
Biotechnology Explorer™

Digestion par des enzymes de restriction et électrophorèse de l'ADN du phage Lambda

Manuel d'instructions

Référence catalogue N°166-0002EDU

<http://explorer.bio-rad.fr>

Le kit est emballé et expédié sous forme de deux modules. **Ouvrir les modules immédiatement après réception** et stocker les composants à -20°C , 4°C ou à température ambiante comme indiqué.

La duplication de toute partie de ce document est autorisée uniquement pour une utilisation en salle de cours.



Pour le service technique, composez le 01.47.95.69.64

Un manuel complet pour le professeur

Développés sur 5 ans, les kits et les programmes Biotechnology Explorer ont été rédigés pour des enseignants, par des enseignants et ont fait l'objet de tests approfondis sur site auprès d'une importante variété de classes, de l'enseignement secondaire au premier cycle universitaire. Les kits Biotechnology Explorer, faciles à utiliser, sont l'idéal pour introduire la biotechnologie en cours et passionner vos élèves. Chaque kit contient un protocole pas à pas innovateur qui en fait le choix parfait tant pour les enseignants expérimentés que pour les néophytes.

Les programmes proposés dans le manuel pour chaque kit en font un produit unique. Le Guide de l'enseignant contient des informations de fond et des sujets de cours qui permettent à chaque enseignant, qu'il soit expérimenté ou nouveau venu dans la biotechnologie, de préparer et de concevoir des cours et des leçons qui peuvent précéder les travaux pratiques. Cette préparation permet de s'assurer que les travaux pratiques se déroulent au mieux et que les élèves comprennent les concepts qui sous-tendent chaque séance de travaux pratiques.

Le manuel contient également une section consacrée à la configuration du TP, elle comporte des procédures détaillées et des diagrammes précis pour vous assister dans la préparation des travaux pratiques. Par ailleurs, cette section contient des informations sur les délais qui vous aideront à planifier votre programme. Chaque séance de travaux pratiques doit tenir sur une période de 50 minutes, ce qui peut s'intégrer dans la plupart des horaires. Les activités (de travaux pratiques) peuvent également être combinées et effectuées sur une tranche globale unique de 3 heures.

Chaque kit est conçu pour optimiser l'engagement des élèves dans les activités de travaux pratiques. L'engagement des élèves dans ce processus se traduit par une meilleure compréhension des processus scientifiques et ils apprécient mieux les bénéfices retirés si l'on s'acquitte d'une tâche de manière structurée et logique. Les élèves qui s'engagent dans le programme scientifique proposé par les kits Biotechnology Explorer de Bio-Rad développent au mieux leur aptitude à comprendre la méthode scientifique.

Nous cherchons en permanence à améliorer les programmes et les produits. Votre contribution est extrêmement précieuse pour nous. L'intégration de vos idées, de vos commentaires, de vos critiques et de vos suggestions peuvent permettre de faire évoluer les produits Biotechnology Explorer et d'en faire de meilleurs outils pédagogiques.

Vous pouvez télécharger la totalité de ce manuel d'instruction sur Internet. Visitez notre site <http://explorer.bio-rad.fr> ou contactez-nous au numéro suivant 01.47.95.69.65.

L'équipe Bio-Education
Bio-Rad division Bio-Recherche
3, bd Raymond Poincaré
92430 Marnes-la-Coquette

Sommaire

Guide de l'enseignant	Page
Présentation générale pour l'enseignant.....	3
Liste de contrôle du contenu du kit.....	5
Informations générales	6
Liste de contrôle du poste de travail	10
Préparation de l'enseignant.....	11
Leçon 1	
Distribuer les enzymes de restriction	11
Distribuer le tampon de restriction	11
Distribuer l'ADN Lambda	11
Préparation des gels d'Agarose	11
S'entraîner à l'utilisation des micropipettes (en option)	14
Leçon 2	
Préparer et distribuer le marqueur ADN	15
Distribuer le tampon de charge.....	15
Préparer la chambre d'électrophorèse	15
Préparer le colorant ADN Fast Blast™.....	1
Sécher les gels d'agarose	17
Mode opératoire destiné aux élèves.....	18

Présentation générale pour l'enseignant

Analyses de restriction — Liens avec la biotechnologie

Les techniques présentées dans cet exercice constituent la base des techniques de technologie d'ADN recombiné, d'empreintes génétiques et d'analyses de l'ADN dans le cadre de la médecine légale.

Ce kit introduit les élèves à certains principes importants du génie génétique. Un accent particulier sera mis sur les fonctions des enzymes de restriction et leur utilisation en tant qu'outils de biologie moléculaire. L'électrophorèse sur gel d'agarose permettra aux élèves de se familiariser avec les types de digestion, d'analyser les distances de migration et de déterminer les dimensions de fragments d'ADN inconnus.

Les enzymes de restriction ont joué un rôle de catalyseur dans la révolution de la biologie moléculaire et, désormais, nous connaissons des centaines d'enzymes de ce type. Dans la présente étude, les enzymes de restriction *EcoRI*, *PstI* et *HindIII* peuvent être utilisées pour digérer l'ADN du bactériophage lambda. L'électrophorèse sur gel sera utilisée pour séparer les fragments d'ADN résultant et un colorant bleu non-toxique (colorant ADN Fast Blast™) sera utilisé pour colorer les fragments afin de les visualiser.

Introduction à l'investigation guidée

Ce programme a pour intention de guider les élèves à travers le processus de réflexion impliqué par une procédure scientifique qui s'appuie sur les travaux pratiques. Ici, l'accent n'est pas mis sur la réponse ou le résultat mais plutôt sur la façon d'obtenir le résultat et sur la manière dont on peut le valider par une observation et une analyse attentive des données. C'est ce qu'on appelle une « étude en laboratoire basée sur des enquêtes guidées ».

À chaque étape, tout au long du parcours, nous mettons l'accent sur la compréhension par l'élève du processus ainsi que sur l'analyse des données.

Auditoire envisagé

Cette recherche est destinée à être utilisée par tout étudiant ou lycéen, indépendamment de son degré de familiarité préalable avec la chimie des acides nucléiques.

Objectifs des élèves

- Comprendre l'utilisation des enzymes de restriction en tant qu'outils de biotechnologie ;
- Se familiariser avec les principes et les techniques de l'électrophorèse sur gel agarose ;
- Estimer les dimensions des fragments d'ADN à partir de données sur gel agarose.

Sécurité

Il est interdit de manger, de boire, de fumer et de se maquiller dans le secteur de travail. Le port de lunettes et de gants de protection est fortement recommandé. Les élèves doivent se laver les mains avec du savon avant et après cet exercice. Si l'une quelconque des solutions entre en contact avec les yeux d'un élève, rincer abondamment à l'eau pendant 15 minutes. Même si le colorant ADN Fast Blast n'est pas toxique, il convient de porter des gants en latex ou en vinyle lors de la manipulation du colorant pour éviter de se tacher les mains. On peut porter une blouse de laboratoire et d'autres vêtements de protection pour éviter de tacher ses vêtements.

Températures de stockage

Le kit est emballé et livré sous forme de deux modules. **Ouvrir les modules dès réception** et stocker les composants à -20°C , 4°C ou à température ambiante selon ce qui est indiqué.

