

République Algérienne Démocratique et Populaire
Centre Universitaire Abdelhafid BOUSSOUF Mila
Institut des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biotechnologie Végétale

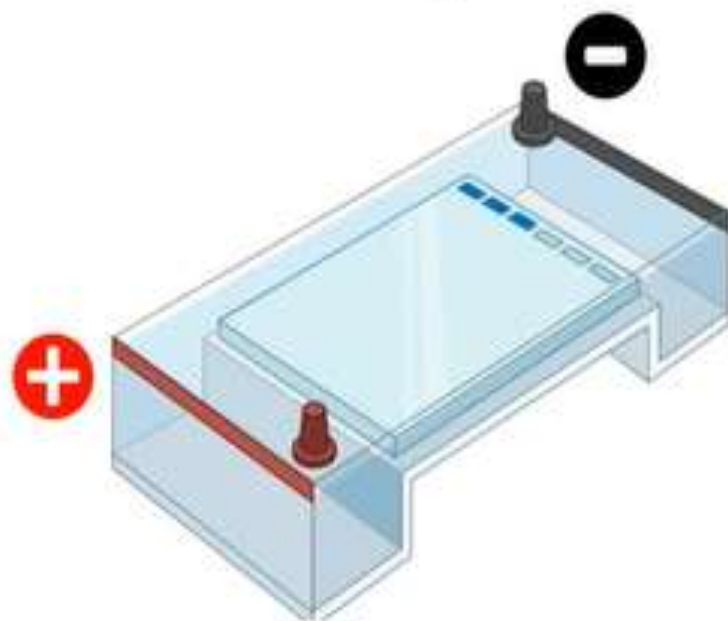
Chapitre IV: Méthodes Électrophorétiques

Master 1: Biotechnologie Végétale

ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE

Séparation des acides nucléiques

Techniques de
laboratoire



L'électrophorèse des acides nucléiques

Séparation des acides nucléiques (ADN, ARN)

Séparation selon la taille

Dans un gel d'agarose



Sous l'effet d'un champ électrique





Agarose en poudre



Peser l'agarose



Agarose



+ Tampon TAE
(Tris, Acide acétique, EDTA)



Chauffer pour Solubiliser
l'agarose dans le tampon TAE

Composition du tampon TAE (Tris, Acide acétique, EDTA)

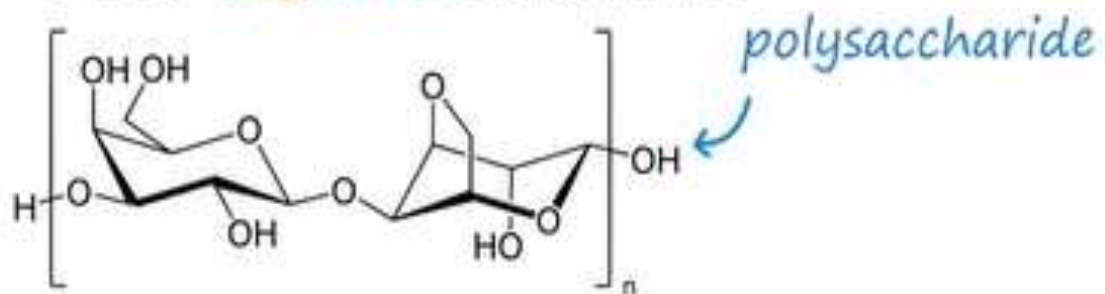
Tris 40 mM

Acide acétique 20 mM

EDTA 1 mM

1

Peser l'**agarose** en poudre

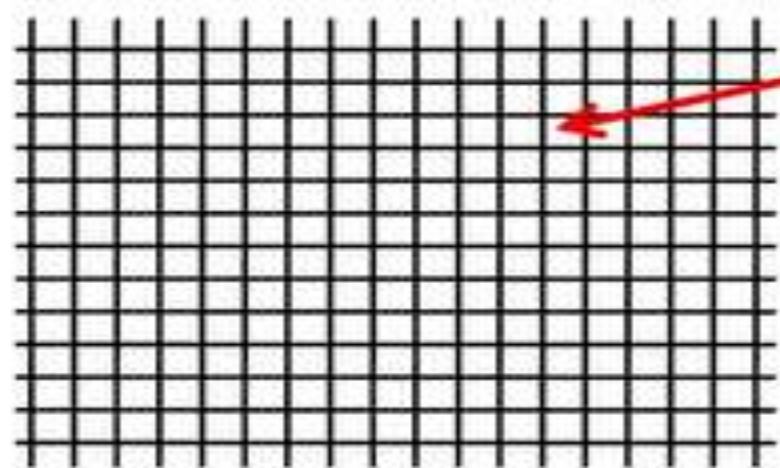


Quel pourcentage d'agarose choisir ?

