



THE BIOTECHNOLOGY
EDUCATION COMPANY®

Edvo-Kit n°

101

Edvo-Kit n° 101

Principes et pratique de l'électrophorèse sur gel d'agarose

Objectif expérimental:

L'objectif de cette expérience est de développer une compréhension de base de la théorie de l'électrophorèse et d'acquérir une familiarité pratique avec les processus de séparation de diverses molécules par électrophorèse horizontale sur gel.

Consulter les instructions de stockage page 3.

Table des Matières

	Page
Matériel expérimental	3
Fournitures supplémentaires	3
Contexte	4
Présentation de l'expérience	
Dispositif expérimental	5
L'électrophorèse sur gel d'agarose	7
Questions d'étude	9
Guide de l'enseignant	10
Préparatifs	11
Résultats et analyse de l'expérience	12
Questions d'étude et réponses	13
Appendices	14
A Guide de dépannage	15
B Préparation de lots de gel d'agarose	16

Des fiches de données de sécurité sont disponibles sur notre site internet : **www.edvotek.com**

EDVOTEK et The Biotechnology Education Company sont des marques déposées appartenant à EDVOTEK, Inc. Ready-to-Load, QuickStrip, DuraGel, et UltraSpec-Agarose sont des marques déposées appartenant à EDVOTEK, Inc.



1.800.EDVOTEK • Fax 202.370.1501 • info@edvotek.com • www.edvotek.com

La reproduction, même partielle, de ce document n'est autorisée qu'à des fins éducatives sans but lucratif.
Copyright © 1989-2015 EDVOTEK, Inc., Tous droits réservés. 101fr.150716

Matériel expérimental

ÉCHANTILLONS D'ÉLECTROPHORÈSE READY-TO-LOAD™

Stocker les échantillons QuickStrip™ dans un réfrigérateur immédiatement après réception. Tout autre composant peut être conservé à température ambiante.

Composants (format QuickStrip™)

- | | | |
|---|--|--------------------------|
| A | Orange | ☐ |
| B | Violet | ☐ |
| C | Rouge | ☐ |
| D | Bleu 1 | ☐ |
| E | Mélange de colorant | ☐ |
| F | Mélange de colorant bleu (Bleu 1 + Bleu 2) | ☐ |

Liste de contrôle (✓)

L'expérience n°101 est conçue pour 8 gels.

Stocker les échantillons QuickStrip™ dans un réfrigérateur immédiatement après réception. Tout autre composant peut être conservé à température ambiante.

REACTIFS ET FOURNITURES

- | | |
|--|--------------------------|
| • UltraSpec-Agarose™ | ☐ |
| • Tampon d'électrophorèse (50x) | ☐ |
| • Solution d'essai de charge de colorant | ☐ |
| • Pipette de 1 ml | ☐ |
| • Micropipettes de transfert | ☐ |

Fournitures supplémentaires

- Appareil d'électrophorèse horizontale
- Source de courant continu
- Micropipettes automatiques avec pointes
- Balance
- Microondes, plaque chauffante ou brûleur
- Pro-pipette
- Fioles ou vases à bec de 250 ml
- Gants anti-chaaleur
- Lunettes de protection et gants de laboratoire jetables
- Système de visualisation (lumière blanche)
- Eau distillée ou déionisée

Les composants du kit sont exclusivement d'usage éducatif. Ils ne doivent en aucun cas être utilisés pour rendre des diagnostics ou à des effets médicaux, et ne doivent pas être consommés par des personnes, ni par des animaux.

Contexte

L'électrophorèse sur gel d'agarose est communément utilisée pour séparer des molécules en fonction de leur charge, leur taille et leur forme. Il s'agit d'un moyen de séparation particulièrement efficace pour des biomolécules chargées telles que l'ADN, l'ARN et les protéines.

Bien que l'électrophorèse sur gel d'agarose soit une technique simple et aisée, elle possède un pouvoir de séparation efficace. Le gel est fabriqué à travers la dissolution de poudre d'agarose dans de la solution tampon bouillante. La solution est ensuite refroidie jusqu'à 60° C, puis versée dans un plateau de support, où elle se solidifie. Le support est alors submergé dans un appareil d'électrophorèse à électrodes contenant de la solution tampon.