Délai de mise en œuvre*

Ce manuel contient trois leçons. Chaque leçon est conçue pour une durée de 50 minutes. Ces leçons comportent :

- une série de considérations à méditer avant que les élèves ne commencent les travaux pratiques ;
- une investigation active ;

Leçon 1 Introduction à l'analyse avec des enzymes de restriction

Considération 1

Couler les gels et digérer les échantillons d'ADN

Leçon 2 Électrophorèse sur gel d'agarose

Considérations 2 et 3

Charger et faire migrer les gels

Colorer les gels (consigner les résultats et sécher les gels en cas d'exécution du protocole de coloration rapide)

Leçon 3 Analyses des résultats

Consigner les résultats et sécher les gels (en cas d'utilisation du protocole de coloration durant toute la nuit)

Analyser les résultats

Discuter des résultats

* Les activités de TP ci-dessus peuvent également être effectuées sur une seule période globale de 3 heures.

Liste de contrôle du contenu du Kit

Cette section répertorie les composants fournis dans le kit Biotechnology Explorer de digestion par des enzymes de restriction et électrophorèse de l'ADN du phage lambda. Elle répertorie également les accessoires nécessaires et les accessoires en option recommandés. Chaque kit suffit pour équiper 8 postes (4 élèves par poste de travail). Sauf indication contraire, tous les réactifs sont conditionnés à leur concentration de fonctionnement (1x). Utiliser cette liste comme liste de contrôle pour inventorier vos fournitures lors de la réception du kit et avant de commencer l'expérience.

Contenu du kit	Quantité	(√)
Lambda digéré avec <i>Hind</i> III, 0,2 µg/µl, 100 µl	1 flacon	<input type="checkbox"/>
Enzymes de restriction <i>Hind</i> III, 500 unités, 40 µl	1 flacon	<input type="checkbox"/>
Enzymes de restriction <i>Pst</i> I, 500 unités, 40 µl	1 flacon	<input type="checkbox"/>
Enzymes de restriction <i>Eco</i> RI, 500 unités, 40 µl	1 flacon	<input type="checkbox"/>
Tampon de restriction, 2x, 500 µl	1 flacon	<input type="checkbox"/>
ADN Lambda non digéré, 0,2 µg/µl, 100 µl	1 flacon	<input type="checkbox"/>
Tampon de charge, 5x, 1 ml	1 flacon	<input type="checkbox"/>
Colorant ADN Fast Blast™, 500x, 100 ml	1 bouteille	<input type="checkbox"/>
Micro-tubes colorés	60	<input type="checkbox"/>
Portoirs en mousse	8	<input type="checkbox"/>
Agarose, 5g	1	<input type="checkbox"/>
Tampon électrophorèse, TAE 50x, 100 ml	1 bouteille	<input type="checkbox"/>
Cuves pour coloration des gels	4	<input type="checkbox"/>

Accessoires nécessaires non inclus dans le Kit	Quantité par poste	(√)
Micro-tubes	5	
Micropipettes réglables, 2 à 20 µl, Réf. Catalogue N°166-0506EDU	1	<input type="checkbox"/>
Chambre d'électrophorèse horizontale (cuve Mini-Sub® Cell GT), référence catalogue N°166-4000EDU	1	<input type="checkbox"/>
Générateur, référence catalogue N°164-5050EDU	1	<input type="checkbox"/>
Marqueurs indélébiles	1	<input type="checkbox"/>
Règle millimétrique	1	<input type="checkbox"/>
Scotch à autoclave (éviter marque 3M Scotch ou similaire)	1	<input type="checkbox"/>

Accessoires nécessaires supplémentaires non inclus dans le kit	Quantité par Kit	(√)
Micropipettes réglables, 20 à 200 µl, référence catalogue N°166-0507EDU	1	<input type="checkbox"/>
Cônes, 2 à 200 µl, 1000/sachet, référence catalogue N°223-9035EDU	1 sachet	<input type="checkbox"/>
Four à micro-ondes ou plaque chauffante	1	<input type="checkbox"/>

Accessoires recommandés (en option)	Quantité par Kit	(√)
Microcentrifugeuse, référence catalogue N°166-0612EDU	1	<input type="checkbox"/>
ou mini centrifugeuse, référence catalogue N°166-0613EDU	4	<input type="checkbox"/>
Film de support de gel (50 feuilles), Référence catalogue N°170-2984EDU	1 paquet	<input type="checkbox"/>
Plate-forme basculante, référence catalogue N°166-0719EDU	1	<input type="checkbox"/>
Bain-marie, référence catalogue N°166-0524EDU	1	<input type="checkbox"/>
Ou mini four incubateur, référence catalogue N°166-0521EDU	1	<input type="checkbox"/>

Les recharges sont disponibles séparément

Colorant ADN Fast Blast, 500x, 100 ml, référence catalogue N°166-0420EDU
 Agarose de biologie moléculaire, 25 g, référence catalogue N°161-3103EDU
 Ensemble de recharge du kit de restriction, référence catalogue N°166-0012EDU (contient des enzymes de restriction *Hind*III, *Pst*I et *Eco*RI, du tampon de restriction, de l'ADN lambda non digéré, de l'ADN lambda digéré avec *Hind*III, du tampon de charge et du colorant ADN Fast Blast).

Remarque : on peut utiliser un tampon TBE 1x (Tris-borate-EDTA) ou TAE 1x (Tris-acétate-EDTA) pour l'électrophorèse sur gel d'agarose. Les Instructions pour préparer et utiliser TAE 1x sont données dans ce manuel car du concentré TAE 50x est compris dans ce kit.

Informations générales

L'épissage d'ADN, l'excision et l'encollage des molécules d'ADN sont l'un des outils de base de la biotechnologie moderne. Le concept de base derrière l'épissage d'ADN est de retirer un fragment d'ADN fonctionnel — disons un gène — d'un organisme et de le combiner avec l'ADN d'un autre organisme afin d'étudier le fonctionnement du gène. Le résultat désiré de l'épissage du gène est que l'organisme récepteur porte les instructions génétiques fournies par le gène nouvellement acquis. Par exemple, certaines plantes peuvent recevoir les gènes permettant de résister à des parasites ou à des maladies et, dans quelques rares cas à ce jour, des gènes fonctionnels sont donnés à des personnes dont les gènes ne sont pas fonctionnels, c'est le cas, par exemple, pour les personnes atteintes d'une maladie génétique du type mucoviscidose.

Cette activité peut être utilisée pour simuler l'application en monde réel de l'épissage. Vous pouvez suggérer à vos élèves que l'ADN avec lequel ils travaillent représente un chromosome qui a été coupé en de nombreux fragments. Un de ces fragments produits pourra représenter un gène spécifique. Ce gène imaginaire peut coder pour un nombre quelconque de caractères mais, avant qu'il ait pu être donné à un organisme bénéficiaire, vos élèves doivent commencer par identifier le gène par sa taille en utilisant l'électrophorèse sur gel d'agarose.

Enzymes de restriction

L'aptitude à exciser, encoller ou séparer — abouter les éléments fonctionnels d'ADN de manière prévisible et avec précision est ce qui permet aux biotechnologistes de recombinaison les molécules d'ADN. C'est ce que l'on appelle la technologie d'ADN recombiné. La première étape de l'épissage d'ADN consiste à localiser un gène spécifique d'intérêt du chromosome. On utilise ensuite une enzyme de restriction pour découper le gène ciblé du reste des chromosomes. Cette même enzyme est également utilisée pour couper l'ADN du bénéficiaire dans lequel le fragment sera inséré.

Les enzymes de restriction sont des protéines qui coupent l'ADN en des sites spécifiques. Les enzymes de restriction, également connues sous le nom d'endonucléases de restriction, reconnaissent les séquences spécifiques de paires de bases d'ADN et coupent ou séparent chimiquement l'ADN au niveau des arrangements spécifiques de paires de bases. Elles ont tout d'abord été identifiées et isolées sur des bactéries qui les utilisent en tant que mécanisme de défense naturelle pour couper l'ADN intrus des bactériophages — virus qui infectent les bactéries. Tout ADN étranger rencontrant une enzyme de restriction sera digéré ou coupé en de nombreux fragments, et rendu inefficace. Ces enzymes dans les bactéries constituent le premier système immunitaire biologique. Il y a des milliers d'enzymes de restriction, chacune est appelée d'après le nom de la bactérie dont elle est isolée. Par exemple :

EcoRI = la première enzyme de restriction isolée de la bactérie *Escherichia coli*

HindIII = la troisième enzyme de restriction isolée de la bactérie *Haemophilus influenzae*

PstI = la première enzyme de restriction isolée de la bactérie *Providencia stuartii*.

