
- Effectuer le rinçage :
  - o Rincer le gel dans un bain d'eau ou bien à l'eau courante sous le robinet
  - o Dans le cas où le gel est bleu très foncé, éliminer l'excès de colorant de la surface avec quelques mL d'alcool à 70% (préparé par exemple en ajoutant 7 mL d'éthanol absolu à 3 mL d'eau distillée) pendant quelques secondes
  - o Éliminer l'alcool en rinçant le gel à l'eau du robinet plusieurs fois jusqu'à ce que l'eau de rinçage soit translucide.

☐**NB**☐ : On voit apparaître les bandes en quelques minutes mais l'intensité maximale de la coloration s'observe au bout de quelques heures voire même au bout de quelques jours.

Si le gel a été trop décoloré, procéder à une nouvelle étape de coloration-décoloration.

Le gel se conserve ensuite au réfrigérateur pendant deux mois dans un récipient en plastique hermétique avec un petit peu d'eau au fond (pas trop sinon le gel continue à se décolorer) ou emballé dans un film alimentaire.

## **RESULTATS ATTENDUS ET INTERPRETATION**

L'électrophorèse permet d'acquérir des connaissances de bases sur la technique du southern blot et l'action des enzymes de restriction.

Les élèves peuvent établir une carte de restriction de l'ADN de phage lambda non muté et de l'ADN de phage lambda muté.

Il est possible de comparer cette carte à la carte de restriction du phage lambda.

Il est facile de se procurer la séquence complète de l'ADN du phage sur Internet sur les banques de données internationales (Genbank...) ou plus simplement sur le site internet de sordalab : <http://www.sordalab.com>. Il est ensuite possible de rechercher les sites de coupure en utilisant la fonction « rechercher » d'un traitement de texte ou avec un logiciel dédié tel que webcut, nebcutter, biotools... (disponibles sur internet)

## **DESCRIPTION DES BANDES OBTENUES SUR LES GELS :**

- Puit numéro 1 :  
On observe une bande assez épaisse : il s'agit de l'ADN du phage lambda non muté de 48 502 paires de bases
- Puit numéro 2 :  
On observe 6 fragments dus aux 5 coupures de EcoRI sur l'ADN de phage lambda non muté.  
Taille des fragments obtenus : 21226 ; 7421 ; 5804 ; 5643 ; 4878 ; 3530
- Puit numéro 3 :  
On observe 7 fragments dus aux 6 coupures de HindIII sur l'ADN de phage lambda non muté.  
Taille des fragments obtenus : 23130 ; 9416 ; 6557 ; 4361 ; 2322 ; 2027 ; (564 ; 125 : fragments invisibles sur le gel)
- Puit numéro 4 :  
On observe 12 fragments dus aux 11 coupures de EcoRI et HindIII sur l'ADN de phage lambda non muté. Taille des fragments obtenus : 21226 ; 5148 ; 4973 ; 4268 ; 3530 ; 2027 ; 1904 ; 1584 ; (1375 ; 947 ; 831 ; 564 ; 125 : fragments invisibles sur le gel)
- Puit numéro 5 :  
On observe une bande assez épaisse : il s'agit de l'ADN du phage lambda muté de 48 502 paires de bases
- Puit numéro 6 :  
On observe 6 fragments dus aux 5 coupures de EcoRI sur l'ADN de phage lambda muté.  
Taille des fragments obtenus : 21226 ; 7421 ; 5804 ; 5643 ; 4878 ; 3530
- Puit numéro 7 :  
On observe 7 fragments dus aux 6 coupures de HindIII sur l'ADN de phage lambda non muté.  
Taille des fragments obtenus : 23130 ; 6019 ; 6557 ; 4361 ; 3397 ; 2322 ; 2027 ; (564 ; 125 : fragments invisibles sur le gel)
- Puit numéro 8 :  
On observe 12 fragments dus aux 11 coupures de EcoRI et HindIII sur l'ADN de phage lambda non muté.  
Taille des fragments obtenus : 21226 ; 4973 ; 4268 ; 3530 ; 3397 ; 2027 ; 1904 ; 1751 ; 1584 ; (1375 ; 947 ; 831 ; 564 ; 125 : fragments invisibles sur le gel)





## ☞ Pour aller plus loin :

- En comparant les cartes de restriction de l'ADN de phage lambda muté et l'ADN de phage lambda non muté, il est possible de mettre en évidence la mutation (peut être pas unique) : un site HindIII a été créé. Le numéro du nucléotide où a eu lieu la coupure sur ce nouveau site HindIII est 33 498. En regardant le génôme du phage lambda, on peut trouver que ce nucléotide fait normalement parti d'un site XhoI. La mutation transforme un site XhoI en site Hind III.

Site de coupure XhoI :

5' CcoupeTCGAG 3'

3' GAGCTcoupeA 5'

Site de coupure HindIII :

5' AcoupeAGCTT 3'

3' TTCGAcoupeA 5'

Cependant, la mutation ne semble pas parfaite : l'ADN de phage lambda muté n'est pas complètement coupé au niveau de ce site de coupure. La digestion est dite partielle car l'enzyme HindIII ne reconnaît pas à 100% son site de restriction : ceci signifie que le site n'est pas parfaitement conforme à HindIII

## **FICHE SECURITE (guide non exhaustif)**

Ne pas ingérer. En cas de contact avec les yeux ou la peau, rincer abondamment.

Les ADN, les enzymes, le tampon TBE, le bleu de dépôt et l'Azure A ne requièrent pas de précautions d'utilisation particulières. Nous vous recommandons tout de même de manipuler ces produits avec des gants pour éviter tout contact direct avec la peau.

La gélose chaude peut provoquer des brûlures. Manipuler avec des gants anti-chaleur. En cas de brûlures, passer sous l'eau froide immédiatement et contacter le service médical si nécessaire.

## **FICHE TRI ET RECUPERATION**

Les ADN peuvent être jetés à l'évier en faisant couler de l'eau. Il faut diluer le bleu de dépôt et l'azure A avant de les rejeter mais il est préférable de les récupérer dans des containers prévus à cet effet.

Les tubes en plastique, après rinçage, peuvent être jetés dans les bacs de récupération du plastique (sans leur bouchon).

L'agarose peut être jeté à la poubelle.