

NOTICE TECHNIQUE



Kit de préparation

de gel d'agarose

Réf. APBG : K06AGA

Conception, réalisation, production :
École de l'ADN - 30015 Nîmes, www.ecole-adn.fr

Édition :
APBG - 69356 Lyon, www.apbg.org

Rédaction janv. 2006, version 106-3

1- PRESENTATION

1-1 Principe

L'analyse des fragments d'ADN en fonction de leur taille est un procédé usuel en biologie moléculaire. Cette méthode repose sur une technique électrophorétique qui peut utiliser différents supports. L'électrophorèse est donc une méthode de séparation de particules chargées électriquement par migration différentielle sous l'action d'un champ électrique. Elle se réalise sur des supports gélatineux, de type acrylamide, agarose ou semi solide de type capillaire. Le gel d'acrylamide ou l'électrophorèse capillaire, méthodes délicates et onéreuses permettent d'analyser des fragments d'ADN de très petites tailles et donnent la possibilité d'une résolution de l'ordre de la paire de base. L'agarose qui est un polysaccharide extrait d'une algue, la *Rhodophyceae*, permet d'analyser de manière très simple des fragments d'ADN plus grands obtenus après hydrolyse par des endonucléases de restriction ou amplifiés par PCR.

Ce kit, propose les réactifs nécessaires à la fabrication d'un gel d'agarose, ainsi qu'à la coloration des fragments d'ADN.

Dans ce kit sont fournis l'agarose, le tampon TBE en poudre et l'Azure A concentré.

1-2 Méthodologie

Il s'agit de réactifs complémentaires destinées aux enseignants, techniciens de laboratoire mais l'utilisation peut être aussi étendue aux élèves.

La réalisation d'un gel d'agarose correspondant réellement à des processus de biotechnologie et concourt à une orientation positive vers des études scientifiques, en particulier dans le domaine des sciences de la vie.

2- PRESENTATION DU KIT

Ce kit présente des réactifs qui permettent de réaliser 1 litre de gel à 1% d'agarose, la solution de TBE pour la migration ainsi que le colorant Azure A concentré.

2-1 Constitution du kit

- 1 flacon de 10 g d'Agarose;
- 1 bouteille de TBE 10 X en poudre à reconstituer avec 200 ml d'eau distillée;
- 5 x 1ml de solution d'Azure A à diluer 100 fois en alcool à 20°.

2-2 Caractéristique et conseils d'utilisation des réactifs

L'agarose est à dissoudre à la concentration souhaitée selon le protocole ci-après. Le TBE doit être reconstitué, la solution d'Azure A est à diluer dans une solution d'éthanol à 20°.

Tous ces réactifs se conservent exclusivement à température ambiante.

Ne pas congeler.

Dans tous les cas se référer aux spécifications de stockage mentionnées sur l'étiquette.

3- PROTOCOLE

3-1 Matériels complémentaires nécessaires au laboratoire:

- Éprouvette, cristallisoir, erlenmeyer;
- Balance;
- plaque chauffante, ou micro-onde ;

3-2 Consommables

- Pas de consommables spécifiques

3-3 Réactifs complémentaires non fournis

- Eau distillée ;
- Ethanol.

3-4 Opérations préalables avant la préparation du gel:

- **Stérilisation du matériel et des réactifs**

Aucune stérilisation ni préparation de matériel spécifique.

- **Préparation des solutions:**

Flacon de TBE 10 X :

Ajouter 200ml d'eau distillée, homogénéiser et laisser stabiliser 30 minutes à température ambiante.

A partir de cette solution réaliser une dilution au 1/20° afin d'obtenir une solution 0,5 X.

Note : le TBE s'utilise aussi bien à la concentration 1X.

Exemple :

Pour obtenir 500 ml de TBE 0,5 X :

l'aide d'une éprouvette mesurer 25 ml de solution TBE 10 X ;

Compléter à 500 ml avec de l'eau distillée ;

Homogénéiser l'ensemble ;

La solution 0,5 X est prête à l'emploi.

