

## Kit électrophorèse de l'ADN n°3

Réf. ELECDSCSG

### 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 AP à **- 20°C** ⚠
  - ⚠ Placer le tube de SafeGreen à **+ 4°C** ⚠
  - ⚠ Placer le reste à **température ambiante** ⚠

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

- ☑ **Avant toute manipulation, étudier la fiche sécurité**

### COMPOSITION (pour 4 gels de 8 puits) :

- 1 **sachet noté AP** à stocker à **- 20°C** contenant :
    - 1 microtube à bouchon naturel de 106 µL d'une solution d'ADN de phage lambda : **- 20°C**
    - 1 microtube à bouchon jaune de 8 µL d'enzyme de restriction XhoI à action rapide : **- 20°C**
    - 1 microtube à bouchon vert de 8 µL d'enzyme de restriction EcoRI à action rapide : **- 20°C**
    - 1 microtube à bouchon bleu de 8 µL d'enzyme de restriction HindIII à action rapide : **- 20°C**
    - 1 microtube à bouchon rose de 30 µL de tampon pour enzyme de restriction : **- 20°C**
    - 1 microtube à bouchon marron de 60 µL de SafeGreen : **+ 4°C**
  - 1 sachet contenant 4 g d'agarose : température ambiante
  - 1 tube d'eau stérile de 10 ml : 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 :

- Flacons 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 préhension
- Micro-onde ou bain-marie
- Ethanol absolu
- Papier aluminium
- Micropipette 5 à 50 microlitres et cônes adaptés
- Glace ou réfrigérant à microtube
- 2 Bains-marie thermostatés (37°C et 80°C) et thermomètres pour vérifier la température
- Pince en bois
- Chronomètre
- Portoir flottant pour microtubes (3 places nécessaires)

### MATERIEL CONSEILLE :

- Portoir à microtubes

## **OBJECTIFS COGNITIFS**

Le but de ce TP est de comprendre le principe de la digestion enzymatique de l'ADN et de la localisation des sites de coupure.

Ce kit peut aussi compléter le kit « Electrophorèse de l'ADN n°2, carte de restriction et dépistage ».

### **Informations pour organiser au mieux le TP :**

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

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

## **RAPPELS**

### **PRINCIPE DE LA DIGESTION DE L'ADN PAR ENZYME DE RESTRICTION :**

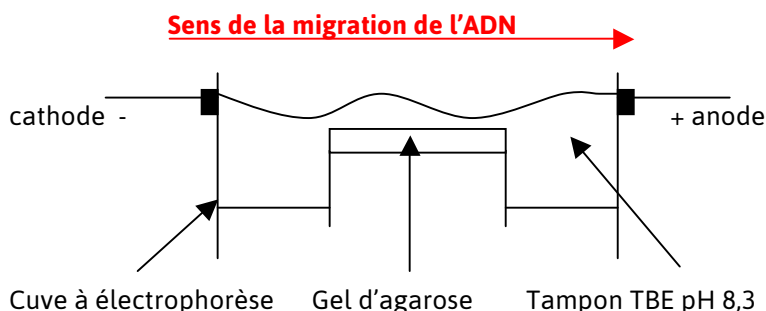
Une enzyme de restriction est une protéine active de type endonucléase qui peut couper les liaisons phosphodiester d'un fragment d'ADN au niveau d'une séquence de nucléotides précises correspondant au site de restriction propre à l'enzyme.

Ces enzymes sont produites par les cellules comme mode de défense contre des ADN étrangers (ADN de virus...) qui pourraient pénétrer la cellule. Elles sont utilisées en biologie moléculaire pour analyser des fragments d'ADN (réalisation de carte de restriction et séquençage) et pour réaliser des Organismes Génétiquement Modifiés (OGM).

### **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 $\lambda$

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 trois enzymes de restriction EcoRI, HindIII et XhoI. 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 XhoI sur l'ADN de ce bactériophage.

### SITES DE COUPURES DES ENZYMES DE RESTRICTION UTILISEES :

Site de coupure pour l'enzyme de restriction :		
EcoRI	HindIII	XhoI
$\begin{array}{c} 5'-G \downarrow A-A-T-T-C-3' \\ 3'-C-T-T-A-A \uparrow G-5' \end{array}$	$\begin{array}{c} 5'-A \downarrow A-G-C-T-T-3' \\ 3'-T-T-C-G-A \uparrow A-5' \end{array}$	$\begin{array}{c} 5'-C \downarrow T-C-G-A-G-3' \\ 3'-G-A-G-C-T \uparrow C-5' \end{array}$

Numéros du nucléotide de coupure sur l'ADN de phage lambda		
Par EcoRI	Par HindIII	Par XhoI
EcoRI coupe l'ADN 5 fois : 21226, 26104, 31747, 39168, 44972	HindIII coupe l'ADN 6 fois 23130, 25157, 27479, 36895, 37459, 37584, 44141	XhoI coupe l'ADN 1 fois 33 498

### PREPARATION

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

(Opération réalisable à l'avance : gel pouvant être conservé quelques semaines 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-chaleur 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

**MANIPULATION :**

Le nombre de dépôt réalisables est de 16, chacun des 4 groupes dépose dans 4 puits.