Afin de les préparer pour l'électrophorèse, les échantillons sont mélangés avec des composants qui leur donnent plus de densité, tels le glycérol ou le sucre. Ces derniers rendent les échantillons plus denses que le tampon d'électrophorèse. Les échantillons peuvent alors être déposés à l'aide d'une micropipette ou d'une pipette de transfert dans des encoches créées dans le gel à partir d'un gabarit lors du coulage. Grâce à leur densité, les échantillons sont submergés dans la solution tampon et demeurent dans les puits.

L'appareil d'électrophorèse est branché à une source de courant continu direct et mis sous tension. Les molécules chargées contenues dans les échantillons pénètrent alors le gel à travers des capillaires. Les molécules dont la charge nette est négative migrent vers l'électrode positive de l'appareil d'électrophorèse (anode), alors que les molécules dont la charge nette est positive migrent vers l'électrode négative (cathode). Dans une certaine fourchette, plus le champ électrique est fort, plus les molécules migrent rapidement. Le tampon sert à la fois de conducteur à l'électricité et de contrôle du pH. En effet, le pH influence la charge et la stabilité des molécules biologiques.

L'agarose est un polysaccharide dérivé de l'agar. Dans cette expérience, on se sert d'Ultra-Spec Agarose™. Ce composant est constitué d'un mélange d'agarose et d'hydrocolloïdes qui rend le gel transparent et résistant. Le gel contient des capillaires microscopiques qui agissent en tant que "tamis" moléculaires. Les propriétés du gel conditionnent la vitesse de migration des molécules : les petites molécules migrent plus rapidement que les grandes. De plus, des molécules de même masse et charge peuvent présenter des formes différentes : celles de forme plus compacte (les formes arrondies sont plus compactes que les formes allongées) migrent plus rapidement.

Des facteurs tels que la charge, la taille et la forme des molécules, ainsi que les conditions de tamponnage, la concentration du gel et la tension électrique, ont un impact sur la mobilité des molécules dans le gel. Parmi des molécules de masse et de forme moléculaire semblable, les plus chargées migreront plus vite. Par ailleurs, différentes molécules interagissent à des degrés variables avec l'agarose. Moins l'interaction est aisée, plus la migration des molécules est ralentie.

Dans cette expérience, nous soumettrons divers échantillons à l'électrophorèse sur gel d'agarose et nous observerons la vitesse et la direction de leur migration. Les colorants A, B, C et D sont tous trois négativement chargés et ont des pH neutres. Cependant, ces molécules diffèrent par leur structure, leur composition chimique et leur charge. Le colorant F a une charge nette positive et migrera donc dans la direction opposée que celle des autres colorants. De plus, une combinaison de colorants sera déposée dans un même puits lors de cette expérience. Ceci démontrera le pouvoir de séparation de mélanges complexes de colorants en composants individuels de l'électrophorèse sur gel d'agarose.

Présentation de l'expérience

OBJECTIF EXPÉRIMENTAL

L'objectif de cette expérience est de développer une compréhension de base de la théorie de l'électrophorèse et d'acquérir une familiarité pratique avec les processus de séparation de diverses molécules par électrophorèse horizontale sur gel.

SÉCURITÉ EN LABORATOIRE

1. L'utilisation courante de gants et lunettes de protection est une bonne pratique de laboratoire.
2. Soyez prudent avec l'utilisation d'appareils pour chauffer ou fondre des réactifs.
3. NE PIPETTES PAS DE REACTIFS A LA BOUCHE - UTILISEZ LES PRO-PIPETTES.
4. Soyez prudent en vous servant d'équipement électrique dans le laboratoire.
5. Lavez-vous toujours soigneusement les mains avec du savon et de l'eau après avoir touché des réactifs ou des matériaux biologiques en laboratoire.