Chaque enzyme de restriction reconnaît une séquence nucléotidique spécifique dans l'ADN, appelée un site de restriction et coupe la molécule d'ADN uniquement à cette séquence spécifique. De nombreuses enzymes de restriction laissent une courte longueur de bases non appariées, appelée une extrémité « adhésive », sur le site d'ADN où elles coupent, alors que deux enzymes de restriction peuvent effectuer une coupure sur les deux brins créant des fragments d'ADN à double brins avec des extrémités « franches ». En général, les sites de restriction sont palindromiques, ce qui signifie que la séquence des bases se lit de la même façon dans les deux sens, de droite à gauche et de gauche à droite sur le brin d'ADN opposé.

Par exemple, on trouvera ci-dessous une liste des enzymes et des sites où ils sont coupés :



ADN du phage Lambda

L'ADN lambda est l'ADN génomique d'un virus bactérien ou bactériophage (phage) qui attaque les bactéries en insérant son acide nucléique dans la cellule bactérienne hôte. Lambda est un phage qui se réplique rapidement à l'intérieur de la cellule hôte jusqu'à ce que la cellule explose et libère plus de phages pour réaliser le même processus d'infection dans d'autres cellules hôtes bactériennes. Le lambda bactériophage est inoffensif pour l'homme et d'autres organismes eukaryotes et, par conséquent, en fait une excellente source d'ADN pour l'étude expérimentale.

Dans ce TP, les élèves observent les effets de trois enzymes de restriction sur l'ADN lambda. Étant donné que le génome lambda est composé d'environ 48 000 paires de bases, chaque enzyme de restriction coupera plusieurs fois l'ADN et générera les fragments de restriction de différentes tailles. Dans cette activité, trois échantillons séparés d'ADN lambda seront coupés en utilisant trois enzymes de restriction différentes et un échantillon restera non digéré. Chaque échantillon produit des fragments d'ADN dont on peut estimer les tailles lorsqu'ils sont passés sur un gel d'agarose en utilisant l'électrophorèse.

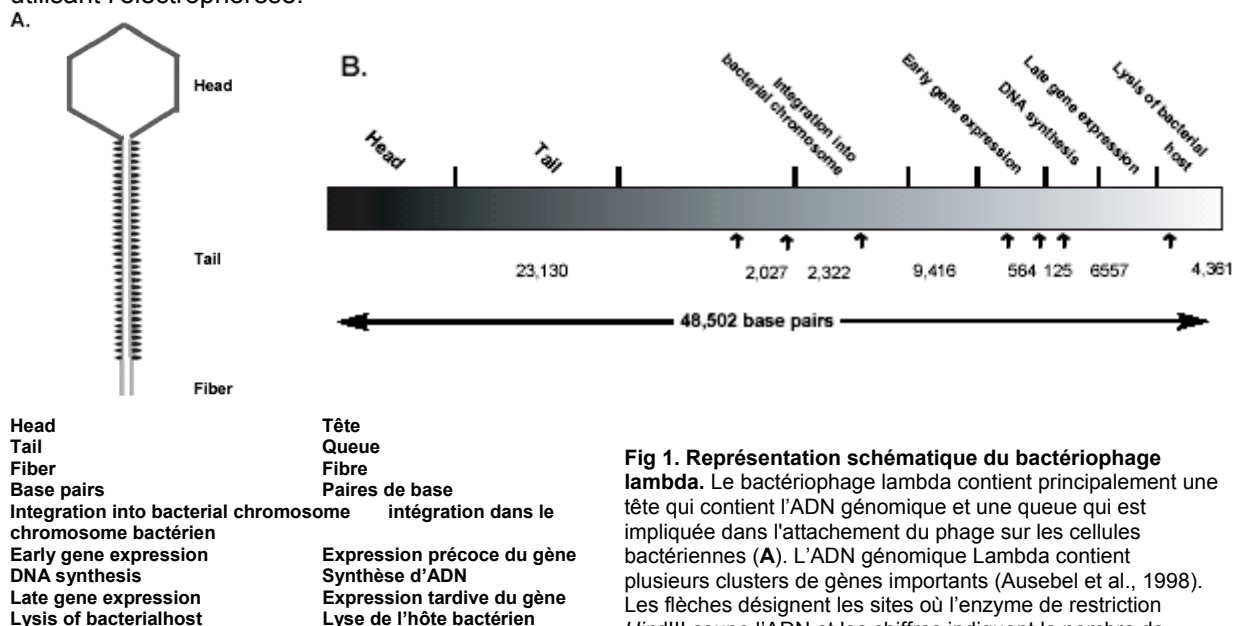


Fig 1. Représentation schématique du bactériophage lambda. Le bactériophage lambda contient principalement une tête qui contient l'ADN génomique et une queue qui est impliquée dans l'attachement du phage sur les cellules bactériennes (A). L'ADN génomique Lambda contient plusieurs clusters de gènes importants (Ausebel et al., 1998). Les flèches désignent les sites où l'enzyme de restriction *HindIII* coupe l'ADN et les chiffres indiquent le nombre de bases de chaque fragment (B).

Analyse électrophorétique des fragments de restriction

Une enzyme de restriction agit à l'instar de ciseaux moléculaires, effectuant des coupures au niveau de la séquence de paires de bases qu'elle reconnaît. La structure tridimensionnelle ou la forme d'une enzyme de restriction lui permet de s'intégrer parfaitement dans le sillon formé par les deux brins d'une molécule d'ADN. Lorsque qu'elle est attachée à l'ADN, l'enzyme glisse le long de la double hélice jusqu'à ce qu'elle reconnaisse une séquence spécifique de paires de bases qui indique à l'enzyme qu'elle doit arrêter de glisser. L'enzyme sépare ensuite chimiquement ou coupe la molécule d'ADN sur le site - appelé le site de restriction.

Si un site de restriction intervient dans plusieurs emplacements d'une molécule d'ADN, une enzyme de restriction effectue une coupure à chacun de ces sites, ce qui donne plusieurs fragments d'ADN. Par conséquent, si un morceau donné d'ADN linéaire est coupé avec une enzyme de restriction dont la séquence de reconnaissance spécifique est trouvée en cinq emplacements différents sur la molécule d'ADN, on obtiendra six fragments de longueurs différentes. La longueur de chacun des fragments dépend de l'emplacement des sites de restriction sur la molécule d'ADN.

Un fragment d'ADN qui a été coupé avec les enzymes de restriction peut être séparé en utilisant un processus connu sous la désignation d'« **électrophorèse sur gel d'agarose** ». Electrophorèse signifie *transporté par l'électricité*. L'électrophorèse sur gel d'agarose sépare les fragments d'ADN par taille. Les fragments d'ADN sont déposés sur un gel d'agarose qui est placé dans une chambre remplie d'une solution tampon conductrice. Un courant continu est passé entre les électrodes à chaque extrémité de la chambre. Les fragments d'ADN étant chargés négativement, ils seront attirés vers le pôle positif (anode) lorsqu'ils sont placés dans un champ électrique. La matrice de gel d'agarose agit comme un tamis moléculaire à travers lequel les fragments d'ADN plus petits peuvent se déplacer plus facilement que les fragments plus importants. Par conséquent, le taux auquel un fragment d'ADN migre à travers le gel est inversement proportionnel à sa dimension en paires de bases. Avec le temps, les fragments d'ADN plus petits, iront plus loin que les fragments d'ADN plus importants. Les fragments de la même taille restent ensemble et migrent en bandes simples d'ADN. Ces bandes se verront dans le gel une fois que l'ADN est coloré.

