

## TP3 : Electrophorèse sur gel d'agarose

### Séparation et analyse des acides nucléiques

#### But de TP :

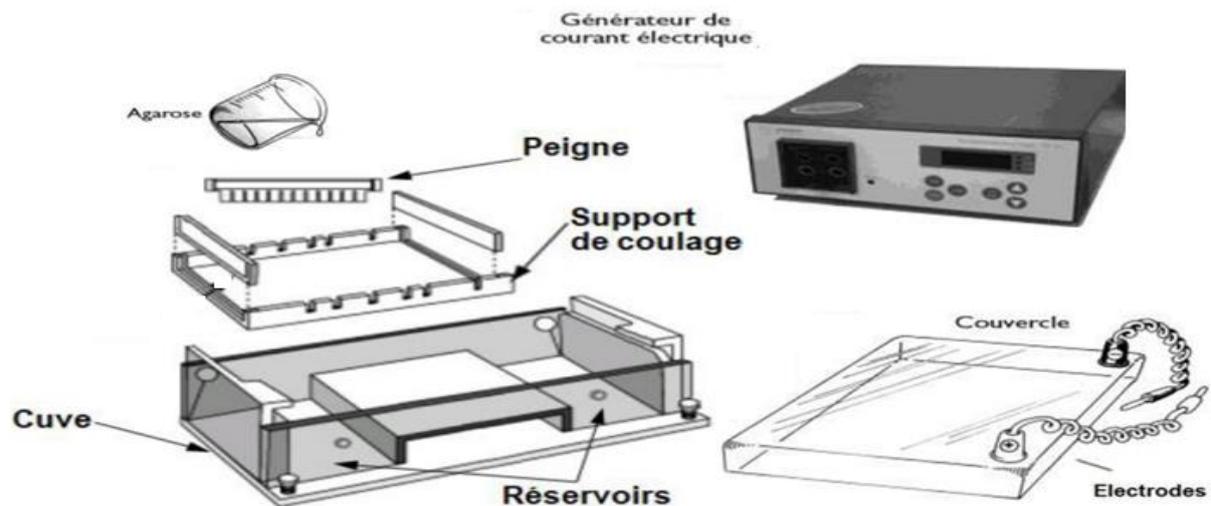
Séparer et identifier des fragments d'ADN et déterminer leur taille.

#### Principe :

L'électrophorèse sur gel d'agarose est une technique couramment utilisée au laboratoire de biochimie:

- soit pour séparer et identifier des fragments d'acides nucléiques (ADN ou ARN), pour déterminer leur taille, pour en estimer la quantité ;
- soit pour purifier un fragment d'ADN de taille connue.

L'ADN étant une molécule chargée négativement (au niveau des groupements phosphates), il est possible de la faire migrer sous l'effet d'un champ électrique vers le pôle positif. La migration se faisant de plus en plus dans un gel d'agarose ou de polyacrylamide, les grosses molécules seront plus freinées que les petites par le milieu d'électrophorèse. On observera donc une séparation des fragments d'ADN en fonction de leur masse.



#### Matériels et produits :

Balance, verre de montre, Spatule

Erlenmeyer

Micro-onde ou bain marie

Micropipette

Tubes à essai,

Support et un peigne

Cuve d'électrophorèse

Agarose

Bromure d'éthidium (BET) ou Cyber green ou Midori green

Tampon (Tris Borate EDTA "TBE" ou Tris Acétate EDTA "TAE")