CAHIERS DE LABORATOIRE

Les scientifiques documentent tout ce qui se passe pendant une expérience: les conditions expérimentales, leurs idées, leurs observations et, bien sûr, toutes les données découlant de l'expérience. Aujourd'hui, vous prendrez des notes sur votre expérience dans un cahier de laboratoire ou sur une fiche en papier.

Avant de commencer l'expérience:

- Lisez attentivement l'introduction et le protocole. Utilisez cette information pour former une hypothèse expérimentale.
- Prévoyez les résultats de l'expérience.

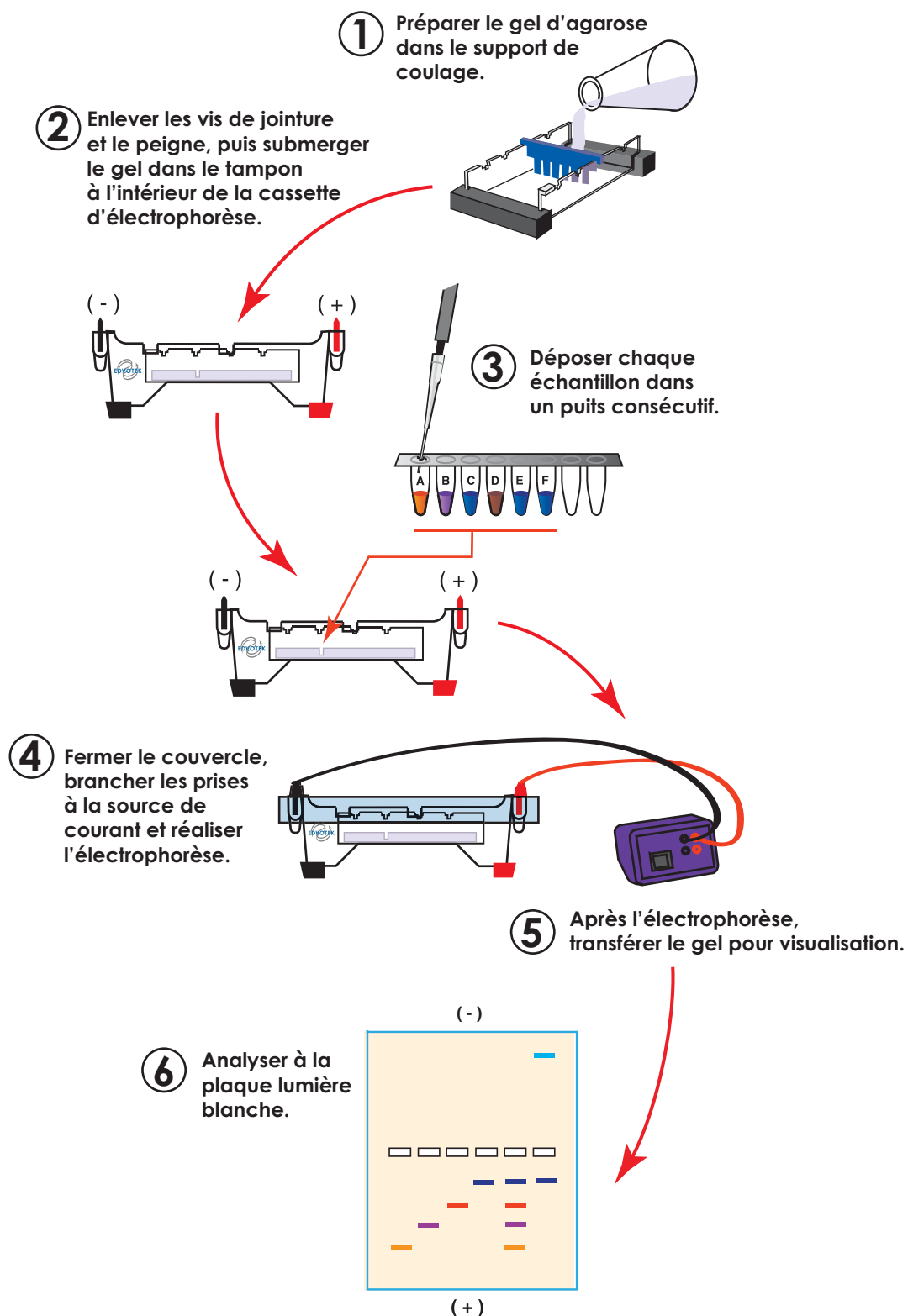
Au cours de l'expérience:

- Notez vos observations.