% 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



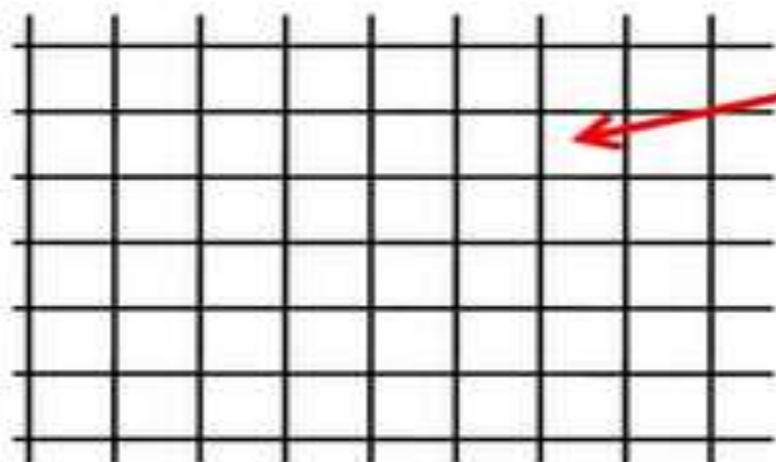


Gel d'agarose concentré

Mailles du gel serrées



**Séparation de petits
fragments d'acide nucléique**



Gel d'agarose moins concentré

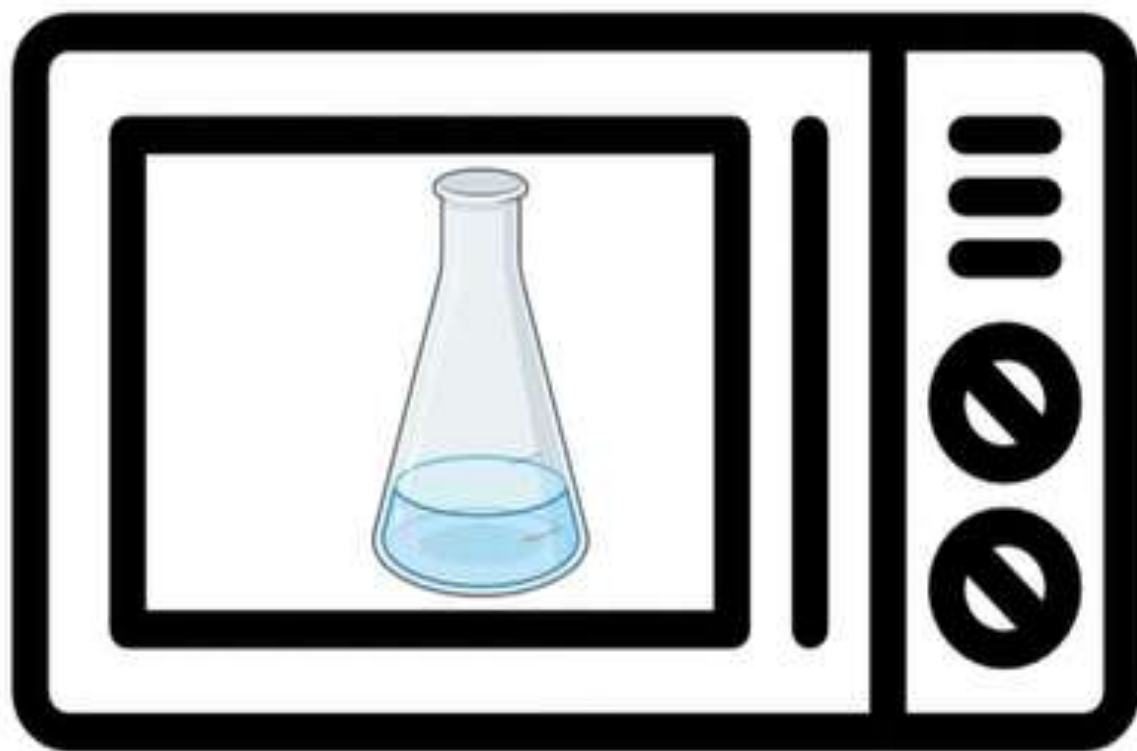
Mailles du gel larges



**Séparation de grands
fragments d'acide nucléique**

3

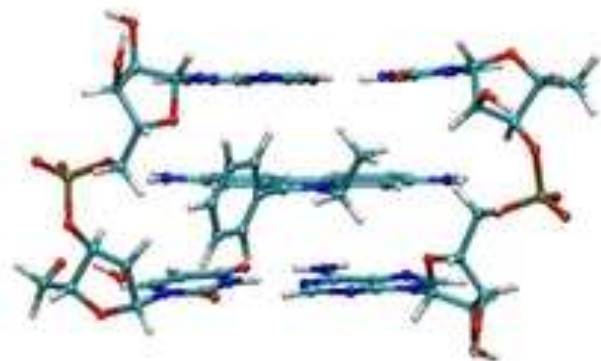
Porter la solution à ébullition
pour bien dissoudre l'agarose