Une situation analogue est celle dans laquelle tous les bureaux et les chaises d'une salle de classe ont été rassemblés au hasard. Un élève isolé peut rapidement et assez facilement se faufiler dans ce labyrinthe alors qu'il faudra plus de temps à une chaîne de quatre élèves qui aura des difficultés à se frayer un chemin.

Rendre l'ADN visible

L'ADN est incolore, ainsi, on ne peut pas voir les fragments d'ADN dans le gel pendant l'électrophorèse. On ajoute à la solution d'ADN un tampon de charge contenant deux colorants bleus. Le tampon de charge ne colore pas l'ADN lui-même mais facilite le chargement des gels et la surveillance de l'avancement de l'électrophorèse de l'ADN. Les fronts colorés migrent vers l'extrémité positive du gel à l'instar des fragments d'ADN. Le colorant « plus rapide » co-migre avec les fragments d'ADN d'environ 500 pb, alors que le colorant « plus lent » co-migre avec les fragments d'ADN d'une taille d'environ 5 kb. La coloration de l'ADN fait ressortir son emplacement sur le gel. Lorsque le gel est immergé dans un colorant d'ADN Fast Blast, les molécules colorées s'attachent à l'ADN piégé dans le gel d'agarose. Lorsque les bandes sont visibles, vos élèves peuvent comparer les modèles de restriction ADN des différents échantillons d'ADN.

La Figure 2 montre les profils de bandes qui seront obtenues par vos élèves à la suite de l'électrophorèse d'échantillons d'ADN qui ont été digérés en utilisant trois différentes enzymes de restriction. Par convention, les lignes sont numérotées à partir du haut à gauche. Il est à noter que chaque enzyme de restriction produit un profil de bandes unique sur chaque ligne. On peut déterminer la dimension relative des fragments dans chaque bande en mesurant de combien chaque bande s'est déplacée par rapport à son origine. Comme les dimensions des fragments sont connues pour le lambda digéré avec *Hind*III, cet échantillon fonctionnera en tant que marqueur standard ADN.

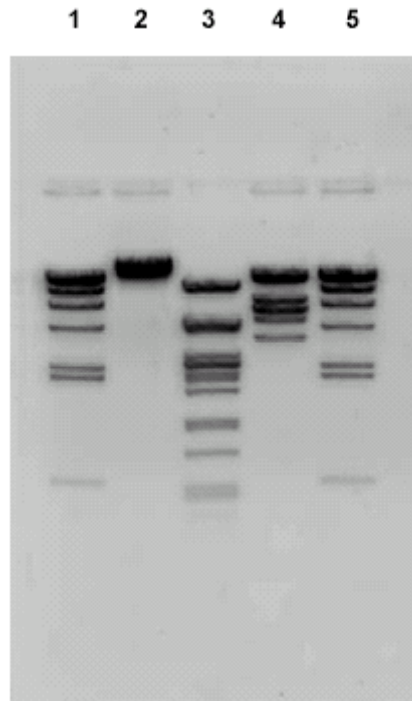


Fig. 2. Électrophorèse de l'ADN lambda digéré en utilisant trois enzymes de restriction différentes. Ligne 1, marqueurs ADN (Lambda digéré avec *Hind*III); ligne 2, ADN lambda non digéré; ligne 3, ADN lambda digéré avec *Pst*I; ligne 4, ADN lambda digéré avec *Eco*RI; ligne 5, ADN lambda digéré avec *Hind*III.

Bibliographie

Ausubel FM et al., Current Protocols dans Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York (1998)

Liste de contrôle des postes de travail

Postes de travail des élèves. Les matériaux et fournitures qui doivent être présents sur chaque poste de travail avant de commencer chaque séance de travaux pratiques sont répertoriés ci-dessous. Les composants fournis dans ce kit sont suffisants pour 8 postes de travail (4 élèves par poste).

Poste de travail de l'enseignant (Commun) : vous trouverez également ci-dessous une liste de matériaux, fournitures et équipement qui doivent être présents dans un emplacement commun, auquel tous les groupes d'élèves ont accès. L'accès des élèves aux solutions tampons et à l'équipement commun est à la discrétion de l'enseignant. Il peut également choisir de répartir en parties égales les solutions et de faire fonctionner l'équipement. Pour éviter le risque de contamination et de renversements potentiels, vous pouvez choisir de distribuer les solutions de base d'ADN et d'enzymes pour les élèves. Tous les autres réactifs doivent être conservés à l'avant de la salle pour que les équipes d'élèves puissent y accéder en fonction des besoins.

	Quantité par poste	(√)
LEÇON 1		
Poste de travail de l'élève		
Système d'électrophorèse sur gel d'agarose	1	<input type="checkbox"/>
(Chambre d'électrophorèse, plateau, peigne à 8 puits)		<input type="checkbox"/>
Scotch à autoclave (pas de la marque 3M Scotch ou scotch similaire)	1 rouleau	<input type="checkbox"/>
Marqueur indélébile	1	<input type="checkbox"/>
Micropipette, 2 à 20 µl	1	<input type="checkbox"/>
Cônes, 2 à 200 µl	20	<input type="checkbox"/>
Micro tubes vides : jaune, violet, vert, orange	1 de chaque	<input type="checkbox"/>
Portoir en mousse	1	<input type="checkbox"/>
Poste de travail de l'enseignant		
Agarose à 1% fondu dans TAE 1x	40 à 50 ml par gel	<input type="checkbox"/>
Trois enzymes de restriction enzymes sur glace (<i>HindIII</i> , <i>EcoRI</i> et <i>PstI</i>)	8 micro tubes de chaque (micro tubes non fournis)	<input type="checkbox"/>
ADN Lambda	8 micro tubes roses	<input type="checkbox"/>
Tampon de restriction	8 micro tubes bleus	<input type="checkbox"/>
Bain-marie à 37°C ou incubateur (en option)	1	<input type="checkbox"/>
LEÇON 2		
Poste de travail de l'élève		
Système d'électrophorèse sur gel d'agarose	1	<input type="checkbox"/>
Gel d'agarose	1	<input type="checkbox"/>
Générateur pour électrophorèse	1	<input type="checkbox"/>
Micropipette, 2 à 20 µl	1	<input type="checkbox"/>
Cônes, 2 à 200 µl	20	<input type="checkbox"/>
Portoir en mousse	1	<input type="checkbox"/>
Tampon de charge	1 micro tube (micro tube non fourni)	<input type="checkbox"/>
ADN lambda digéré avec <i>HindIII</i> (marqueur ADN)	1 micro tube (micro tube non fourni)	<input type="checkbox"/>
Marqueur indélébile	1	<input type="checkbox"/>
Pellicule de support de gel (le cas échéant)*	1 feuille	<input type="checkbox"/>
Colorant ADN Fast Blast, 1x ou 100x*	120 ml pour 2 postes	<input type="checkbox"/>
Cuve pour coloration de gels	1 pour 2 postes	<input type="checkbox"/>
Conteneurs importants pour décoloration (le cas échéant)*	1 à 3 pour 2 postes	<input type="checkbox"/>
Poste de travail de l'enseignant		
Tampon électrophorèse (TAE 1x)	275 ml par gel	<input type="checkbox"/>
LEÇON 3		
Poste de travail de l'élève		
Pellicule de support de gel (le cas échéant)*	1 feuille	<input type="checkbox"/>
Règle millimétrique	1	<input type="checkbox"/>
Poste de travail de l'enseignant		
Plate-forme basculante (en option)	1	<input type="checkbox"/>
Microcentrifugeuse	1	<input type="checkbox"/>
ou Minicentrifugeuse (en option)	4	<input type="checkbox"/>

* Selon qu'il s'agit d'une coloration rapide ou d'une coloration sur la nuit.