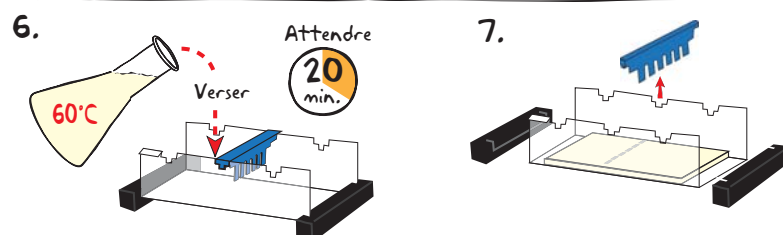
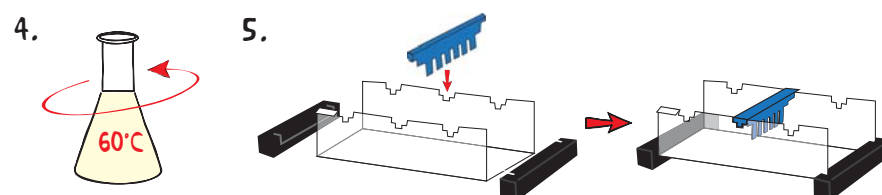
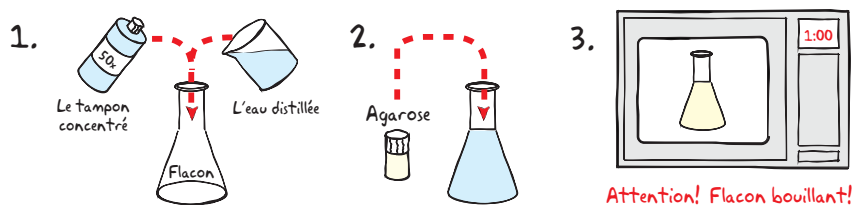
Après l'expérience:

- Interprétez les résultats – ceux-ci confirment-ils ou infirment-ils votre hypothèse ?
- Si vous deviez refaire l'expérience, que changeriez-vous ? Révisez votre hypothèse en prenant compte de ce changement.

Dispositif expérimental



L'électrophorèse sur gel d'agarose



IMPORTANT:

Cette expérience requiert du gel de 7x10 ou 7x14 cm. Placer le gabarit (peigne) dans la fente du milieu.

Dans le cas où vos connaissances sur la préparation du gel d'agarose et la réalisation de l'électrophorèse seraient limitées, vous pourrez consulter des instructions détaillées et des ressources utiles sur www.edvotek.com



Portez des gants et des lunettes de protection.

- DILUER** le tampon concentré (50x) avec de l'eau distillée afin d'obtenir du tampon 1x (voir Tableau A).
- MELANGER** la poudre d'agarose avec le tampon 1x dans une fiole de 250 ml (voir Tableau A).
- DISSOUDRE** la poudre d'agarose en faisant bouillir la solution. **CHAUFFER** la solution dans le microondes à haute température pendant 1 minute. **RETIRER** soigneusement la fiole du microondes et **MELANGER** la solution en faisant tourner la fiole. Continuer à **CHAUFFER** la solution par périodes de 15 minutes jusqu'à ce que l'agarose soit complètement dissolue (la solution doit être claire, comme de l'eau).
- Laisser **REFROIDIR** l'agarose jusqu'à 60°C en tournoyant délicatement la fiole afin de permettre une dissipation régulière de la chaleur.
- Pendant que l'agarose refroidit, **FERMER** le support de coulage à l'aide des vis de jointure caoutchoutées. **PLACER** le gabarit (peigne) dans la fente centrale.
- VERSER** la solution d'agarose refroidie dans le support de coulage. Le gel devrait se solidifier au bout d'une vingtaine de minutes maximum. Le gel se raffermira et deviendra moins transparent en se solidifiant.
- ENLEVER** les vis de jointure et le peigne. En enlevant le peigne, prendre soin d'éviter d'endommager les puits.