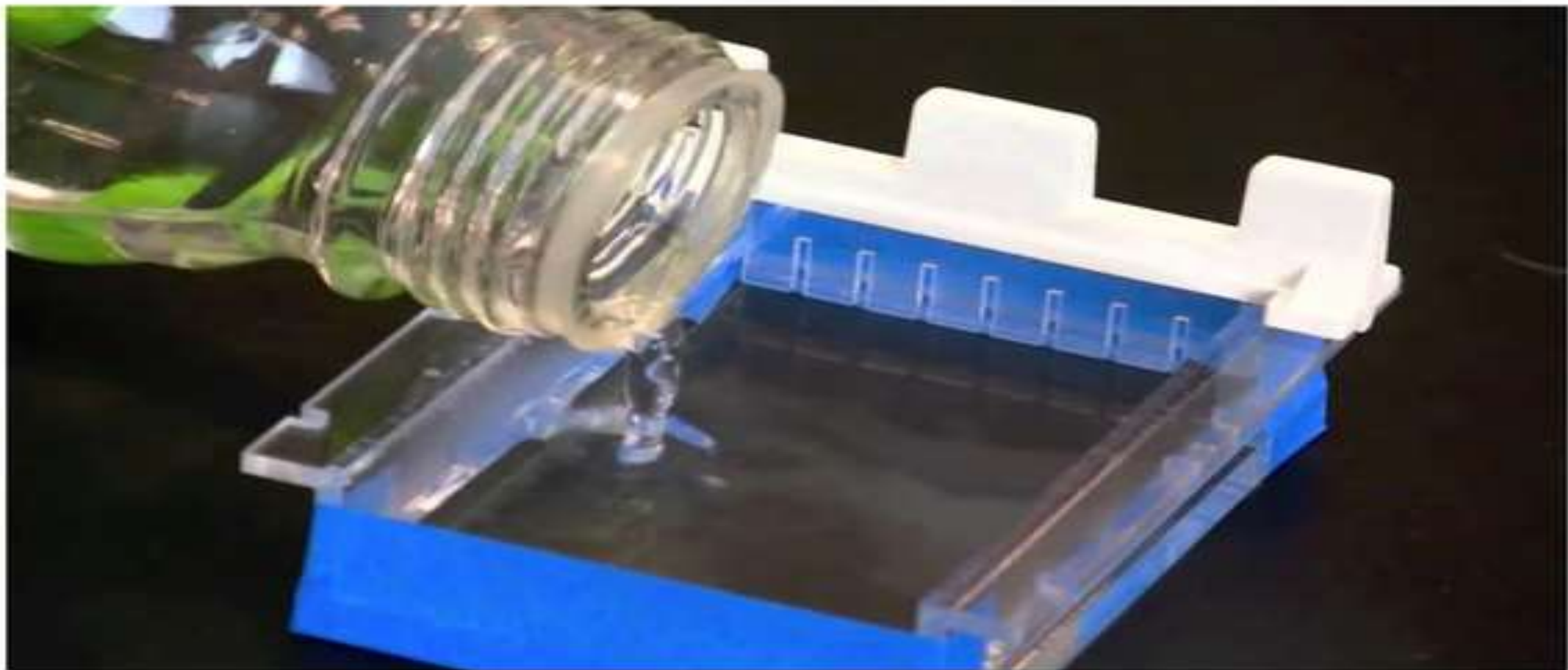


4

Rajouter quelques microlitres
d'**agent intercalant**

Bromure d'éthidium (BET)
SYBR Green
Midori Green





Couler l'agarose dans le moule avec le peigne et laisser refroidir

Peigne



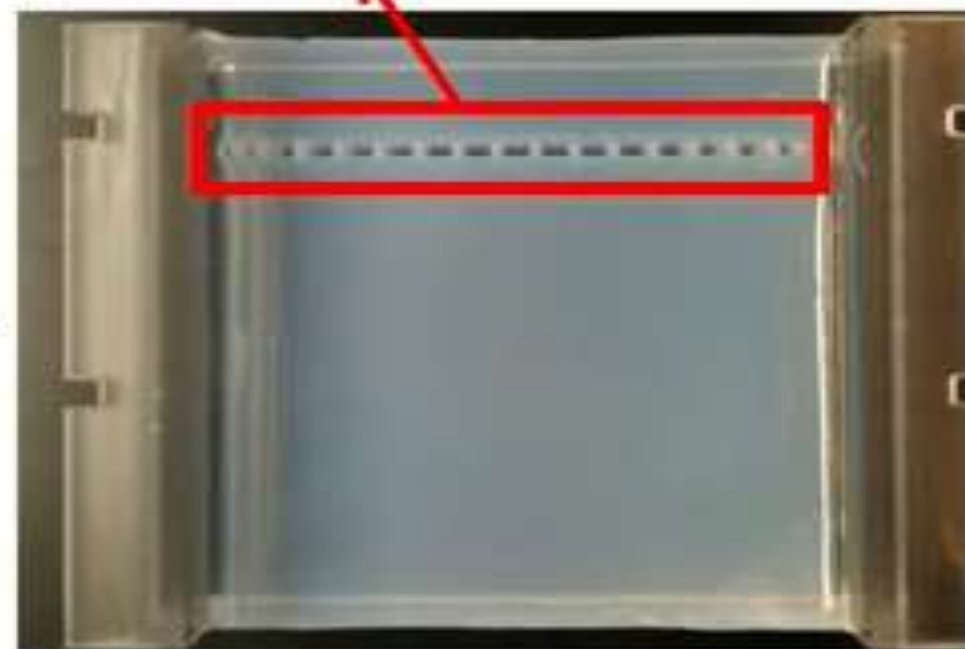
Laisser refroidir



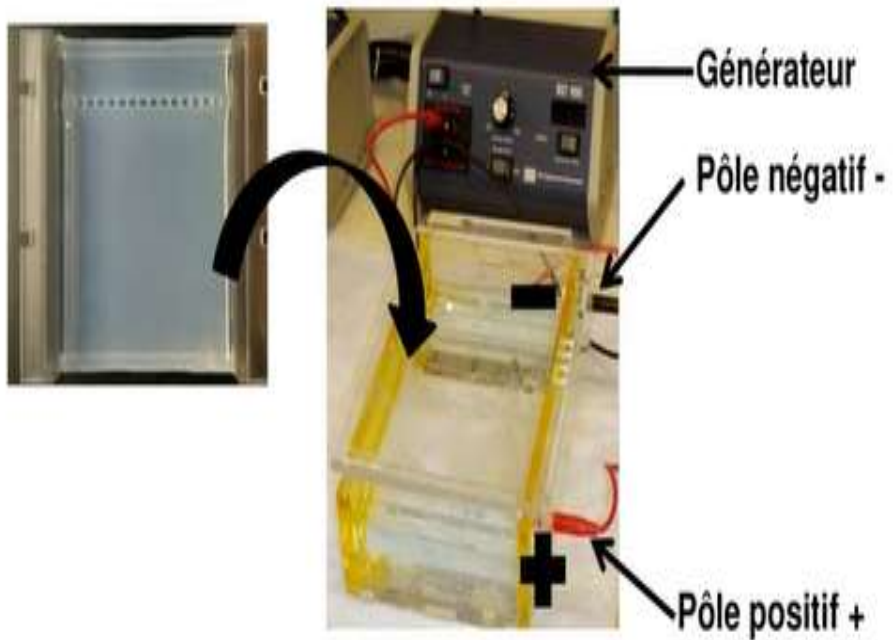
Moule

**Couler l'agarose dans le moule
avec le peigne**

Puits de dépôt



**Gel d'agarose polymérisé
prêt à l'emploi**



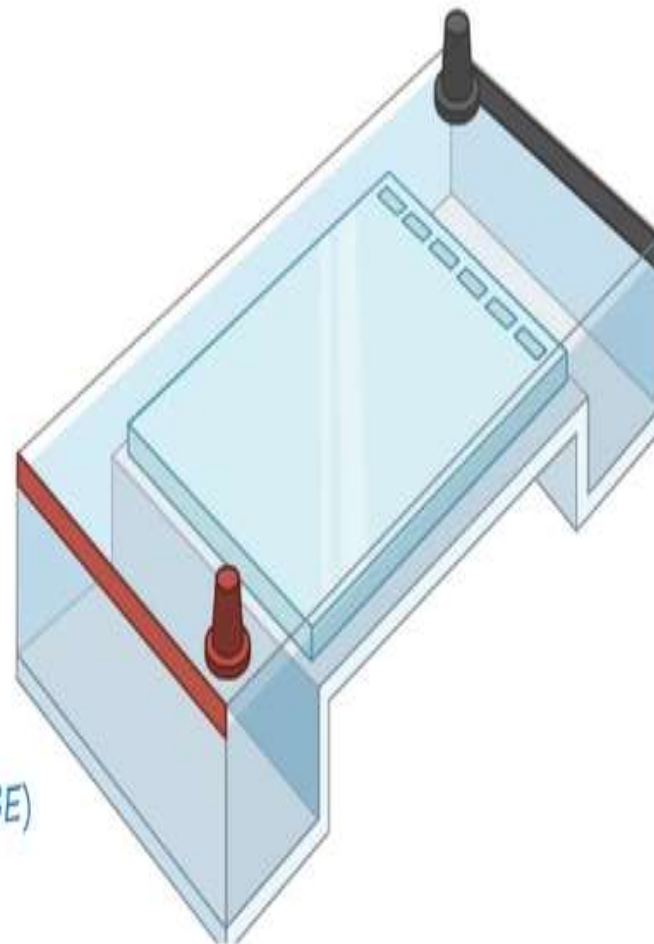
Cuve contenant le tampon de migration TAE

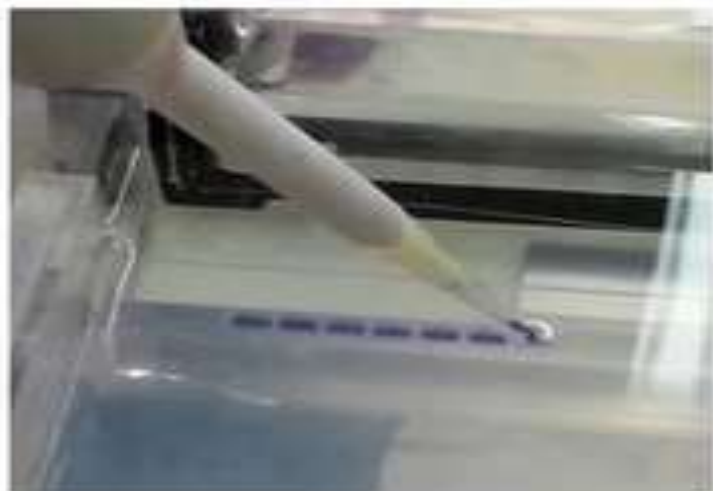


Tampon de migration (TAE ou TBE)

