

Kit électrophorèse de l'ADN n°2

Réf. ELECCRDGSG

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 AO 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 AO** 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 sachet contenant 4 g d'agarose noté « agarose » à conserver à température ambiante
- 1L de TBE 1X.
NB : Le TBE 1X (concentration utilisée par les élèves) ne présente aucune toxicité de part sa dilution. Le TBE étant plus adapté pour le fonctionnement de la cuve BLUEGEL, nous avons décidé de livrer ce kit avec ce tampon.

MATERIEL NECESSAIRE :

- Flacon de 1 000 mL et 500 mL
- Flacon de 500 mL supportant le micro-onde
- Epruvette de 1 000 mL, 500 mL et 250 mL
- Cuve à électrophorèse BlueGel ou cuve standard avec générateur 70V et transilluminateur
- 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 :

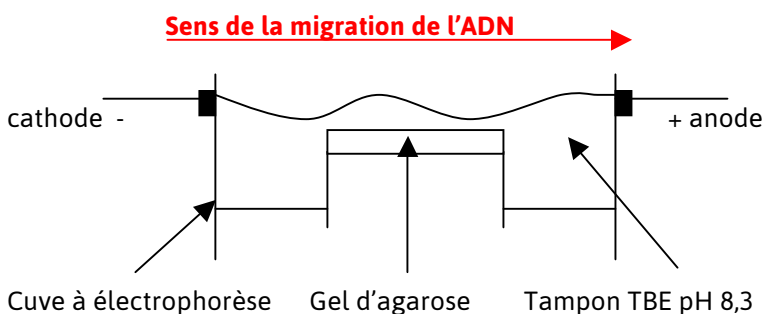
Type de cuve	Nb de gels	Nb de puits	Q à déposer / puits (µl)	% agarose des gels
BlueGel	4	9*	15	2 %
		13*	8	
Standard	4	6	20	0,8 %
		8	15	

*Possibilité de faire 2 lignes de dépôts, soit 18 ou 26 puits par gel.

PRINCIPE DE L'ELECTROPHORESE :

L'ADN est une molécule acide. Dans un tampon à pH = 8,3 comme le TBE1x, 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.

Avec le SafeGreen et un transilluminateur (cuve standard + transilluminateur ou cuve BlueGel), la visualisation de la migration se fait en temps réel sans manipulation supplémentaire.



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.

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

Préparation pour 4 gels d'agarose : concentration en fonction de la cuve (voir tableau p.2)

(Opération réalisable à l'avance : conservation 3 à 6 mois à + 4°C dans un flacon bouché)

• Gels à 2 % :

- Transvaser le contenu du sachet noté agarose contenant 4 g d'agarose dans un flacon de 500 mL passant au micro-ondes
- Ajouter 220 mL de tampon TBE 1X préparé préalablement.
- "NB" : la quantité de tampon utilisée tient compte de l'évaporation due au passage au micro-onde.

• Gels à 0,8 % (pour la préparation de 4 gels) :

- Peser 1.6 g provenant du sachet noté agarose contenant 4 g d'agarose.
 - Les transvaser dans un flacon de 500 mL passant au micro-onde
 - Ajouter 220 mL de tampon TBE1x
- "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 1 à 2 minutes
 - Utiliser des gants anti-chaueur ou des maniques de préhension pour saisir et 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.

NB : Coulez les gels jusqu'à mi-hauteur des peignes

PREPARATION DE LA SALLE

Compter 2 à 4 gels pour 8 groupes d'élèves suivant le choix des peignes

- Décongeler au dernier moment les microtubes d'ADN.
- Garder les microtubes dans de la glace ou dans un bac réfrigérant pour microtubes.
- Préparer des micropipettes pouvant prélever au minimum 10 µL et des cônes adaptés.
- 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.

- ☐ NB ☐ : Brancher les générateurs pour électrophorèse d'ADN aux cuves contenant éventuellement les gels recouverts de tampon TBE1x 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.