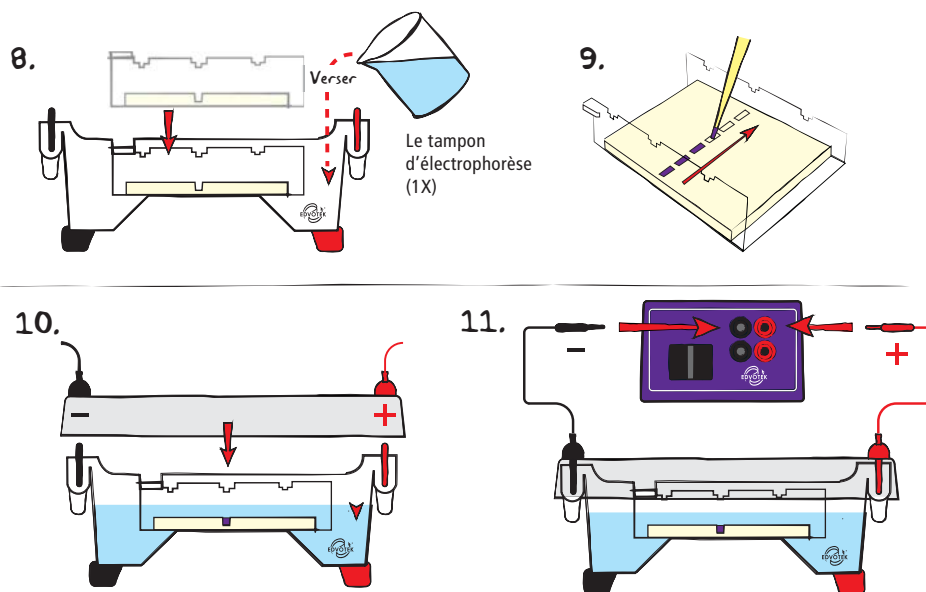
Tableau
A

Gel Individuel UltraSpec-Agarose™ à 0,8%

Taille du support du gel	Tampon concentré (50x)	+ Eau distillée	+ Quantité d'agarose	=	Volume Total
7 x 7 cm	0.6 ml	29.4 ml	0.23 g		30 ml
7 x 10 cm	1.0 ml	49.0 ml	0.39 g		50 ml
7 x 14 cm	1.2 ml	58.8 ml	0.46 g		60 ml

continue

L'électrophorèse sur gel d'agarose, continue



Rappel :

Avant de déposer les échantillons, veillez à ce que le gel soit correctement orienté dans la cuvette de l'appareil..



Portez des gants et des lunettes de protection.

8. **PLACER** le gel (le support) dans la cassette d'électrophorèse. **COUVRIR** le gel avec le tampon d'électrophorèse 1x (voir Tableau B contenant les volumes recommandés). Le gel doit être submergé dans son intégrité.
9. **PERCER** le paquet enveloppant le QuickStrip™ avec la pointe d'une pipette. **DEPOSER** les échantillons (35-38 µL) dans les puits dans l'ordre indiqué dans le Tableau 1.
10. **FERMER** le couvercle de sécurité. **VERIFIER** que le gel soit placé dans la direction correcte.
11. **BRANCHER** les prises à la source de courant et **REALISER** l'électrophorèse (voir Tableau C contenant les durées et les tensions).
12. Une fois que l'électrophorèse a été complétée, **RETIRER** le gel et le support de coulage de la cassette d'électrophorèse et **VISUALISER** le gel d'agarose.

NOTE: Les colorants n'ont pas besoin d'être teints. Analyser et documenter les résultats immédiatement à la suite d'avoir réalisé l'électrophorèse. Les colorants se diffuseront et finalement disparaîtront du gel.