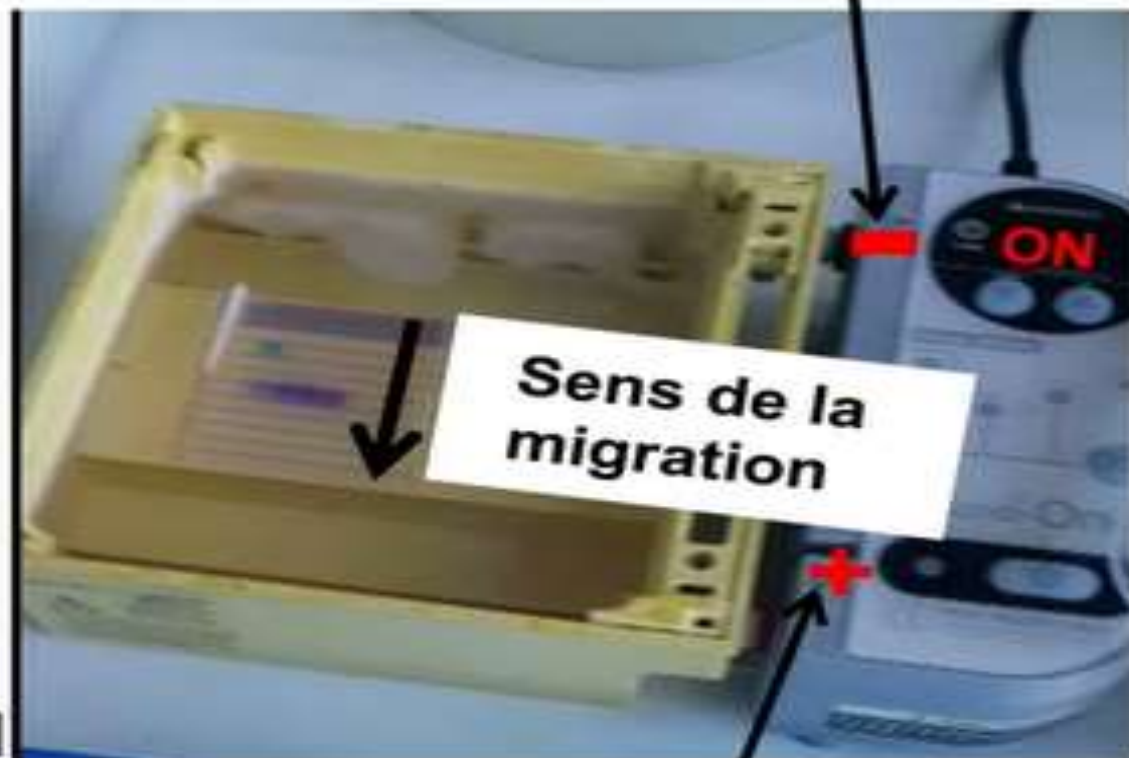
6

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





ON

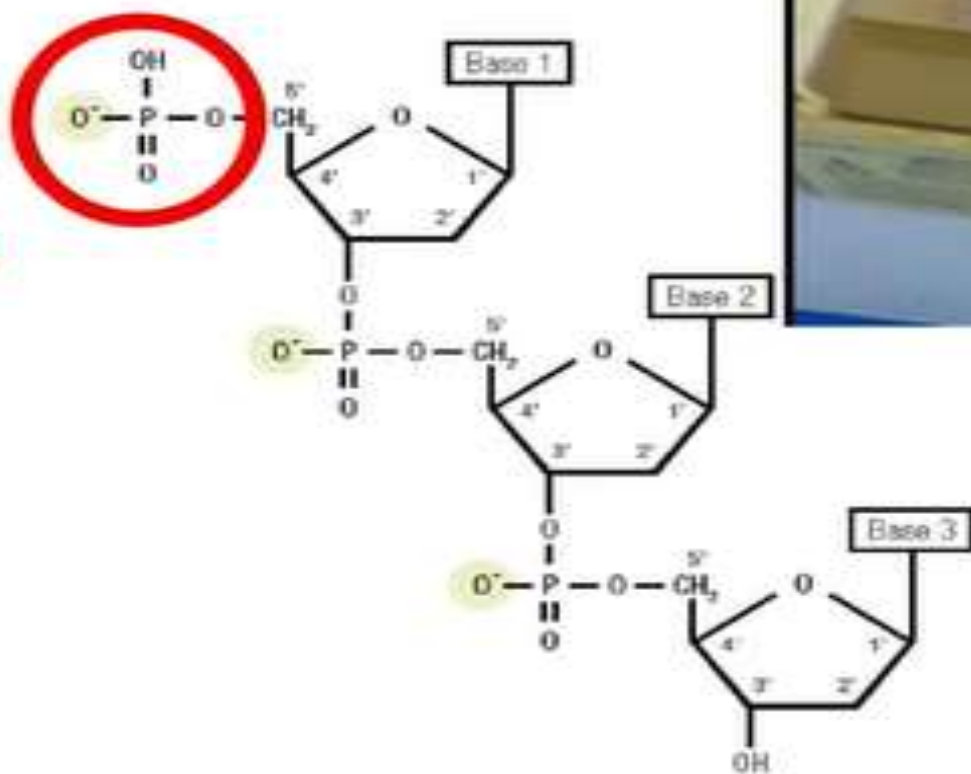


Pôle négatif -

Sens de la migration

Pôle positif +

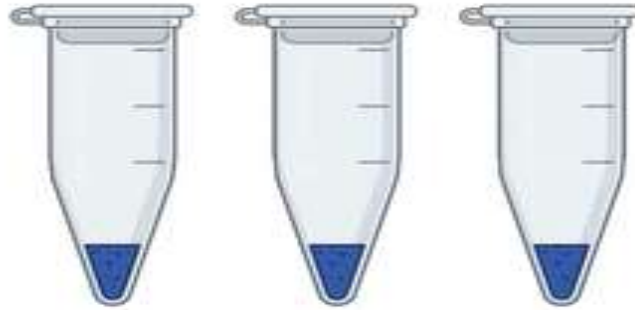
Groupe
phosphate
chargé
négativement



2

Préparation des échantillons

échantillons d'ADN à analyser



- ✓ Eventuelle digestion des échantillons par des **enzymes de restriction**
- ✓ Ajout du tampon de charge contenant :