Préparation du professeur

Cette section décrit comment l'enseignant peut s'avancer. Ces procédures peuvent être mises en œuvre 1 ou 2 jours à l'avance par l'enseignant ou être effectuées par des groupes d'élèves au cours des travaux pratiques.

Leçon 1 : Enzymes de restriction : ciseaux moléculaires

Préparation

- Objectifs** Distribuer les réactifs tels que les enzymes de restriction, les tampons et l'ADN lambda (en option)
Couler les gels d'agarose*. Si vous préférez que vos élèves coulent leurs propres gels pendant les travaux pratiques, préparez l'agarose à l'avance. Si vous préparez à l'avance, l'agarose dissout doit être maintenue entre 55 et 60°C jusqu'à ce que le gel soit coulé. Préparer les postes de travail de l'élève et de l'enseignant.
- Temps nécessaire** Trente minutes à 1 heure, en fonction de la manière que vous choisissez pour préparer les gels d'agarose.
- Matériaux nécessaire** Chambre d'électrophorèse, plateau et peignes
Tampons électrophorèse (TAE 1x)
Poudre d'agarose
Tampon de charge ADN.

Procédures

Chaque poste de travail aura besoin d'échantillons d'enzymes de restriction, d'ADN lambda et de tampon de restriction. Vous pouvez distribuer les tubes pour chaque poste de travail ou bien laisser les tubes de solution de base à l'avant de la classe pour que les groupes d'élèves aillent se servir.

1. **Distribuer les enzymes de restriction.** Ajouter 5 µl de chaque enzyme dans huit microtubes, non fournis (total de 24 tubes). Étiqueter les tubes : *HindIII*, *PstI*, et *EcoRI*.
Remarque : les enzymes de restriction sont sensibles à la température et doivent, à tout moment, être conservées dans de la glace. Stocker les enzymes au congélateur jusqu'à ce qu'elles soient prêtes à être utilisées. Le jour de la séance de travaux pratiques, placer les tubes sur de la glace et distribuer un tube à chaque équipe.
2. **Distribuer le tampon de restriction.** Ajouter 60 µl de tampon de restriction dans 8 microtubes bleus. Étiqueter les tubes « TR ». Placer les tubes sur de la glace et distribuer un tube à chaque équipe.
3. **Distribuer l'ADN lambda.** Ajouter 25 µl d'ADN lambda dans 8 microtubes roses. Étiqueter les tubes « lambda ». Placer les tubes sur de la glace et distribuer un tube à chaque équipe.
4. **Préparer les gels d'agarose.** La concentration d'agarose recommandée pour les gels dans cette application de travaux pratiques est un agarose à 1%. Cette concentration d'agarose donne une bonne résolution et minimise le temps nécessaire pour obtenir la séparation électrophorétique des fragments d'ADN. L'épaisseur recommandée du gel est de 0,75 à 1,0 cm pour faciliter le chargement d'échantillon et la manutention du gel. **Pour préparer les gels d'agarose, bien utiliser un tampon électrophorèse et non pas de l'eau.**

* On peut se procurer auprès Bio-Rad des gels précoulés pratiques (référence catalogue N°161-3057EDU). Il s'agit de gels TAE à 1% 2 x 8-puits, qui s'insèrent dans la cuve GT Mini-Sub Cell de Bio-Rad ou sur tout système d'électrophorèse horizontal qui reçoit des gels de 7 x 10 cm.

- a. **Préparation du tampon électrophorèse.** Le tampon électrophorèse TAE (Tris-acétate-EDTA) est fourni sous forme de solution concentrée à 50x. En plus du tampon TAE 1x nécessaire pour obtenir les gels d'agarose, il faut également environ 275 ml pour chaque chambre d'électrophorèse. Trois litres de tampon TAE 1x suffisent pour faire fonctionner huit chambres d'électrophorèse et préparer 8 gels d'agarose. Pour réaliser 3 l de TAE 1x à partir de concentré de TAE 50x, ajouter 60 ml de concentré 50x à 2,94 l d'eau distillée.
- b. **Préparation d'agarose.** Ces procédures peuvent être mises en œuvre 1 à 2 jours à l'avance par le professeur ou pendant le cours par chaque groupe d'élèves.
- i. Pour obtenir une solution d'agarose à 1%, utiliser 1 gramme d'agarose pour chaque 100 ml de tampon électrophorèse TAE 1x. Bien vérifier que vous utilisez le tampon électrophorèse et non de l'eau.
Si les chambres d'électrophorèses vous limitent, vous pouvez utiliser un plateau de 7 x 10 cm et deux peignes 8-puits pour couler un gel qui peut être utilisé pour exécuter deux jeux de digestion.
Le tableau ci-dessous peut vous servir de guide pour les besoins de volume de gel lorsque vous coulez un ou plusieurs gels.
Volume d'agarose 1% pour :

Nombre de gels	Plateau 7 x 7 cm	Plateau 7 x 10 cm
1	40 ml	50 ml
2	80 ml	100 ml
4	160 ml	200 ml
8	320 ml	400 ml

- ii. Ajouter de la poudre d'agarose à un conteneur adapté (par ex., fiole d'Erlenmeyer de 500 ml pour 200 ml ou moins). Ajouter la quantité appropriée de tampon électrophorèse TAE 1x et agiter en tourbillon pour que la poudre d'agarose se trouve en suspension dans le tampon. Si vous utilisez une fiole d'Erlenmeyer, renverser une fiole d'Erlenmeyer de 25 ml dans l'extrémité ouverte de la fiole d'Erlenmeyer de 500 ml contenant l'agarose. La petite fiole agit en tant que chambre de reflux, permettant par conséquent une ébullition longue ou vigoureuse sans trop d'évaporation. Pour couler le gel, on peut faire fondre l'agarose par ébullition jusqu'à ce que ce dernier ait complètement fondu sur une plaque chauffante magnétique, un bain-marie ou dans un four à micro-ondes.

Attention : toujours porter des gants, des lunettes de protection et des blouses lors de la préparation et du coulage de gels d'agarose. De l'agarose fondu ou en ébullition ou des fioles contenant de l'agarose chaud peuvent provoquer des brûlures graves en cas de contact avec la peau.

Méthode du four à micro-ondes. Cette technique est la plus rapide et la plus sûre pour dissoudre l'agarose. Placer la solution de gel dans une bouteille ou une fiole appropriée dans le micro-ondes. **DESSERRER LE BOUCHON SI VOUS UTILISEZ UNE BOUTEILLE.** Utiliser un réglage moyen et régler à 3 minutes. Arrêter le micro-ondes toutes les 30 secondes et agiter la fiole pour suspendre tout agarose non dissous. Porter à ébullition et agiter jusqu'à ce que toutes les petites particules d'agarose transparentes soient dissoutes. Mettre de côté et refroidir entre 55 et 60°C avant de verser.