Tableau 1: Chargement du gel

Puits 1	Tube A	Orange
Puits 2	Tube B	Violet
Puits 3	Tube C	Rouge
Puits 4	Tube D	Bleu 1
Puits 5	Tube E	Mélange de colorant
Puits 6	Tube F	Mélange de colorant bleu (1 + 2)

Tableau

B

Tampon d'électrophorèse 1x (tampon de cuvette)

Taille du support du gel	Volume total requis	Dilution	
		Tampon concentré 50x	Eau distillée
M6+	300 ml	6 ml	294 ml
M12	400 ml	8 ml	392 ml
M36	1000 ml	20 ml	980 ml

Tableau

C

Durées et tensions (gel d'agarose à 0,8%)

Volts	Type d'électrophorèse	
	M6+	M12 et M36
	Min. / Max.	Min. / Max.
150	15/20 min.	25 / 35 min.
125	20/30 min.	35 / 45 min.
75	35 / 45 min.	60 / 90 min.

Questions d'étude

1. En fonction de quels paramètres l'électrophorèse sur gel d'agarose sépare-t-elle les molécules ?
2. Expliquez la migration en fonction des charges.
3. Quelle conclusion pouvons-nous tirer des résultats de l'échantillon F ?
4. Pourquoi ajoutons-nous du glycérol aux solutions d'échantillon avant de les déposer dans les puits ?
5. Que se passerait-il si l'on mettait du tampon au lieu d'eau distillée dans la solution de la cuvette ou dans celle du gel ?

Guide de l'enseignant

APERÇU DES PRÉPARATIFS À RÉALISER PAR L'ENSEIGNANT AVANT L'EXPÉRIENCE:

Cette section explique les préparatifs de laboratoire recommandés et leur durée approximative.

Ce qu'il faut faire :	Quand :	Durée :
Préparer les QuickStrips™	Jusqu'à une journée avant la réalisation de l'expérience.	40 min.
Préparer le tampon TAE dilué		
Préparer le mélange d'agarose et verser le gel		

Préparatifs préalables

ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE

Cette expérience requiert un gel d'agarose à 0,8% par groupe d'élèves. Afin d'obtenir de meilleurs résultats, nous recommandons l'utilisation de 7x14 cm de gel et le placement du gabarit (peigne) dans la fente du milieu. Vous pouvez choisir de préparer les gels en avance ou de permettre aux élèves de les préparer eux-mêmes. Cette étape prendra 30 à 40 minutes.

Préparation individuelle de gel :

Chaque groupe d'élèves peut verser son propre gel avant de réaliser l'expérience. Voir la description du dispositif expérimental. Les élèves auront besoin de tampon concentré 50X, d'eau distillée et de poudre d'agarose.

Préparation de lots de gel :

Afin de gagner du temps, une quantité plus importante de solution d'agarose peut être préparée à l'avance et distribuée plus tard en classe. Voir Appendice B.

Préparation de gels en avance :

Les gels peuvent être préparés à l'avance et conservés pour une utilisation postérieure. Les gels solidifiés peuvent être stockés sous tampon dans le réfrigérateur pendant un maximum de deux semaines.

Ne pas permettre aux gels de geler à - 20°C car cela les détruirait.

Les gels qui ont été retirés des plateaux de support pour stockage doivent être refixés aux supports à l'aide de quelques gouttes d'agarose fondue. Ceci les empêchera de glisser dans les plateaux et les cuvettes.

FORMAT D'ECHANTILLONS : LA PREPARATION DES QUICKSTRIPS™

Les tubes de QuickStrip™ comprennent un ensemble de microtitrage recouvert d'un emballage de protection. Chaque puits contient des échantillons de colorant pré-aliquotés.

En vous servant de ciseaux, divisez soigneusement l'ensemble de tubes en bandes individuelles en découpant chaque file (consultez le schéma ci-contre). Veillez à ne pas abîmer la pellicule de protection en séparant les échantillons.