Bleu de bromophénol

Xylène cyanol

Glycérol

Suivi de l'avancée des échantillons dans le gel

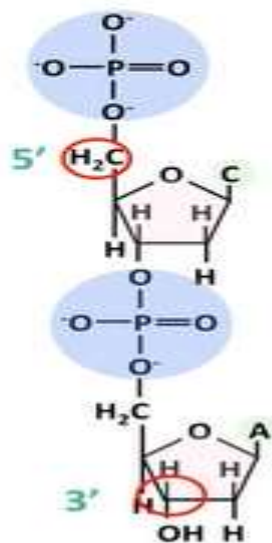
Augmentation de la viscosité



3

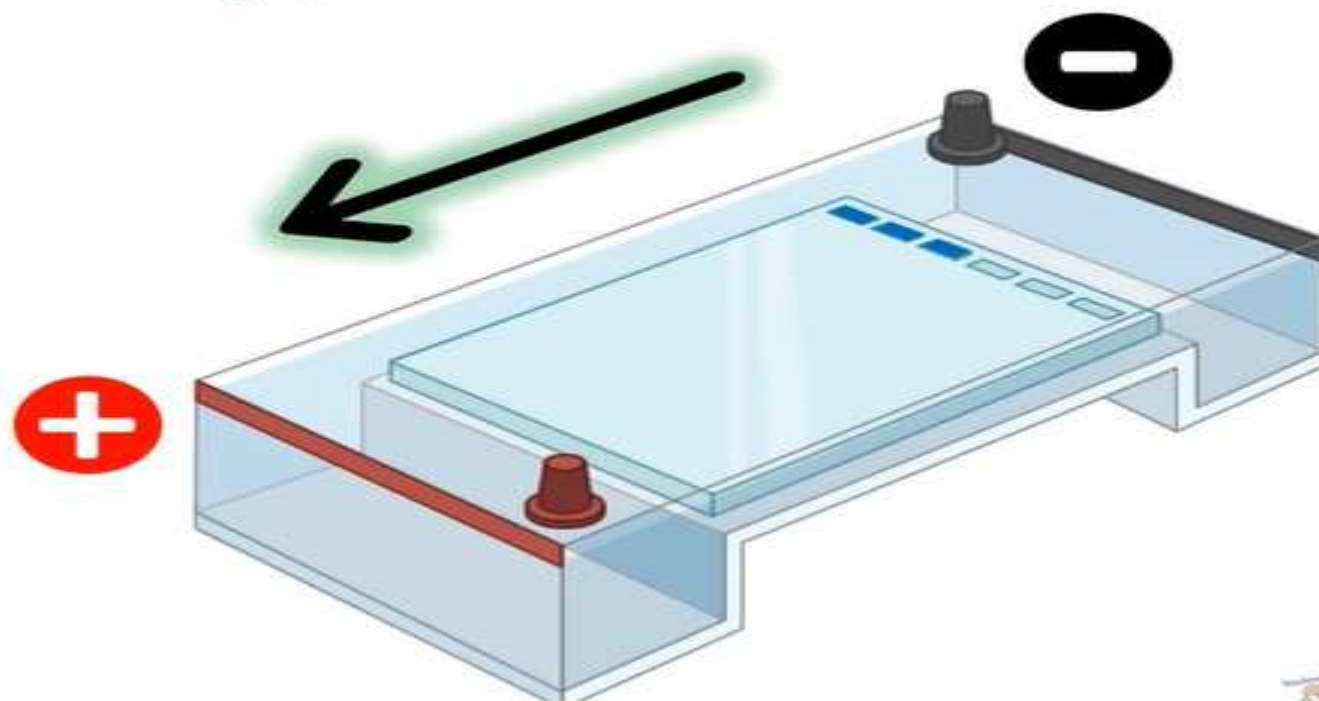
Migration électrophorétique

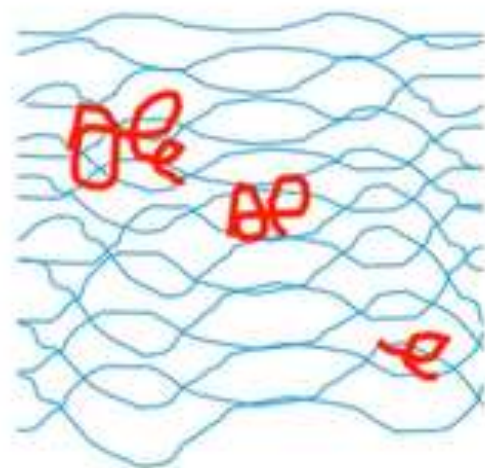
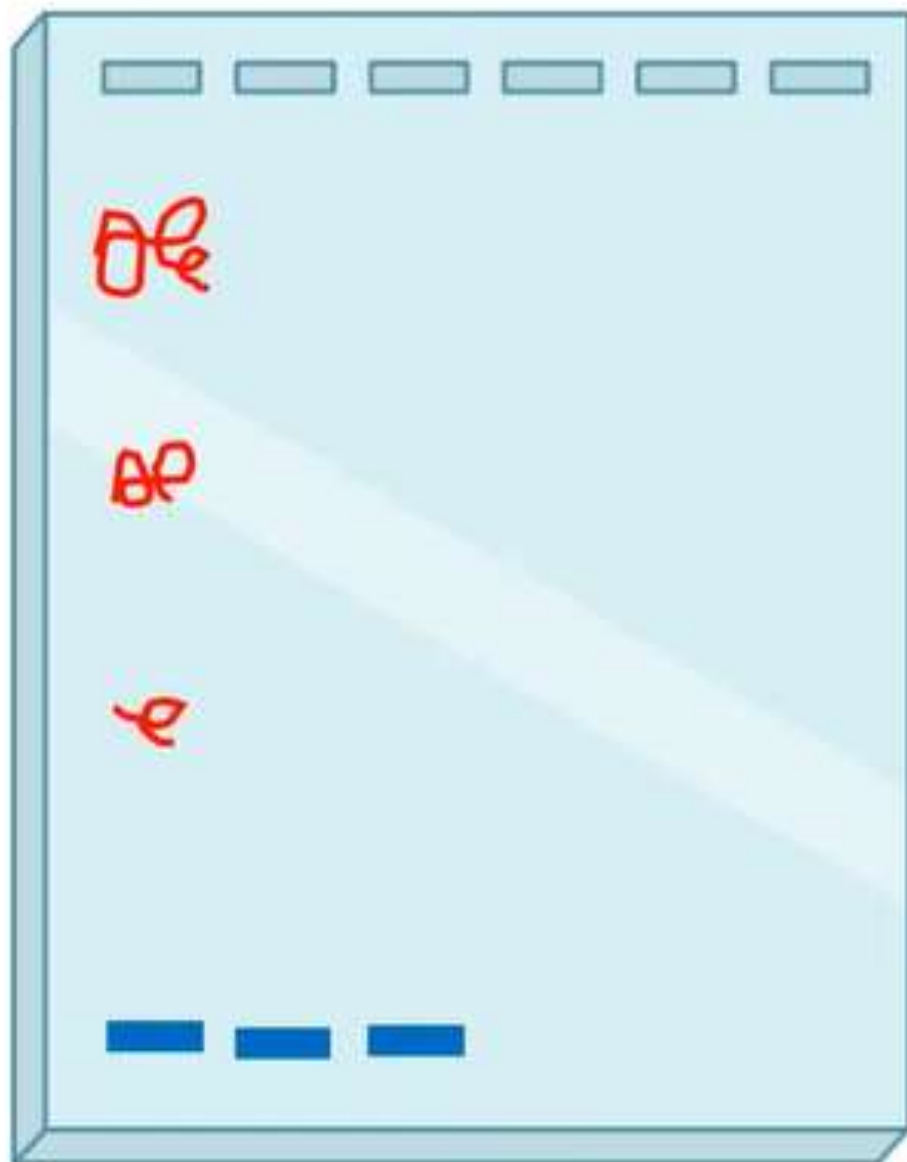
Les acides nucléiques sont chargés négativement.
Ces charges négatives sont portées par les groupements **phosphates**.