MANIPULATION avec la cuve BlueGel

Mise en œuvre de l'électrophorèse :

- Placer le support de gel contenant le gel dans la cuve à électrophorèse. Un détrompeur sur le support du gel vous empêche de mal positionner le gel.
- Verser 25 ml de tampon TBE 1X dans la cuve jusqu'à recouvrir le gel et remplir les puits (attention : plus il y a de tampon, plus la migration prend de temps).
- Pulvériser du spray anti-condensation sur la partie intérieure du couvercle (orange) puis l'essuyer avec un tissu non pelucheux.

Dépôt et migration des ADN :

- Secouer d'**un seul mouvement sec de haut en bas** les tubes d'ADN afin de faire retomber tout le liquide dans le fond du tube. Pour récupérer la totalité du liquide il faut centrifuger les tubes quelques secondes à 3000 rpm.

- Déposer l'ADN (la quantité dépend du peigne utilisé, voir p. 2) à l'aide d'une micropipette et de cônes à usage unique dans des puits distincts. Faire doucement et éviter les bulles (attention à bien noter l'ordre des dépôts).
- Déposer une série de 5 échantillons d'ADN différents par gel.
- Fermer la cuve à électrophorèse et brancher l'alimentation.
- Mettre en marche l'alimentation en appuyant sur le bouton marche. **Le voyant lumineux doit s'allumer.** Si ce n'est pas le cas, vérifiez que l'appareil est branché au secteur (230V) et que le couvercle est bien fermé.

Dès le début de la migration vous pouvez allumer le transilluminateur et suivre votre migration en temps réel. Pour augmenter le contraste, dépliez et placez la chambre noire sur la cuve en prenant bien garde à ne pas soulever le couvercle orange.

En effet, le soulèvement du couvercle éteint immédiatement la cuve par mesure de sécurité. Il faut donc surveiller que la lumière d'indication de fonctionnement est bien allumée après avoir touché à la cuve. Un arrêt de la cuve pendant trop longtemps fait 'disparaître' l'ADN qui va se diffuser partout.

MANIPULATION avec une cuve standard

Mise en œuvre de l'électrophorèse :

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 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 TBEx1.
- Vérifier que les puits du gel sont du côté de la cathode (pôle négatif de couleur noire). Retourner éventuellement le gel.

Dépôt et migration des ADN :

- Secouer d'**un seul mouvement sec de haut en bas** les tubes d'ADN afin de faire retomber tout le liquide dans le fond du tube. Pour récupérer la totalité du liquide il faut centrifuger les tubes quelques secondes à 3000 rpm.
- Déposer l'ADN (la quantité dépend du peigne utilisé, voir p. 2) à l'aide d'une micropipette et de cônes à usage unique dans des puits distincts. Faire doucement et éviter les bulles (attention à bien noter l'ordre des dépôts).
- 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)
- Placer et allumer le transilluminateur sous la cuve

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

📄 **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)

DEPOTS DANS LES PUITS DU GEL IMMERGE

👁️👁️ **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 les solutions d'ADN (voir tableau page 2) :
 - o Dans le puit 1 : prélever dans le tube à bouchon orange (noté « λ A »)
 - o Dans le puit 2 : prélever dans le tube à bouchon rouge (noté « E A »)
 - o Dans le puit 3 : prélever dans le tube à bouchon bleu (noté « H A »)
 - o Dans le puit 4 : prélever dans le tube à bouchon vert (noté « EH A »)
 - o Dans le puit 5 : prélever dans le tube à bouchon marron (noté « λ B »)
 - o Dans le puit 6 : prélever dans le tube à bouchon noir (noté « E B »)
 - o Dans le puit 7 : prélever dans le tube à bouchon naturel (noté « H B »)
 - o Dans le puit 8 : prélever dans le tube à bouchon mauve (noté « EH B »)
- Fermer la cuve à électrophorèse et brancher l'alimentation.
- Mettre en marche l'alimentation en appuyant sur le bouton marche. **Le voyant lumineux doit s'allumer.** Si ce n'est pas le cas, vérifiez que l'appareil est branché au secteur (230V) et que le couvercle est bien fermé.