Chaque groupe recevra un ensemble de tubes. Rappelez aux élèves de tapoter légèrement les tubes avant de charger le gel afin de recueillir l'échantillon dans la partie inférieure du tube.

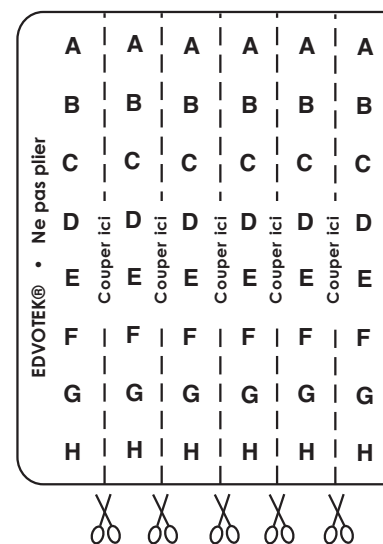
NOTE:

La précision du pipetage est indispensable pour maximiser le succès de l'expérience. Les expériences de la Série 100 d'EDVOTEK sont prévues pour des élèves qui ont déjà appris des techniques de micropipetage et d'électrophorèse sur gel d'agarose.

Si les élèves ne savent pas utiliser les micropipettes, nous suggérons de réaliser Cat. n° S-44, Bases du Micropipetage ou Cat. n° S-43, DNA DuraGel™ avant de tenter cette expérience de niveau plus avancé.

POUR L'ELECTROPHORESE Chaque groupe d'élèves doit avoir :

- Du tampon concentré 50x
- De l'eau distillée
- L'UltraSpec-Agarose™
- Les échantillons QuickStrip™



Découper soigneusement chaque file de tubes.

Résultats et analyse de l'expérience

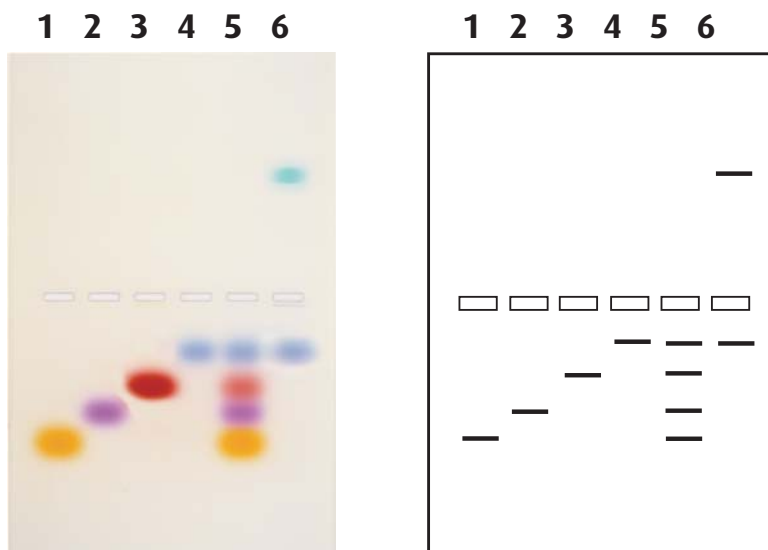


Tableau de résultats	
Puits 1	Orange
Puits 2	Violet
Puits 3	Rouge
Puits 4	Bleu 1
Puits 5	Mélange de colorant
Puits 6	Mélange de colorant bleu (1 + 2)

Dans le schéma ci-dessus, les positions relatives des colorants sont respectées mais ne sont pas représentées à l'échelle.

