
Biotechnology Explorer™

Kit empreinte génétique

Manuel d'instructions

Référence catalogue N°166-0007EDU

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

Le kit est expédié à température ambiante. Ouvrir le kit dès réception et stocker les composants à -20°C, 4°C ou à température ambiante selon ce qui est préconisé.

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



Les empreintes génétiques, de la biotechnologie à la bioéthique

Les empreintes génétiques dans les programmes

Au collège, un des objectifs du programme de troisième est l'acquisition par les élèves des notions d'unicité et de diversité génétique des êtres humains.

Au lycée, **en seconde**, l'ADN est identifié comme le support moléculaire de l'information génétique des êtres vivants. Les élèves découvrent que les individus d'une même espèce peuvent posséder des versions différentes de certaines portions d'ADN.

Parmi les thèmes au choix, le sujet des empreintes génétiques est proposé comme un moyen d'approche de la bioéthique avec les élèves.

L'enseignement de spécialité de terminale S aborde la génétique sous l'angle historique. Les apports de l'utilisation des enzymes de restriction à partir des années 70 doivent être traités. Dans le texte du programme, figure parmi les activités pratiques envisageables une digestion de l'ADN par des enzymes de restriction associée à une électrophorèse de l'ADN.

En **première année de classe préparatoire aux grandes écoles BCPST-Véto**, les techniques d'analyse de l'ADN sont abordées dans le cadre de Travaux pratiques.

Avec des objectifs pédagogiques différents, le kit empreinte génétique peut donc être utilisé en seconde, en enseignement de spécialité de terminale S et en CPGE BCPST-Véto.

Quelques applications des empreintes génétiques

Les empreintes génétiques sont désormais fréquemment utilisées dans le cadre d'enquêtes policières. D'infimes quantités d'ADN permettent d'identifier un suspect comme étant le coupable ou inversement de l'innocenter.

L'ADN est devenu un moyen remarquablement efficace d'identification des individus utilisé également sur le terrain d'accidents pour la reconnaissance des victimes.

De nombreuses autres procédures médico-légales font appel aux empreintes génétiques (mise en évidence de liens de parenté, confirmation d'une paternité ...)

Des prolongements pédagogiques possibles

La diversité des problèmes légaux et éthiques posés par ces applications peut susciter un débat organisé en ECJS.

Présentation de l'activité "empreinte génétique"

Au cours de l'activité proposée avec le kit empreinte génétique, les élèves réalisent la digestion d'échantillons d'ADN par des enzymes de restriction, séparent ensuite les fragments obtenus par électrophorèse puis en étudient les résultats qui sont des empreintes génétiques des échantillons initiaux.

Ce kit permet aux élèves d'endosser le rôle de médecin légiste et de procéder à une identification positive, c'est-à-dire simuler l'utilisation de véritable ADN en tant que preuve et répondre eux-mêmes à la question « Qui est le coupable ? ».

Les élèves analysent six échantillons différents d'ADN plasmidique. Un échantillon collecté à partir d'une « scène de crime » hypothétique et cinq échantillons obtenus à partir de « suspects » seront digérés par deux enzymes de restriction. Les fragments d'ADN résultant sont séparés et visualisés dans des gels d'agarose en utilisant une solution de coloration d'ADN Fast Blast™ de Bio-Rad. En s'appuyant sur les différents types de fragments de restriction obtenus, les élèves comparent les résultats et font correspondre l'ADN de l'un des suspects avec l'échantillon collecté sur la scène du crime, ils apportent ainsi la preuve de sa culpabilité.

Nous cherchons continuellement à améliorer nos programmes et nos produits. Vos commentaires, idées et suggestions seront les bienvenus !

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

Avec nos meilleurs sentiments,

L'équipe Bio-Education

Bio-Rad division Bio-Recherche

3, bd Raymond Poincaré

92430 Marnes-la-Coquette

Sommaire

	Page
Sécurité, stockage, modalités de mise en œuvre	2
Liste de contrôle du contenu du kit (composants du kit) et accessoires nécessaires	3
Informations générales pour l'enseignant : quelques rappels sur les techniques utilisées	4 à 6
Liste de contrôle du poste de travail	7
Préparation de la séance de travaux pratiques au laboratoire	8 à 13
Mode opératoire du TP	14 à 16

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. Le port d'une blouse de laboratoire est recommandée afin d'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.