Dès le début de la migration vous pouvez allumer le transilluminateur et suivre votre migration en temps réel. Pour augmenter le contraste, dépliez et placez la chambre noire sur la cuve en prenant bien garde à ne pas soulever le couvercle orange.

En effet, le soulèvement du couvercle éteint immédiatement la cuve par mesure de sécurité. Il faut donc surveiller que la lumière d'indication de fonctionnement est bien allumée après avoir touché à la cuve. Un arrêt de la cuve pendant trop longtemps fait 'disparaître' l'ADN qui va se diffuser partout.

MANIPULATION avec une cuve standard

Mise en œuvre de l'électrophorèse :

- 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)
- Placer et allumer le transilluminateur sous la cuve

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

☐ **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)

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)

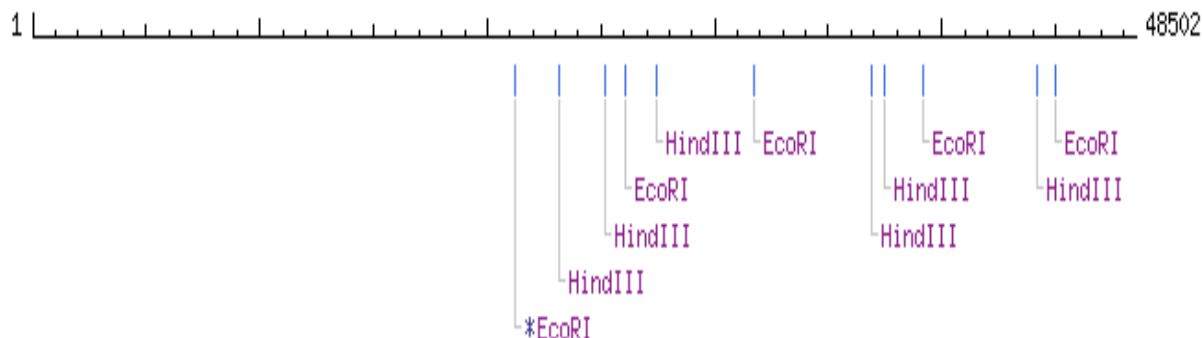
DESCRIPTION DES BANDES OBTENUES SUR LES GELS :

- 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)

BANDES OBTENUES SUR LES ELECTROPHORESSES DE L'ADN DU PHAGE λ :

 48 502	 21 226  7 421  5 804  5 643  4 878  3 530	 23130  9416  6682  4361  2322  2027	 21226  5148  4973  4268  3530  2027  1904  1584 (1375) (947) (831) (564)
ADN de phage λ	Digéré par EcoRI	Digéré par HindIII	Double digéré par EcoRI et HindIII

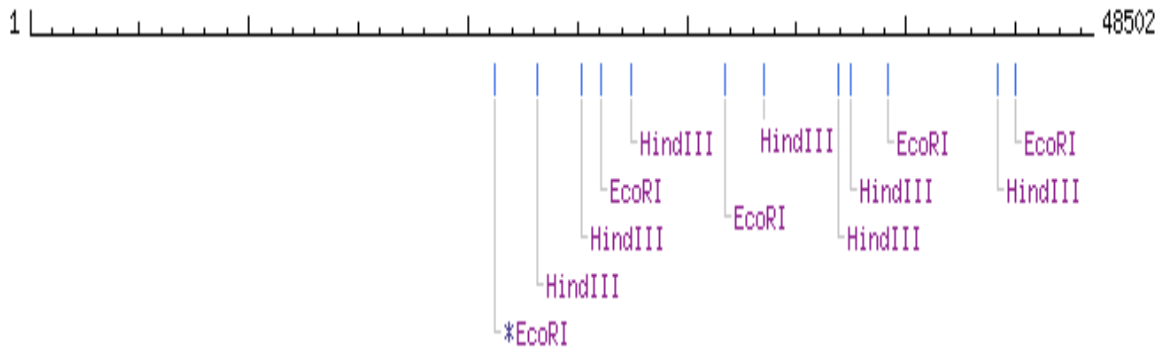
CARTE DE RESTRICTION DE L'ADN DE PHAGE LAMBDA :