On applique 5 à 10 V par cm de gel

Typiquement 100 V





La **résolution** du gel dépend du pourcentage en agarose.

Séparation des molécules de grande taille
→ Faible pourcentage en agarose

Séparation des molécules de petite taille
→ Augmentation du pourcentage en agarose

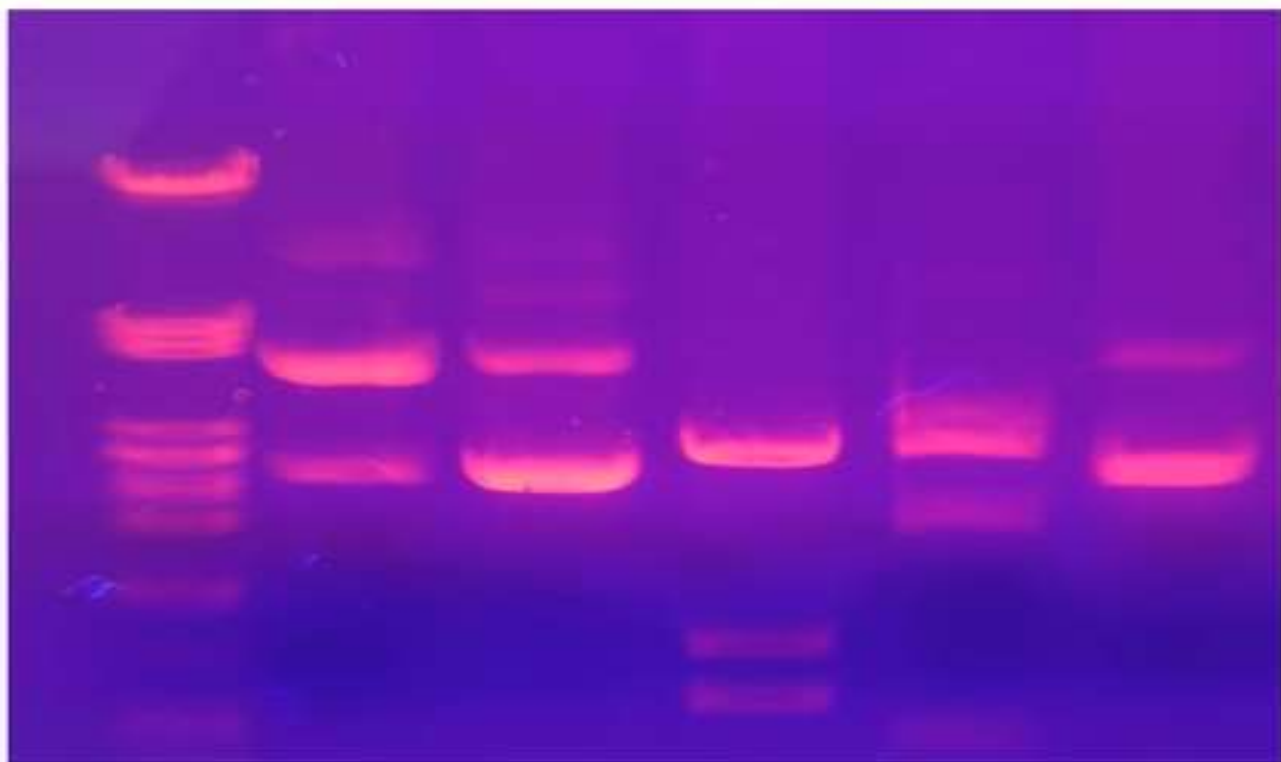