Solution d'éthanol à 20° :

Préparer une solution d'éthanol à 20° avec de l'éthanol absolu ou de l'éthanol à 70°.

4- PREPARATION DU GEL D'AGAROSE

4-1 Protocole

Note : les réactifs sont fournis de sorte à réaliser 1 litre de gel à 1%, il est important de se référer à la méthode utilisée pour ajuster la concentration du gel.

Ici l'exemple choisi correspond à une analyse des fragments du Kit Empreintes et diagnostic génétique, DNATOOLS DT-03.

Choix de la concentration du gel en % (c'est un pourcentage massique pour un volume donné).

Dans cette expérience le gel doit être à 0,8 % d'agarose.

Méthode de calcul :

masse à peser (m en gramme), pour un volume (v en ml) :

$$m = v \times \text{pourcentage} / 100$$

Exemple de calcul :

gel à 0,8 % pour un volume de 100 ml

$$100 \times 0,8 / 100 = 0,8 \text{ g à peser}$$

- Peser précisément (+/- 0,1g) sur la balance la masse d'agarose dans un erlenmeyer taré ;

- Préparer une solution de TBE à 0,5 X à partir de la solution fournie;

- Mesurer le volume de TBE 0,5 X dans une éprouvette (+/- une demi-graduation);

- Ajouter le TBE 0,5 X à l'agarose et chauffer (micro-onde ou plaque chauffante) de sorte à dissoudre totalement l'agarose ;

- Verser le gel dans les plaques de moulage.

- Attendre 30 minutes à température ambiante la solidification du gel.

4-2 Coloration et décoloration du gel

Coloration à l'Azure A

Préparation de la solution d'Azure A :

Ajouter 1 ml de solution Azure A fournie pour 100 ml d'éthanol à 20°, homogénéiser et laisser reposer. Vous avez une solution à d'Azure A prête à l'emploi..

Après la migration, sortir le gel et le traiter comme indiqué :

- Plonger le gel pendant 6 min dans la solution d'Azure A préparée.
Récupérer la solution, elle est réutilisable une dizaine de fois.

- Après cette incubation, rincer 1 fois à l'éthanol 70°, ou alcool à brûler, puis rincer abondamment à l'eau du robinet, laisser dans l'eau une vingtaine de minutes sous agitation si possible pour visualiser les résultats.

- Il est possible de conserver au réfrigérateur, les gels une nuit dans de l'eau.

Les réactifs qui constituent ce kit pédagogique ne présentent aucun caractère dangereux, toxique ou pathogène. La fiche de sécurité MSDS est disponible, sur simple demande auprès de l'École de l'ADN.

Dans le cadre d'une manipulation réalisée par les élèves, il est néanmoins important de sensibiliser sur les risques encourus lors des manipulations :

Mesures d'hygiène : se laver les mains avant et après l'expérimentation ;

Se référer aux mesures de sécurité d'utilisation des appareils électriques et matériels ;

Utiliser les précautions d'usage pour toutes manipulations de produits dangereux ou toxiques.

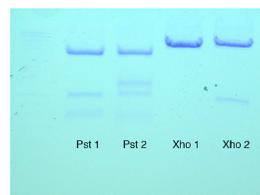
En cas d'ingestion informez le médecin responsable ou contactez le centre antipoison le plus proche.

Précautions spécifiques :

Le port de gants et de la blouse est conseillé.

La fiche de consigne de sécurité MSDS est disponible en ligne sur le site www.ecole-adn.fr/MSDS

5- CONSIGNES DE SECURITE



EXEMPLE DE RESULTATS

Photos de gels après coloration et décoloration :

Réf. : DT-03 diagnostic de pathologie

Contact commande :

APBG - B.P. 8337
69356 Lyon cedex 08
tel 04 78 74 47 22
fax 04 78 01 22 14
apbg@wanadoo.fr
www.apbg.org

**Informations
Renseignements :**

Ecole de l'ADN
19, Grand Rue
BP 81295
F-30015 Nîmes Cedex 1
Tel/fax : +33 (0) 466 67 82 29
E-mail : info@ecole-adn.fr
www.ecole-adn.fr