Mise en œuvre

L'activité proposée peut être abordée en quatre temps.

1^{er} temps Introduction aux empreintes génétiques

La présentation générale de la technique peut être réalisée lors de la séance précédente ou en introduction de la séance

2^{ème} temps 1^{ère} étape du TP : Digestion par les enzymes de restriction d'échantillons d'ADN

Préparation des gels d'agarose (30 minutes); digestion des échantillons d'ADN (50 minutes)

3^{ème} temps 2^{ème} étapes du TP : Électrophorèse d'échantillons d'ADN

Chargement des gels et électrophorèse (45 minutes)

Coloration des gels (coloration rapide en 20 minutes rinçages compris ou coloration en une nuit)

3^{ème} temps Analyses et interprétation des résultats

Les gels d'électrophorèse peuvent éventuellement être séchés sur une pellicule de support pour être conservés.

L'activité dans sa totalité peut être effectuée sur une seule tranche horaire de 3 heures (TP de BCPST-Véto) ou répartie sur deux séances (TP de spécialité de TS). La préparation des gels peut être faite jusqu'à une semaine à l'avance par les élèves ou par le personnel de laboratoire.

Le programme de cette activité a été développé en collaboration avec :

Len Poli et Russ Janigian
S.F. Base - Programme biotechnologie
San Francisco

Liste de contrôle de l'inventaire du kit

Composants fournis dans ce kit	Quantité par kit	(√)
1. Echantillon d'ADN Scène de crime (SC) avec tampon, lyophilisé, 60 µg	1 flacon	
2. ADN Suspect 1 (S1) avec tampon, lyophilisé, 60 µg,	1 flacon	
3. ADN Suspect 2 (S2) avec tampon, lyophilisé, 60 µg	1 flacon	
4. ADN Suspect 3 (S3) avec tampon, lyophilisé, 60 µg	1 flacon	
5. ADN Suspect 4 (S4) avec tampon, lyophilisé, 60 µg	1 flacon	
6. ADN Suspect 5 (S5) avec tampon, lyophilisé, 60 µg	1 flacon	
7. Mélange d'enzyme de restriction <i>EcoRI/PstI</i> , lyophilisé, 1,800 unités	1 flacon	
8. Eau stérilisée, 2,5 ml	1 flacon	
9. Lambda digéré avec <i>HindIII</i> (marqueur ADN), 0.2 µg/µl, 100 µl	1 flacon	
10. Tampon de charge ADN	1 flacon	
11. Colorant Fast Blast ADN, 500x, 100 ml	1 flacon	
12. Micro tubes colorés	60	
13. Micro tubes clairs	30	
14. Agarose, 5 g	1	
15. Tampon électrophorèse, TAE 50x, 100 ml	1	
16. Portoirs en mousse	16	
17. Cuves de coloration de gel	4	
Accessoires nécessaires non inclus dans ce kit	Quantité par classe	(√)
Micropipettes ajustables, 2 à 20 µl, référence catalogue n°166-0506EDU	1 à 8	
Cônes 5 racks de 200, référence catalogue n° 223-9338EDU	1	
Chambre d'électrophorèse horizontale, référence catalogue n°166-4000EDU	1 à 8	
Générateur, référence catalogue n°164-5050EDU	1 à 4	
Micropipette ajustable, 20 à 200 µl, référence catalogue n°166-0507EDU	1	
Micropipette ajustable, 100 à 1000 µl, référence catalogue n°166-0508EDU	1	
Cônes, 100 à 1000 µl, 5 racks de 200, référence catalogue n°223-9350EDU	1	
Marqueur indélébile	1	
Four à micro-ondes ou plaque chauffante	1	
Eau distillée	1	
Fiole d'Erlenmeyer 250 ml pour passer l'agarose au micro-ondes	1	
Fiole de 500 ml ou doseur pour diluer le colorant d'ADN	1	
Bac de glace avec glace	1	
Scotch à autoclave (marque Scotch 3M ou similaire non recommandée)	1	
Accessoires en option	Quantité par classe	(√)
Bain-marie à 37°C, référence catalogue n°166-0524EDU ou		
Mini four incubateur, référence catalogue n°166-0521EDU	1	
Pellicule de support de gel (50 feuilles), référence catalogue n°170-2984EDU	1	
Microcentrifugeuse, référence catalogue n°166-0612EDU		
Ou mini centrifugeuse	1	
Recharges disponibles séparément		
Colorant Fast Blast ADN, 500x, 100 ml, référence catalogue n°166-0420EDU		
Agarose de biologie moléculaire, 25 g, référence catalogue n°161-3103EDU		
Recharge du kit empreinte génétique, référence catalogue n°166-0027EDU (contient des échantillons d'ADN des scène de crime et de suspects, un mélange d'enzymes de restriction <i>EcoRI/PstI</i> , du tampon de charge, du colorant Fast Blast, des marqueur d'ADN, de l'eau stérilisée).		