4

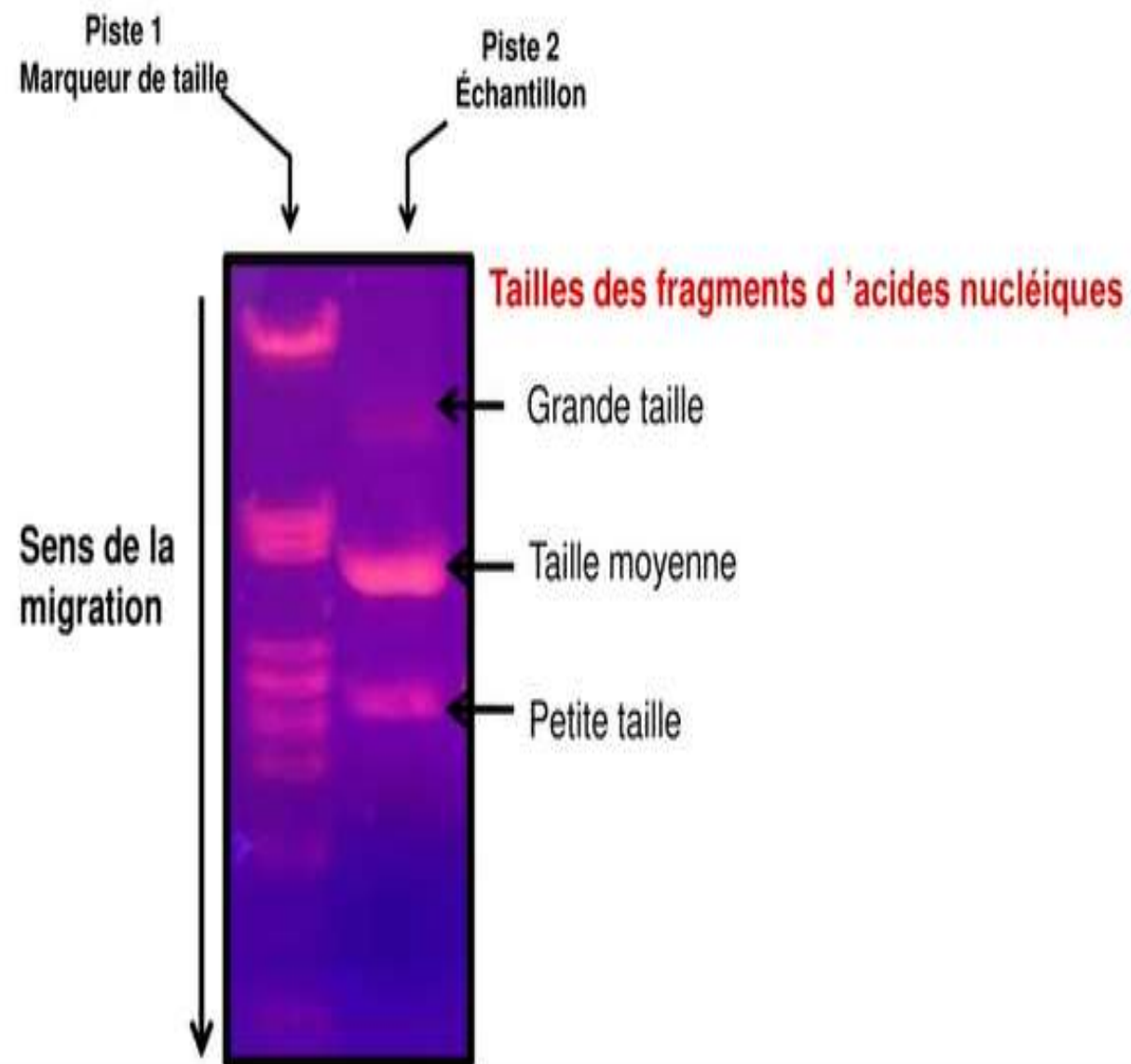
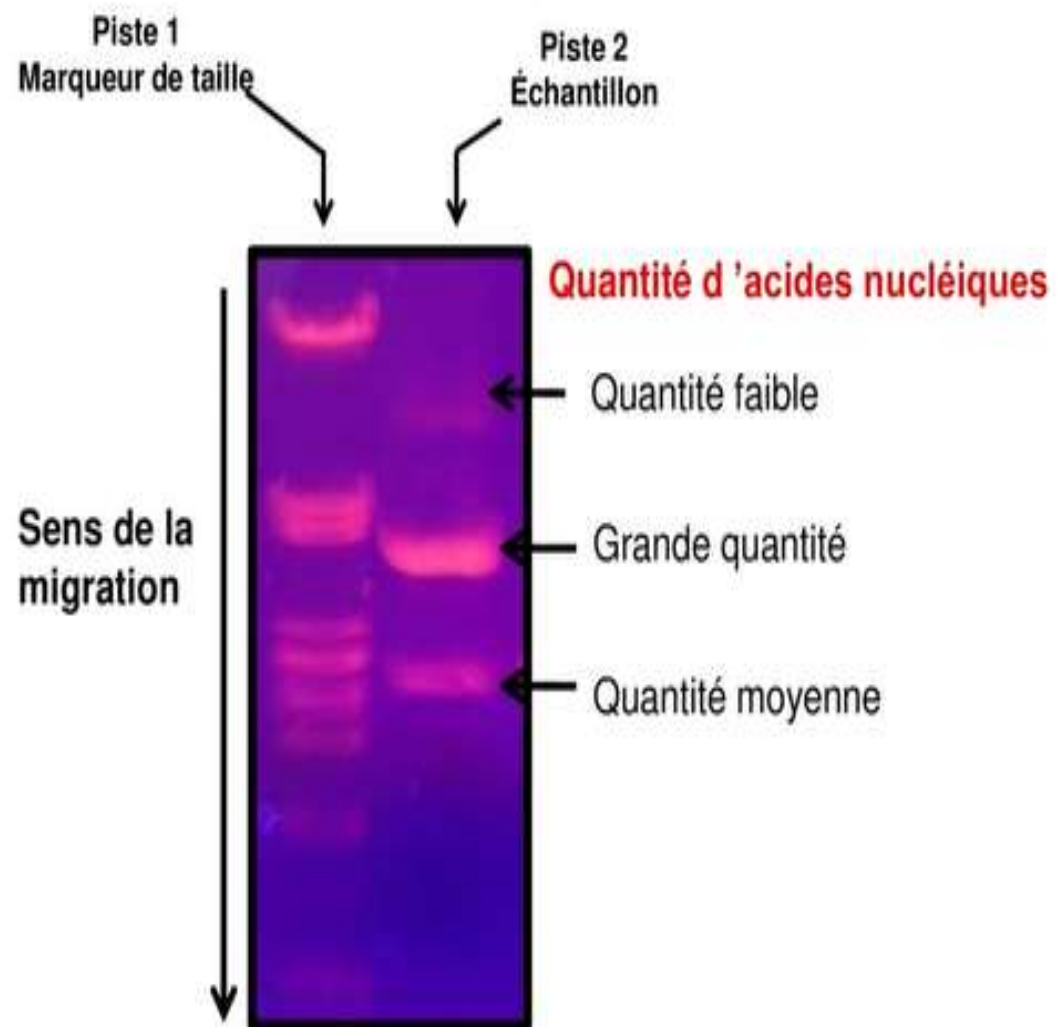
Visualisation et analyse

La visualisation des bandes correspondant aux fragments d'ADN se fait soit sous **lumière UV** soit par **émission de fluorescence** (selon l'agent intercalant utilisé)