**PREPARATION COMMUNE DE LA DIGESTION D'ADN DE PHAGE LAMBDA :**

Une préparation est à réaliser pour toute la classe. Il y a 4 tubes à préparer. Chacun des 4 groupes peut donc s'occuper de préparer 1 tube.

👁️👁️ **ATTENTION** 👁️👁️ : Manipuler les microtubes en les laissant le plus possible dans la glace ou dans le dispositif réfrigérant utilisé.

- Prélever à la micropipette 24 µL d'ADN de phage lambda (dans le microtube à bouchon naturel) et déposer cet ADN délicatement dans un microtube propre.
- Noter ce microtube « ADN » au feutre permanent
- Ajouter 26 µL d'eau stérile (dans le tube à bouchon rouge noté eau stérile)
  
- Prélever à la micropipette 24 µL d'ADN de phage lambda (dans le microtube à bouchon naturel) et déposer cet ADN délicatement dans le microtube à bouchon vert contenant l'enzyme EcoRI.
- Noter ce microtube « E » au feutre permanent
- Ajouter 13 µL d'eau stérile (dans le tube à bouchon rouge noté eau stérile)
- Ajouter 5 µL de tampon pour enzyme de restriction (dans le microtube à bouchon rose)
- Prélever à la micropipette 24 µL d'ADN de phage lambda (dans le microtube à bouchon naturel) et déposer cet ADN délicatement dans le microtube à bouchon bleu contenant l'enzyme HindIII.
- Noter ce microtube « H » au feutre permanent
- Ajouter 13 µL d'eau stérile (dans le tube à bouchon rouge noté eau stérile)
- Ajouter 5 µL de tampon pour enzyme de restriction (dans le microtube à bouchon rose)
- Prélever à la micropipette 24 µL d'ADN de phage lambda (dans le microtube à bouchon naturel) et déposer cet ADN délicatement dans le microtube à bouchon jaune contenant l'enzyme XhoI.
- Noter ce microtube « X » au feutre permanent
- Ajouter 13 µL d'eau stérile (dans le tube à bouchon rouge noté eau stérile)
- Ajouter 5 µL de tampon pour enzyme de restriction (dans le microtube à bouchon rose)

## **REALISATION COMMUNE DE LA DIGESTION DE L'ADN DE PHAGE LAMBDA :**

Une digestion enzymatique est réalisée pour toute la classe.

- Bien agiter les 4 microtubes notés « ADN », « E », « H » et « X »
- Placer ces 4 microtubes dans le bain-marie thermostaté réglé sur 37°C (vérifier que la température est bien à 37°C avec un thermomètre)
- Déclencher le chronomètre
- Au bout de 5 minutes, régler le bain-marie sur 80°C ou bien mettre les 4 tubes dans un autre bain-marie thermostaté (vérifier la température de 80°C avec un thermomètre)
- Déclencher le chronomètre
- Au bout de 5 minutes, sortir les tubes du bain-marie (utiliser une pince pour ne pas se brûler)

## **PREPARATION COMMUNE DES SOLUTIONS A DEPOSER DANS LES PUIITS :**

**Solutions de digestion :** Une préparation est à réaliser pour toute la classe. Il y a 4 tubes à préparer. Chacun des 4 groupes peut donc s'occuper de préparer 1 tube.

- Prélever 15 µL de SafeGreen (microtube à bouchon marron) à la micropipette et les ajouter dans le microtube noté « ADN ».
- Faire de même pour les tubes notés « X », « E » et « H ».

## **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 4 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).
- Déposer une série de 4 échantillons d'ADN différents par gel.
- 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.

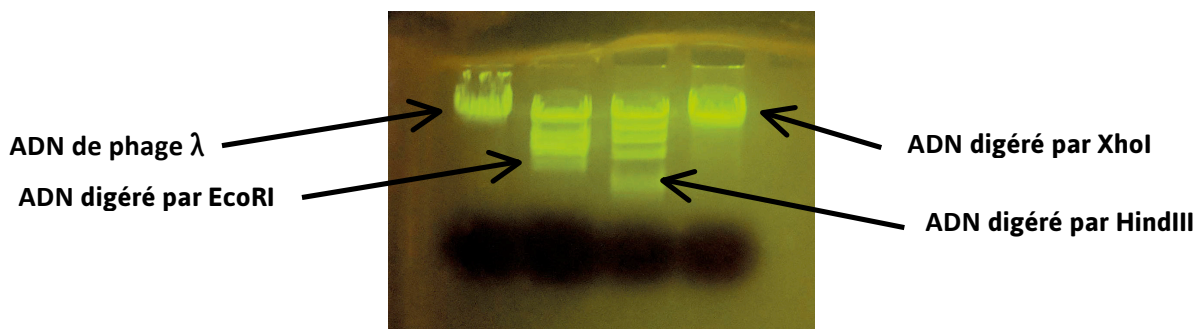
☐**NB**☐ : le temps de migration dépend de plusieurs paramètres : plus le gel est épais, plus le temps de migration est important et plus il y a de tampon de migration au dessus du gel, plus la durée de la migration augmente)