BANDES OBTENUES SUR LES ELECTROPHORESIS DE L'ADN DU PHAGE λ MUTE :

<input type="checkbox"/> 48 502	<input type="checkbox"/> 21 226 <input type="checkbox"/> 7 421 <input type="checkbox"/> 5 804 <input type="checkbox"/> 5 643 <input type="checkbox"/> 4 878 <input type="checkbox"/> 3 530	<input type="checkbox"/> 23130 <input type="checkbox"/> 6682 <input type="checkbox"/> 6019 <input type="checkbox"/> 4361 <input type="checkbox"/> 3397 <input type="checkbox"/> 2322 <input type="checkbox"/> 2027 (564) (125)	<input type="checkbox"/> 21226 <input type="checkbox"/> 5148 <input type="checkbox"/> 4973 <input type="checkbox"/> 4268 <input type="checkbox"/> 3530 <input type="checkbox"/> 3397 <input type="checkbox"/> 2027 <input type="checkbox"/> 1904 <input type="checkbox"/> 1751 <input type="checkbox"/> 1584 (1375) (947) (831) (564)
ADN de phage λ muté	Digéré par EcoRI	Digéré par HindIII	Double digéré par EcoRI et HindIII

CARTE DE RESTRICTION DE L'ADN DE PHAGE LAMBDA MUTE:



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 SafeGreen 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-chaueur. En cas de brûlures, passer sous l'eau froide immédiatement et contacter le service médical si nécessaire.

- Ne pas inhaler ni ingérer les produits contenus dans ce kit. Eviter les projections dans les yeux. En cas de projection dans les yeux, rincer à grande eau.

Cependant, aucun des produits contenus dans ce kit ne requièrent de précaution particulière.

- Le gel d'agarose chaud peut provoquer des brûlures. Manipuler avec des gants anti-chaueur.

En cas de brûlures, passer la zone atteinte sous l'eau froide pendant 15 minutes.

- Nous vous conseillons de manipuler les colorants avec des gants.

Utilisation du SAFEGREEN

Après l'électrophorèse, voir les résultats avec une lumière bleue et un cache orange.

Extrait de la FDS (à retrouver sur notre site web : www.sordalab.com)

SECTION 2: Identification des dangers

2.1 Classification de la substance ou du mélange

Classification en accord avec la réglementation (EC) No 1272/2008

N'est pas une substance ni un mélange dangereux conformément au règlement (CE) No. 1272/2008.

2.2 Éléments d'étiquetage

Étiquetage en accord avec la réglementation (EC) No 1272/2008

Le produit ne nécessite pas d'étiquetage conformément aux directives de la CE et aux réglementations nationales du pays concerné.

2.3 Autres dangers

Une substance/préparation ne contient aucun ingrédient considéré comme persistant, bioaccumulable et toxique (PBT), ou très persistant et très bioaccumulable (vPvB) à des niveaux de 0,1% ou plus.

FICHE CONSERVATION

Attention : ces conditions de stockage sont à respecter scrupuleusement pour permettre une conservation des produits du kit pendant 3 mois.

Les échantillons d'ADN sont stockés à -20°C pendant 3 mois.

Le tampon TBE 1X se conserve pendant 3 à 6 mois à +4°C. Ce tampon est périmé lorsqu'un précipité blanc apparaît au fond du flacon.

L'agarose en poudre se conserve indéfiniment à température ambiante dans un endroit sec. L'agarose en gel se conserve environ un mois à +4°C dans un récipient hermétiquement fermé, type bouteille. Veillez à ajouter un peu d'eau par-dessus le gel de façon à ce qu'il reste toujours humide.

FICHE TRI ET RECUPERATION

Les ADN, le SafeGreen et le TBE peuvent être jetés à l'évier en faisant couler de l'eau.

Les tubes de plastiques, après rinçage, peuvent être jetés dans les bacs de récupération du plastique (sans leur bouchon). L'agarose peut être jeté à la poubelle. Retrouvez la vidéo du produit sur notre site web : www.sordalab.com