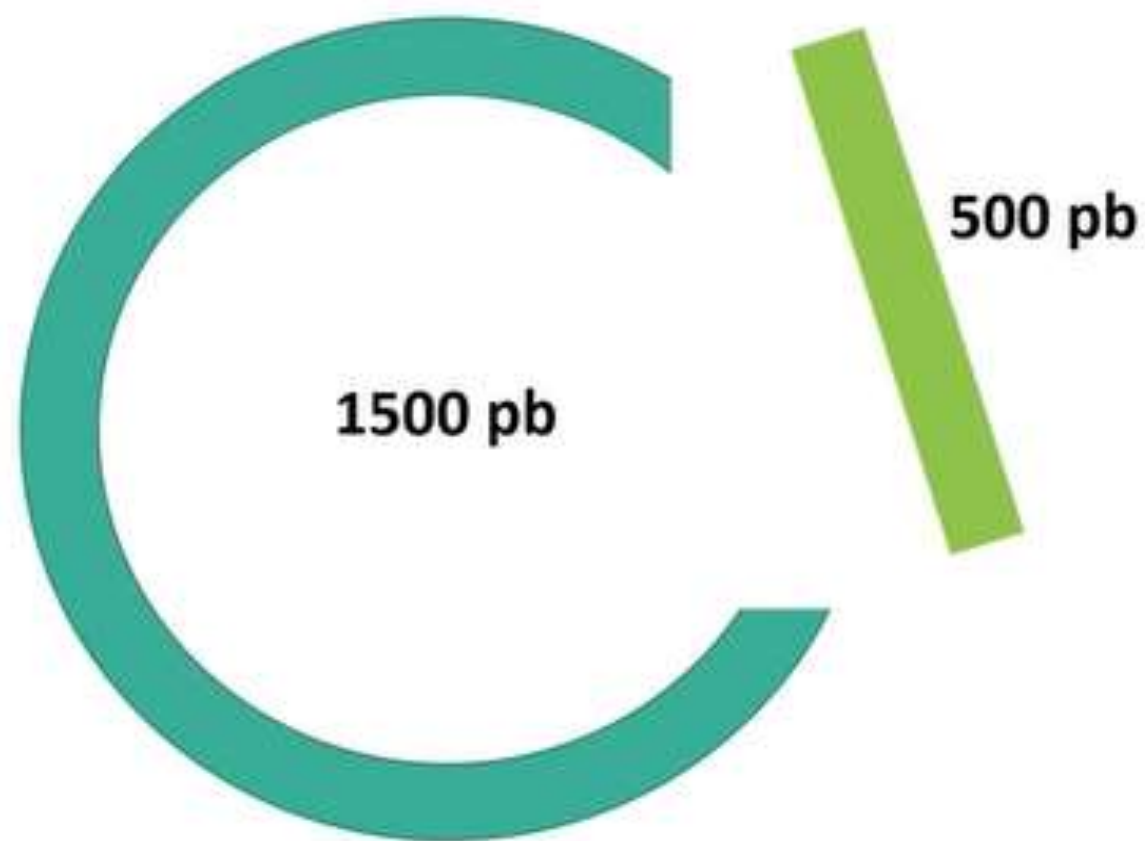
L'intensité des bandes est proportionnelle à la **quantité d'ADN** présent dans l'échantillon.



Par Mnolf — Photo taken in Innsbruck, Austria, CC BY-SA 3.0,
<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1131449>



Comment interpréter les résultats d'un gel d'agarose ?

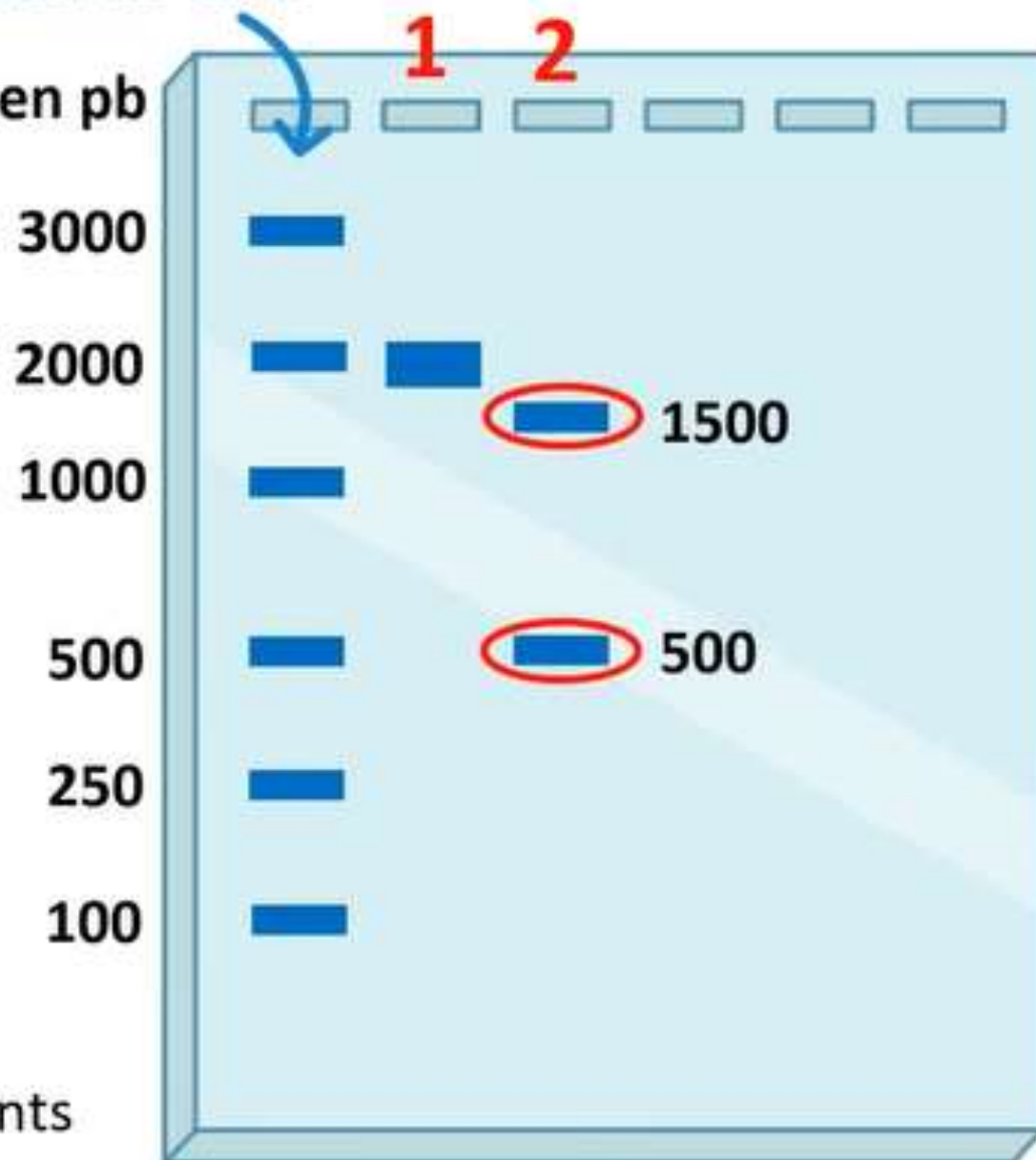


1 : ADN circulaire non digéré

2 : ADN digéré – on s'attend à avoir deux fragments

Marqueur de taille

Taille en pb





Couper la bande d'intérêt pour utilisé le fragment d'acide nucléique correspondant dans d'autres expériences

Révélation du gel par Bromure d'éthidium (BET)



Toxique, mutagène

Un agent intercalant

Fluorescence rouge-orangé sous UV

4µl de BET dans de 40 ml de gel d'agarose