## **RESULTATS ATTENDUS ET INTERPRETATION**

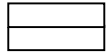
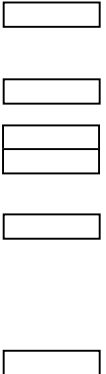
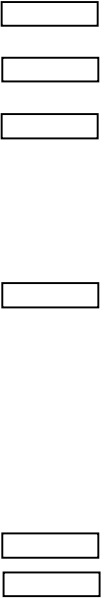
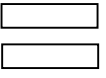
L'électrophorèse permet d'acquérir des connaissances de bases sur la technique du southern blot et l'action des enzymes de restriction.

Les groupes d'élèves peuvent établir une carte de restriction de l'ADN de 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)



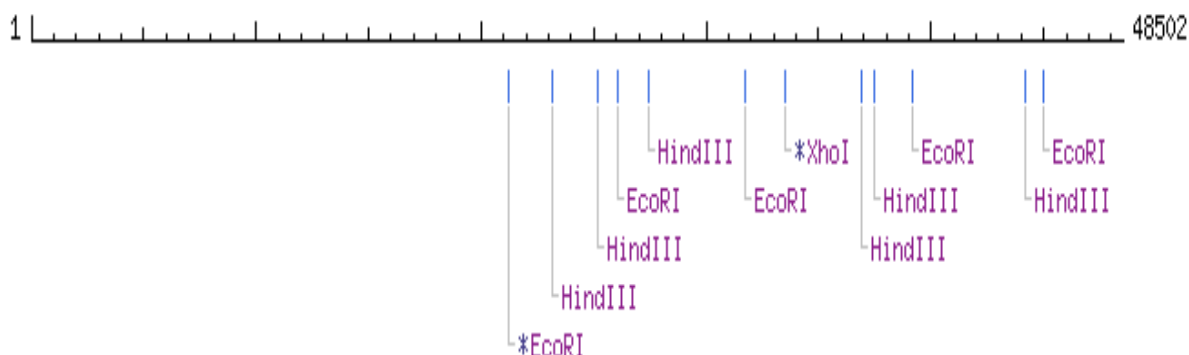
Bandes obtenues sur les gels d'électrophorèse de l'ADN du phage  $\lambda$  :

 <p><b>48 502</b></p>	 <p><b>21 226</b></p> <p><b>7 421</b></p> <p><b>5 804</b></p> <p><b>5 643</b></p> <p><b>4 878</b></p> <p><b>3 530</b></p>	 <p><b>23130</b></p> <p><b>9416</b></p> <p><b>6682</b></p> <p><b>4361</b></p> <p><b>2322</b></p> <p><b>2027</b></p>	 <p><b>33498</b></p> <p><b>15004</b></p>
<b>ADN de phage <math>\lambda</math></b>	<b>Digéré par EcoRI</b>	<b>Digéré par HindIII</b>	<b>Digéré par XhoI</b>

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 48502 paires de bases
- Puit numéro 2 :  
On observe 6 fragments dus aux 5 coupures de EcoRI sur l'ADN de phage lambda.  
Taille des fragments obtenus : 21226 ; 7421 ; 5804 ; 5643 ; 4878 et 3530
- Puit numéro 3 :  
On observe 7 fragments dus aux 6 coupures de HindIII sur l'ADN de phage lambda.  
Taille des fragments obtenus : 23130 ; 9416 ; 6557 ; 4361 ; 2322 ; 2027 ; (564 et 125 : fragments invisibles sur le gel)
- Puit numéro 4 :  
On observe 2 fragments dus à la coupure de XhoI sur l'ADN de phage lambda.  
Taille des fragments obtenus : 33498 et 15004

Carte de restriction de l'ADN de phage lambda :



### Pour aller plus loin :

- Ce kit complète le kit d'électrophorèse de l'ADN, carte de restriction et dépistage génétique. En effet, lors de ce kit, vous pouvez émettre l'hypothèse que la mutation ponctuelle portée par un ADN de phage lambda touche le site de restriction XhoI qui est modifié en un site HindIII. Ce présent kit permet de confirmer l'hypothèse émise à savoir qu'il s'agit bien du site de restriction XhoI qui est modifié en HindIII.
- Il est aussi possible d'aborder la nécessité d'avoir des échelles de poids moléculaires ou des schémas de gel d'électrophorèse pour pouvoir déterminer la taille des fragments

### **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

Le colorant Safe-Green™, doit être ajouté à vos échantillons seulement.

Le colorant s'utilise à raison de 1µL pour 5µL d'ADN.

Mélanger les échantillons et le marqueur d'ADN avec le colorant Safe-Green™ à un taux de dilution de 1: 5 (colorant : échantillon).

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](http://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](http://www.sordalab.com)