**Consulter les réponses
aux questions d'étude,
contenues dans le kit.**

Appendices

- A Guide de dépannage
- B Préparation de lots de gel d'agarose

Des fiches de données de sécurité sont disponibles sur notre site internet : **www.edvotek.com**

Appendice A

Guide de dépannage

PROBLEME :	CAUSE :	SOLUTION :
Les bandes ne sont pas visibles sur le gel.	Le gel n'a pas été correctement préparé.	S'assurer que le tampon d'électrophorèse a été correctement dilué.
	L'appareil d'électrophorèse ou la source de courant ne fonctionne pas correctement.	Contacter le fabricant de l'appareil d'électrophorèse ou de la source de courant.
Les bandes ne sont toujours pas visibles.	Les colorants devraient migrer au moins 3,5 cm (support de 7x7 cm), et au moins 6 cm (support de 7x14 cm) par rapport aux puits.	Veiller à laisser progresser le gel d'au moins 6 cm (à peu près une heure à 125 V).
Il n'y a pas de séparation entre les bandes.	Un gel de concentration erronée a servi à la réalisation de l'électrophorèse.	Veiller à préparer le gel d'agarose à la concentration adéquate. Les échantillons Ready-to-Load™, servant de référence, doivent être analysés avec un gel d'agarose à 0,8%.
Je ne vois pas le colorant positivement chargé sur le gel.	Le colorant s'est écoulé du gel.	Le peigne n'a pas été placé dans la position qu'il fallait. Veiller à placer le peigne dans les fentes situées au milieu du plateau de support.
Il n'y a pas suffisamment d'échantillon dans mon QuickStrip.	Le QuickStrip s'est desséché.	Ajouter 40 µL d'eau, pipeter délicatement de haut en bas afin de mélanger avant de charger.

Appendice B

Préparation de lots de gel d'agarose

Afin de gagner du temps, une quantité plus importante de solution d'agarose peut être préparée à l'avance et distribuée en classe par la suite. Le tampon dilué qui n'a pas servi pourra être utilisé postérieurement et la solution de gel d'agarose solidifiée peut être refondue.

Lot de tampon d'électrophorèse

La préparation d'une quantité (lot) de 3 litres de tampon d'électrophorèse 1x est détaillée dans le Tableau D.

Tableau D Préparation d'un lot de tampon d'électrophorèse		
Tampon concentré 50x	+	Eau distillée
60 ml		2,940 ml
		Volume total requis
		3000 ml (3 L)

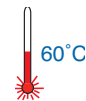
Lot de gels d'agarose (0,8%)

La préparation en quantité (lot) de gel d'agarose à 0,8% est décrite dans le Tableau E.

1. Utiliser une fiole de 500 ml pour préparer le gel dilué.
2. Verser 3,0 g d'UltraSpec-Agarose™ dans la solution de gel. Tournoyer délicatement afin d'enlever les grumeaux.
3. A l'aide d'un marqueur, indiquer le volume de concentration de la solution sur la fiole.
4. Chauffer la solution d'agarose, tel qu'indiqué dans la section sur la préparation individuelle de gel. La durée de chauffage varie en fonction du volume total de solution tampon.
5. Laisser refroidir la solution d'agarose jusqu'à 60°C en tournoyant délicatement la fiole afin que la chaleur se dissipe uniformément. S'il y a eu de l'évaporation, ajouter de l'eau distillée pour maintenir le volume de concentration indiqué sur la fiole dans l'étape 3.
6. Distribuer le volume de solution d'agarose refroidie nécessaire au coulage de gels individuels. Prévoir 30 ml pour des supports de 7x7 cm, 50 ml pour des supports de 7x10 cm, et 60 ml pour des supports de 7x14 cm.
7. Laisser le gel finir de se solidifier. Il se raffermira et refroidira au bout d'une vingtaine de minutes. Préparez enfin le gel pour la réalisation de l'électrophorèse.

Note:

Le poids du contenu de la bouteille d'UltraSpec-Agarose™ du kit figure normalement sur l'étiquette. Lisez celle-ci attentivement. Si la quantité d'agarose n'y est pas spécifiée ou si le sceau de fermeture de la bouteille en plastique est rompu, pesez l'agarose afin de vous assurer d'utiliser la quantité adéquate.



Tableau

E

Préparation d'un lot d'UltraSpec-Agarose™ à 0,8%

Quantité d'Agarose (g)	+	50X Tampon Concentré (ml)	+	Eau distillée (ml)	+	Volume Total (ml)
3.0		7.5		382.5		390