



NOTICE TECHNIQUE

NEW

Kit de préparation

de gel d'agarose

avec

**GelRed
ou
Midori Green**



Réf. : DT-06 A

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

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

Produit français, fabriqué à Nîmes (Gard) conforme à la réglementation européenne.

Rédaction Janvier 2018, version 08/01-RL

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 s'utiliser sur différents supports. L'électrophorèse est 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 d'une centaine à quelques dizaines de milliers de nucléotides, 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 visualisation des fragments d'ADN sans risque pour les élèves.

Dans ce kit sont fournis l'agarose, le tampon TBE en poudre et l'agent intercalant (**GelRed** ou **Midori Green**) permettant la visualisation des fragments d'ADN.

L'agent intercalant GelRed ou Midori Green :

- Absence de toxicité comparé au BET avec une excellente sensibilité et des résultats instantanés.
- Révèle par fluorescence de très faibles quantités d'ADN dans un gel d'électrophorèse d'agarose.
- Possibilité de l'utiliser comme colorant directement dans le gel ou comme post colorant.
- Gain de temps et précision des résultats, en lumière UV, le résultat est instantané.
- Révélation entre 254 et 312 nm.

1-2 Méthodologie

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

La réalisation d'un gel d'agarose est une application concrète d'un 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 l'intercalant GelRed.

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;
- 50 microlitres de solution **GelRed** ou **Midori Green**.

2-2 Caractéristiques 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 **GelRed** ou **Midori Green** est prête à l'emploi.

Les réactifs se conservent à température ambiante sauf le **GelRed** ou **Midori Green** à 4°C.

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 ;
- Cuve d'électrophorèse ;
- Plaque de moulage pour gel.

3-2 Consommables :

- Pas de consommables spécifiques

3-3 Réactifs complémentaires non fournis

- Eau distillée ;

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.
À partir de cette solution réaliser une dilution au 1/10^e afin d'obtenir une solution 1 X.

- Exemple :
Pour obtenir 500 ml de TBE 1 X :
À l'aide d'une éprouvette mesurer 50 ml de solution TBE 10 X ;
Compléter à 500 ml avec de l'eau distillée ;
Homogénéiser l'ensemble ;
La solution 1 X est prête à l'emploi.

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 Phylogénie moléculaire , DNATools DT-09.

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

Dans cette expérience le gel doit être à 1 % d'agarose.

Méthode de calcul :
masse à peser (m en gramme), pour un volume (v en ml) :
m = v x pourcentage / 100

Exemple de calcul :
gel à 1 % pour un volume de 100 ml
100 x 1 / 100 = 1 g à peser ce qui correspond à deux pastilles dans le cas où l'agarose est sous forme de pastille de 0,5g.

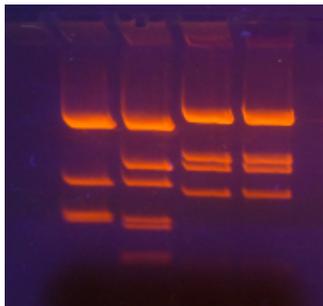
- Peser précisément (+/- 0,1g) sur la balance la masse d'agarose dans un erlenmeyer taré ; **ce qui correspond à deux pastilles dans le cas où l'agarose est sous forme de pastille de 0,5g.**
- Préparer une solution de TBE à 1 X à partir de la solution fournie;
- Mesurer le volume de TBE 1 X dans une éprouvette (+/- une demi-graduation);
- Ajouter le TBE 1 X à l'agarose et **laisser reposer pendant 10 minutes** ;
- Chauffer (micro-onde ou plaque chauffante) de sorte à dissoudre totalement l'agarose ;
- Laisser refroidir 2 à 3 minutes
- Rajouter 4 microlitres de **GelRed** ou **Midori Green**.
- Verser le gel dans les plaques de moulage.
- Attendre environ 30 minutes à température ambiante la solidification du gel.

4-2 Visualisation du résultat à partir du gel

- Une fois la migration finie, déposer le gel sur ou sous la table UV.

EXEMPLE DE RESULTATS :

Photos de gels avec interclant GelRed



5- CONSIGNES DE SECURITE

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 les 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.

Contact commande

APBG - B.P. 8337
69356 Lyon cedex 08
tel 04 78 74 47 22
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 : patrice@ecole-adn.fr
www.ecole-adn.fr

DNATOOLS est une marque
déposée par l'école de l'ADN