Méthode de la plaque chauffante magnétique. Ajouter un agitateur à la solution d'agarose non dissoute. Chauffer la solution jusqu'à ébullition tout en agitant sur une plaque chauffante magnétique. Faire retomber les bulles et la mousse avant qu'ils n'atteignent le col de la fiole. Faire bouillir la solution jusqu'à ce que toutes les petites particules transparentes d'agarose se soient dissoutes. Mettre de côté et refroidir entre 55 et 60°C avant de verser.

c. Procédure pour couler le gel

Cette activité de travaux pratiques exige que chaque gel ait au moins 4 puits. Suivre les instructions ci-dessous pour préparer l'agarose et déterminer quel volume d'agarose à 1% sera nécessaire pour vos classes. Verser suffisamment d'agarose pour couvrir les dents du peigne de gel ou pour atteindre une profondeur de 0,5 à 0,75 cm. Ne pas déplacer ni manipuler le plateau du gel tant que le gel n'est pas solidifié. Le gel solidifié peut être stocké en sachets scellables à température ambiante pendant un jour ou au réfrigérateur jusqu'à une semaine avant d'être utilisé. Les élèves doivent étiqueter leurs sachets en plastique. Il faut pour une classe entière environ 30 minutes pour couler les gels. Si possible, couler des gels supplémentaires à titre de secours. Cette section décrit une méthode pour couler les gels. D'autres méthodes sont détaillées dans le manuel d'instruction de la cuve Sub-Cell® GT (chambre d'électrophorèse).

- i. Bien sceller les extrémités du plateau avec du scotch à autoclave standard (pas de Scotch ou similaire). Appuyer fermement le scotch sur les extrémités du plateau pour former un joint étanche au fluide.
- ii. Mettre à niveau le plateau sur une table de mise à niveau ou sur une paillasse en utilisant un niveau à bulle fourni avec la chambre.
- iii. Préparer la concentration désirée et la quantité d'agarose dans le tampon électrophorèse TAE 1x.
- iv. Refroidir l'agarose à au moins 60°C avant de couler.
- v. Pendant que l'agarose refroidit à 60°C, placer le peigne dans la fente appropriée du plateau. Le peigne doit être placé à moins de 1/2 pouce de l'extrémité du plateau si on coule un seul puits de gel de 7 x 7 cm. Pour couler deux rangées de puits en utilisant un plateau de 7 x 10 cm et deux peignes de 8 puits, placer un peigne à l'une des extrémités du plateau et l'autre peigne au milieu du plateau. Les peignes formeront des puits dans lesquels les échantillons seront déposés.
- vi. Laisser le gel se solidifier à température ambiante pendant 10 à 20 minutes. Il aura un aspect blanchâtre ou opaque lorsqu'il sera prêt à être utilisé.
- vii. Retirer avec précaution le peigne du gel solidifié.
- viii. Retirer le scotch des bords du plateau.
- ix. Vous avez deux options :

Option un : si vous n'avez pas suffisamment de temps pour passer à la Leçon 2, stocker les gels dans un sachet en plastique scellable à température ambiante pendant 1 jour ou au réfrigérateur (4°C) pendant une semaine avant de les utiliser. Faites étiqueter les sachets en plastique par vos élèves.

Option deux : s'il y a suffisamment de temps pour passer à la Leçon 2, placer le plateau sur la chambre d'électrophorèse d'ADN mise à niveau, de sorte que les puits d'échantillons soient à l'extrémité noire (cathode) de la base. Au cours de l'électrophorèse, les échantillons d'ADN migreront vers l'extrémité rouge (anode) de la chambre.

Digestion par enzymes de restriction. Une incubation de 30 minutes à 37°C est la condition optimale pour la digestion. Si l'on ne dispose pas d'un bloc de chauffe à 37°C, d'un bain-marie ou d'un incubateur, les échantillons peuvent être digérés en plaçant les tubes dans des portoirs en mousse en les faisant flotter dans un volume important d'eau (1 litre ou plus) portée à 37°C, et en les laissant incuber la nuit en laissant l'eau refroidir et revenir à la température ambiante.

S'entraîner à l'utilisation des micropipettes (en option)

Avant de commencer la leçon 1, nous vous recommandons de familiariser vos élèves avec les techniques correctes d'utilisation des pipettes. Montrez-leur comment transférer avec une micropipette différents volumes d'une solution d'un tube à un autre. Les élèves peuvent s'exercer en utilisant un tampon de charge ou un colorant alimentaire mélangé avec une solution de glycérol ou de sucre saturé dense. Voici un résumé rapide de la manière d'utiliser les micropipettes :

1. Regarder la micropipette pour déterminer la plage de volume.
2. Tourner le cadran sur la micropipette pour régler le volume désiré.
3. Attacher un cône propre.
4. Presser le piston de la micropipette jusqu'à la **première** butée (douce).
5. Insérer le cône de la pipette dans la solution à transférer.
6. Libérer **lentement** le piston pour extraire le liquide.
7. Insérer le cône dans le tube désiré.
8. Appuyer sur le piston au-delà de la première butée jusqu'à la **seconde** butée (dure) pour transférer le liquide. Vérifier de bien maintenir le piston enfoncé lorsque vous soulevez l'extrémité de la pipette hors du tube.
9. Éjecter le cône.

Leçon 2 : électrophorèse sur gel d'agarose et visualisation des fragments d'ADN

Préparation

Objectifs	Préparer l'ADN lambda digéré avec <i>HindIII</i> (marqueur d'ADN) et distribuer (en option) Distribuer le tampon de charge d'ADN (en option) Préparer la chambre d'électrophorèse Diluer du Fast Blast à 1x (pour une coloration sur toute la nuit) ou 100x (pour une coloration rapide) ; Préparer les postes de travail des élèves et du professeur.
Temps nécessaire	45 minutes
Fournitures nécessaires	ADN de lambda digéré avec <i>HindIII</i> (marqueur ADN) Tampon de charge Chambres d'électrophorèse, plateau et peignes Tampon d'électrophorèse (TAE 1x) Colorant ADN Fast Blast, 500x

Procédures

- 1. Préparer l'ADN lambda digéré avec *HindIII* (marqueur ADN) et distribuer (en option).** Ajouter 20 µl de tampon de charge au tube de référence contenant le marqueur ADN lambda digéré avec *HindIII* . Si possible, chauffer le marqueur à 65°C pendant 5 minutes, puis refroidir sur de la glace ; ceci permet d'obtenir une meilleure séparation des bandes de marqueur. Étiqueter des microtubes (non fournis) avec un « M ». Ajouter 15 µl de marqueurs d'ADN contenant le tampon de charge dans 8 micro tubes étiquetés « M ».
- 2. Distribuer le tampon de charge.** Étiqueter huit microtubes (non fournis) « TC » pour déposer le colorant et ajouter 30 µl de tampon de charge dans chaque tube. Distribuer un tube à chaque groupe.
- 3. Préparer la chambre d'électrophorèse.** Lorsque le gel d'agarose est solidifié, on peut commencer le dépôt d'échantillons et l'électrophorèse.
 - a. Lorsque l'on place le plateau dans la chambre l'électrophorèse, vérifier que les puits d'échantillon sont à l'extrémité cathode noire. Durant l'électrophorèse, les échantillons migreront vers l'extrémité de l'anode rouge.
 - b. Préparer le volume requis de tampon TAE 1x si vous ne l'avez pas déjà préparé.
 - c. Plonger le gel dans environ 2 mm de tampon TAE 1x.
 - d. Préparer les échantillons pour la charge du gel.

Remarque : les exigences d'alimentation varient en fonction de l'épaisseur du gel, de la longueur, de la concentration et du type de tampon d'électrophorèse utilisé. Pour cet exercice, nous recommandons d'appliquer une tension constante de 100 V pendant 30 minutes.