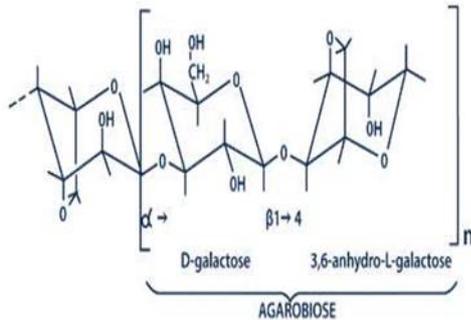
Bleu de bromophénol ou xylène cyanol

Glycérol

## Manipulation :

### 1. Préparation du gel d'agarose

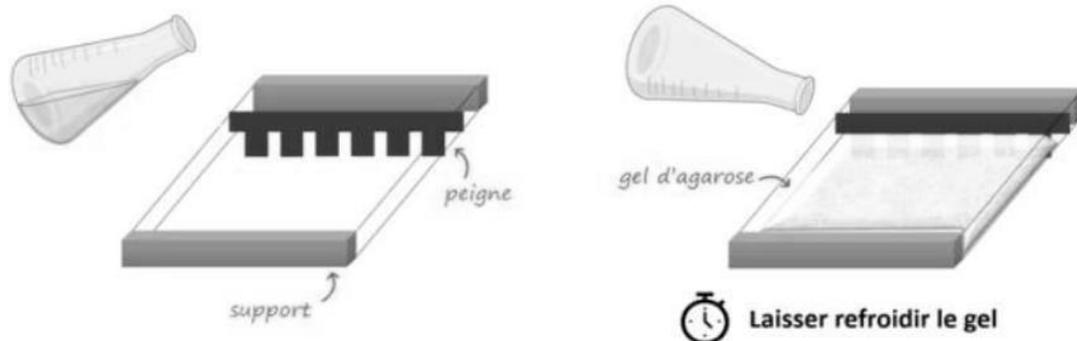
- Peser 1g l'agarose en poudre, et dissoudre cet agarose dans 100ml du tampon de migration (la proportion d'agarose dépend de la taille des molécules d'ADN à séparer). Le tampon de migration est soit le Tris Borate EDTA "TBE" ou Tris Acétate EDTA "TAE".



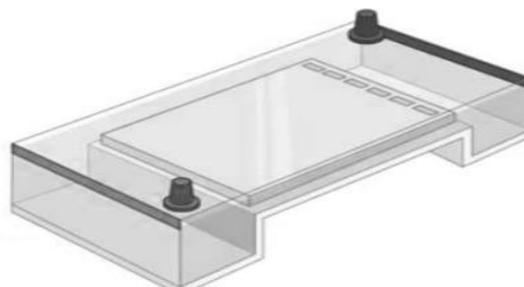
% Agarose	Taille des fragments d'ADN séparés (résolution)
0,5 %	1 kb à 30 kb*
0,7 %	800 pb à 12 kb
1,0 %	500 pb à 10 kb
1,2 %	400 pb à 7 kb
1,5 %	200 pb à 3 kb
2,0 %	50 pb à 2 kb

\*kb = 1000 pb

- Porter la solution à ébullition pour bien dissoudre l'agarose.
- Laisser la solution refroidir à environ 60 °C.
- Rajouter quelques microlitres de Bromure d'éthidium "BET" qui est un agent intercalant de l'ADN, capable de se lier à l'ADN et d'émettre une fluorescence sous lumière Ultra-Violet.
- Verser la solution d'agarose dans un plateau de support où elle se solidifier lorsqu'elle se refroidit.



- Placer le gel dans une cuve d'électrophorèse et submerger de tampon de migration.



### 2. Préparation les échantillons à analyser

Les échantillons peuvent être fragmentés par les enzymes de restriction puis ils sont mélangés avec le tampon de charge contenant : un colorant (le bleu de bromophénol ou le xylène cyanol)

qui permet de suivre l'avancé des échantillons dans le gel, le glycérol qui permet augmenter la viscosité de l'échantillon

### 3. Migration électrophorétique

Prélever l'échantillon à l'aide d'une micropipette et le déposer délicatement dans le gel en ce plaçant à la verticale.

Étalonner le gel avec un marqueur de taille.



Après avoir terminé la préparation de la plaque électrophorétique, fermer la cuve et appliquer le champ électrique. Laisser migrer jusqu'à ce que le colorant de charge arrive à proximité du bord du gel (5 à 10 V par cm de gel).

### 4. Visualisation et analyse

Les molécules d'ADN ne sont pas visibles à l'œil nu. La visualisation des bandes correspondant aux fragments d'ADN se fait soit sous lumière UV soit par émissions de fluorescence.