- 4. Préparer le colorant ADN Fast Blast**
 - a. Pour préparer le colorant 100x (pour la coloration rapide), diluer 100 ml de Fast Blast 500x dans 400 ml d'eau distillée ou déminéralisée dans une fiole ou une bouteille de dimensions appropriées et mélanger. Couvrir la fiole et la stocker à température ambiante jusqu'à ce qu'elle soit prête à être utilisée.
 - b. Pour préparer du colorant 1x (pour coloration dans la nuit), diluer 1 ml de Fast Blast 500x dans 499 ml d'eau distillée ou déminéralisée dans une fiole ou une bouteille de dimensions appropriées et mélanger. Couvrir la fiole et la stocker à température ambiante jusqu'à ce qu'elle soit prête à être utilisée.

Rendre l'ADN visible

Le colorant ADN Fast Blast est une alternative pratique, sûre et non toxique au bromure d'éthidium pour la détection d'ADN dans les gels d'agarose après l'électrophorèse. Fast Blast contient un produit cationique qui appartient à la famille de colorants thiazole. Les molécules de colorant chargées positivement sont attirées par les groupes de phosphates chargés négativement sur les molécules d'ADN et s'y lient. La formule brevetée de colorant colore l'ADN d'un bleu profond dans les gels d'agarose et donne des résultats vivants, cohérents.

Le colorant ADN Fast Blast est fourni sous la forme d'un concentré 500x qui doit être dilué avant d'être utilisé. Le colorant peut être utilisé en tant que colorant rapide lorsqu'il est dilué à **100x** pour permettre la visualisation de l'ADN en 12 à 15 minutes ou être utilisé en tant que colorant sur la nuit lorsqu'il est dilué à **1x**. Lorsque le gel d'agarose est plongé dans le colorant ADN Fast Blast, les molécules de colorant s'attachent aux molécules d'ADN piégées dans le gel d'agarose. Lorsque les bandes d'ADN sont visibles, vos élèves peuvent comparer les schémas de restriction d'ADN des différents échantillons d'ADN.

AVERTISSEMENT

Même si le colorant ADN Fast Blast n'est ni toxique ni cancérigène, il est conseillé de porter des gants en latex ou en vinyle lorsque vous manipulez les colorants ou les gels colorés pour éviter de se tacher les mains en bleu. Il est judicieux de porter des blouses de laboratoire ou d'autres vêtements de protection pour ne pas maculer les vêtements. Jeter les solutions de colorant conformément aux protocoles de votre site. Utiliser une solution de blanchiment à 10% ou une solution d'alcool à 70% pour nettoyer Fast Blast de la plupart des surfaces. Avant de les utiliser, vérifier que ces solutions n'endommagent pas la surface.

Remarques :

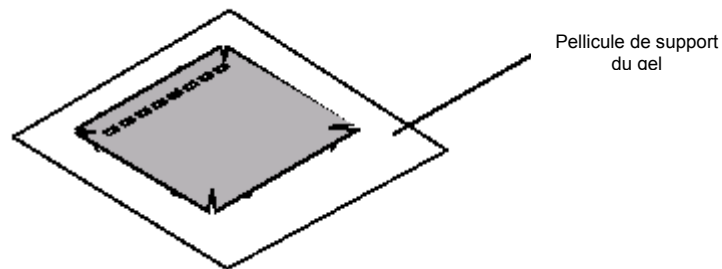
- Nous vous recommandons l'utilisation de 120 ml de Fast Blast dilué pour colorer deux gels d'agarose 7 x 7 cm ou 7 x 10 cm dans des cuves de coloration individuelles fournies avec le kit (vous pouvez pratiquer des encoches aux coins du gel pour en faciliter l'identification). Si vous utilisez d'autres cuves de coloration, ajouter un volume suffisant de colorant pour immerger totalement les gels.
- Après l'électrophorèse, les gels d'agarose doivent être retirés des plateaux avant de les placer dans la solution de coloration. Pour ce faire, maintenir la base du plateau d'une main et sortir délicatement le gel en le poussant avec le pouce de l'autre main.
- Le gel étant fragile, vous devez faire particulièrement attention lorsque vous le manipulez. Nous vous recommandons fortement d'utiliser une large spatule ou toute autre surface de support pour transférer le gel d'un conteneur à un autre durant les étapes de décoloration du protocole de coloration rapide.
- La décoloration (lorsque l'on suit le protocole de coloration rapide) implique l'utilisation d'au moins un conteneur de volume important capable de contenir au moins 500 ml, à chaque poste d'élève. Chaque groupe d'élèves peut utiliser des conteneurs de lavage séparés pour chaque étape de lavage ou simplement utiliser un seul conteneur qui sera vidé après chaque lavage et rempli pour le lavage suivant.
- Fast Blast 100x peut être réutilisé au moins sept fois.
- Aucun lavage ou décoloration n'est nécessaire lors de l'utilisation du protocole de coloration pendant toute la nuit.

Pour obtenir une archive permanente du gel avant qu'il ne soit séché, tracer le contour du gel (y compris les puits et les bandes d'ADN) sur un morceau de papier ou d'acétate, prendre une photographie en utilisant un appareil de photo et une pellicule standard (système de documentation de gel Polaroid standard de Bio-Rad, référence catalogue N°170-3742EDU) ou photocopier le gel coloré.

Séchage du gel d'agarose pour garder une trace permanente de l'expérience

Remarque : pour sécher le gel d'agarose, il faut utiliser un agarose de qualité analytique très résistant d'une formule spéciale de Bio-Rad. Les autres supports de gel peuvent ne pas être appropriés à cet effet.

Nous recommandons d'utiliser la **pellicule de support de gel** exclusive de Bio-Rad (référence catalogue N°170-2984EDU) pour sécher les gels d'agarose. Retirer le gel d'agarose coloré de sa cuve de coloration et découper toutes les bandes non chargées avec un cutter ou une lame de rasoir. Placer le gel directement sur le côté hydrophile d'un morceau de pellicule de support de gel. (L'eau formera des cordons sur le côté hydrophobe mais s'étalera sur le côté hydrophile de la pellicule). Centrer le gel sur la pellicule et chasser les bulles qui peuvent se former entre le gel et la pellicule. Placer la pellicule sur une serviette en papier et laisser le gel sécher en veillant à éviter une exposition directe à la lumière. Au fur et à mesure que le gel sèche, il se fixera sur la pellicule mais ne rétrécira pas. Si on le laisse sans intervenir sur la pellicule de support, le gel séchera complètement à la température ambiante au bout de 2 à 3 jours. Le résultat est une trace plate, transparente et durable de l'expérience.

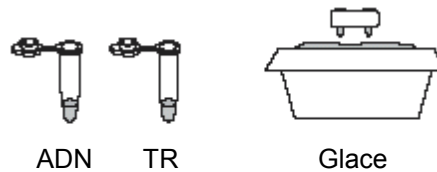


Remarque : éviter une exposition prolongée des gels séchés à la lumière directe pour éviter que la bande ne passe. Toutefois, les bandes d'ADN réapparaîtront si les gels séchés sont stockés dans le noir pendant 2 à 3 semaines après avoir passé.

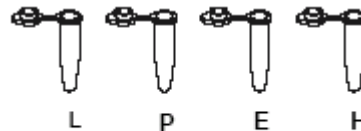
Mode opératoire pour la digestion par des enzymes de restriction et l'analyse

Leçon 1 Digestion par enzymes de restriction

1. Se procurer des microtubes qui contiennent chacun une solution de base d'enzyme, de l'ADN lambda (tube rose) et du tampon de restriction (tube bleu). Garder toutes les solutions de base sur de la glace.

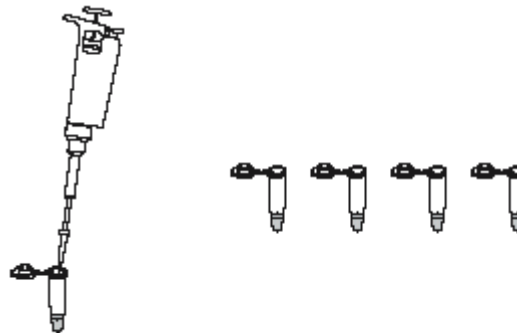


2. Se procurer un exemplaire de chaque microtube coloré et étiqueter comme suit :
 Tube jaune : **L** (ADN lambda)
 Tube violet : **P** (lambda digéré avec *Pst*I)
 Tube vert : **E** (lambda digéré avec *EcoR*I)
 Tube orange : **H** (lambda digéré avec *Hind*III)

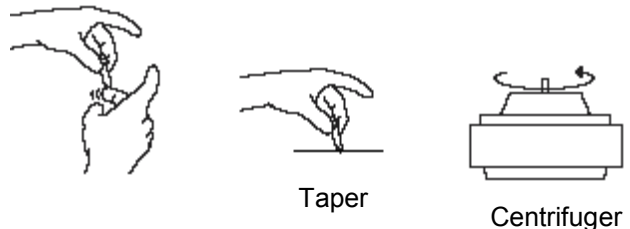


3. En utilisant un nouveau cône pour chaque échantillon, pipeter les réactifs dans chacun des tubes conformément au tableau ci-dessous.

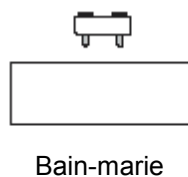
Tube	ADN	tampon	TR	<i>Pst</i> I	<i>EcoR</i> I	<i>Hind</i> III
L	4 µl	6 µl	–	–	–	–
P	4 µl	5 µl	1 µl	–	–	–
E	4 µl	5 µl	–	–	1 µl	–
H	4 µl	5 µl	–	–	–	1 µl



4. Mélanger les composants en donnant de petites chiquenaudes et en tapant délicatement l'extrémité sur la table pour ramener tout le liquide dans le fond du tube. Centrifuger le tube pour rassembler tout le liquide dans le fond ou le taper délicatement sur l'établi.



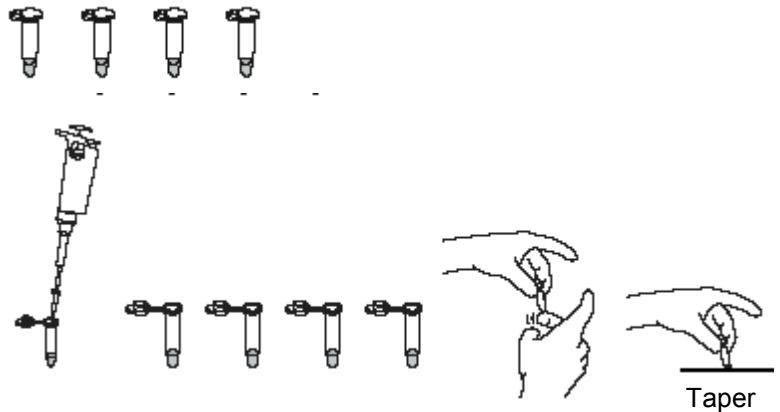
5. Placer les tubes dans un support flottant et faire incuber pendant 30 minutes à 37°C ou toute une nuit à température ambiante.



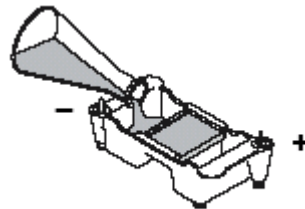
6. Après l'incubation, placer les échantillons dans le réfrigérateur jusqu'au prochain TP ou passer directement à l'étape 2 de la Leçon 2.

Leçon 2 Électrophorèse sur gel d'agarose

1. Retirer les échantillons d'ADN digérés du réfrigérateur (le cas échéant).
2. Ajouter 2 μ l de tampon de charge (TC) dans chaque tube. Mélanger le contenu en donnant des petites chiquenaudes. Ramener l'échantillon dans le fond du tube en le tapant délicatement sur la table ou en le centrifugeant.

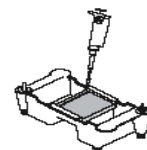


3. Demander le marqueur ADN (M) à votre professeur.
4. En option : chauffer les échantillons d'ADN à 65°C pendant 5 minutes puis les mettre sur de la glace.
5. Retirer le gel d'agarose du réfrigérateur (le cas échéant) et retirer l'emballage plastique. Remplir la chambre d'électrophorèse et couvrir le gel avec le tampon TAE 1x (environ 275 ml de tampon).

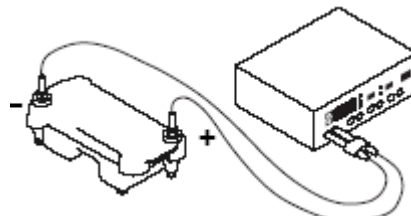


6. Vérifier que les puits des gels d'agarose sont proches de l'électrode noire (-) et que le bord du bas du gel est proche de l'électrode rouge (+).
7. Déposer 10 μ l de chaque échantillon dans les puits séparés dans la chambre de gel dans l'ordre suivant :

Ligne	Échantillon
1	M, marqueur (tube clair)
2	L, ADN lambda non coupé (tube jaune)
3	P, ADN lambda digéré avec <i>Pst</i> I (tube violet)
4	E, ADN lambda digéré avec <i>Eco</i> RI (tube vert)
5	H, ADN lambda digéré avec <i>Hind</i> III (tube orange)



8. Placer délicatement le couvercle sur la chambre d'électrophorèse. Raccorder les fils électriques au générateur : rouge sur rouge et noir sur noir.
9. Mettre sous tension et laisser agir à 100 V pendant 30 minutes.



Visualisation des fragments d'ADN

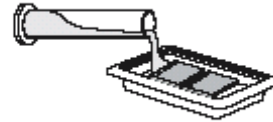
1. Lorsque l'électrophorèse se termine, couper l'alimentation et retirer le haut de la chambre. Retirer délicatement le gel et le plateau de la chambre. Faire attention, le gel est très glissant. Faire glisser le gel dans la cuve de coloration.



2. Vous avez deux options pour colorer votre gel :

Coloration rapide (prend 12 à 15 minutes)

a. Ajouter 120 ml de colorant Fast Blast **100x** dans une cuve de coloration (2 gels par cuve).



b. Colorer les gels pendant 2 minutes en agitant délicatement. Mettre de côté le colorant utilisé pour une utilisation future.

c. Transférer les gels dans un conteneur de lavage important et les rincer avec de l'eau du robinet chaude (40 à 55°C) pendant environ 10 secondes.

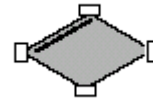


d. Décolorer en lavant deux fois dans de l'eau du robinet chaude pendant 5 minutes en secouant légèrement pour obtenir de meilleurs résultats.

e. Consigner les résultats.

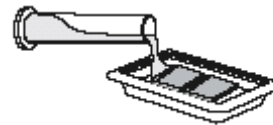
f. Découper et mettre au rebut toutes les lignes non chargées.

g. Sécher à l'air le gel sur la pellicule de support et fixer avec du scotch le gel séché dans votre carnet de laboratoire.



Coloration pendant toute la nuit

a. Ajouter 120 ml de colorant ADN Fast Blast **1x** dans la cuve de coloration (2 gels par cuve).



b. Laisser le gel se colorer dans la nuit, en brassant légèrement pour obtenir de meilleurs résultats. Aucune décoloration n'est nécessaire.

c. Verser l'eau dans un bécher à rebut.



d. Consigner les résultats.

e. Découper toutes les lignes non chargées.

f. Sécher à l'air le gel sur la pellicule de support de gel et coller avec du scotch le gel séché dans votre cahier de laboratoire.