Informations générales pour l'enseignant

Introduction

On demande fréquemment aux techniciens des laboratoires d'instituts médico-légaux d'effectuer un profilage d'ADN ou une « empreinte génétique » pour analyser des preuves dans le cadre d'enquêtes ou d'autres applications.

La réalisation d'empreintes génétiques peut nécessiter l'utilisation de la technique de PCR (Polymerase Chain Reaction : technique utilisée pour amplifier de petites quantités d'ADN) lorsqu'on ne dispose que de quantités infinitésimales d'ADN préalablement à la RFLP.

La technique de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism signifie polymorphisme de tailles de fragments de restriction), modélisée dans le TP réalisé, est basée sur l'existence, dans le génome humain, de régions hautement polymorphes, qui permettent de distinguer les individus sur la base de l'analyse de leur ADN génomique.

Une des étapes de l'analyse RFLP de l'Homme est une comparaison de profils de bandes d'électrophorèses sur agarose produites à partir d'échantillons d'ADN préalablement digérés par une (ou des) enzyme(s) de restriction. Avec cette technique, l'ADN de chaque individu produira un profil particulier et spécifique.

L'exercice de travaux pratiques proposé à partir du kit empreintes génétiques **modélise** l'une des techniques parmi les plus élaborées mise en œuvre sur les échantillons d'ADN complexe de l'homme.

Enzymes de restriction

Une enzyme de restriction agit comme des ciseaux moléculaires, effectuant des coupures au niveau de la séquence de paires de bases qu'elle reconnaît. 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 (site de restriction) 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 se répète sur plusieurs emplacements d'une molécule d'ADN, une enzyme de restriction effectue une coupure au niveau de 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 le site de restriction spécifique est trouvé en deux emplacements différents sur la molécule d'ADN, on obtiendra trois fragments de longueurs différentes. Si l'élément donné d'ADN est circulaire et est coupé avec une enzyme de restriction dont le site de restriction spécifique est trouvé en deux emplacements différents sur la molécule d'ADN, le résultat sera deux fragments de longueur différente. La longueur de chacun des fragments dépend de l'emplacement des sites de restriction sur la molécule d'ADN.

Lorsque des enzymes de restriction sont utilisées pour couper des brins d'ADN plasmidiques circulaires tels que des échantillons inclus dans ce kit, des fragments de dimensions variables sont produits. L'ADN qui a été coupé avec des enzymes de restriction peut être séparé et observé en utilisant une technique connue sous le nom **d'électrophorèse sur gel d'agarose**. Le terme d'électrophorèse signifie *transporté avec l'électricité*.

Électrophorèse sur gel d'agarose

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 traverse la chambre entre les électrodes situées à ses deux extrémités. 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, la vitesse à laquelle un fragment d'ADN migre à travers le gel est inversement proportionnelle 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.

Empreinte génétique ADN

Chaque personne présente des similarités et des différences dans les séquences d'ADN. Ces différences de séquences d'ADN conduisent à des différences dans les positions de certains sites de restriction, et donc dans la taille des fragments qui peuvent être obtenus après digestion enzymatique de l'ADN. La taille des fragments reflète donc les variations de l'ADN des individus. Dans les empreintes génétiques, on pourra déterminer la taille des fragments d'ADN par les positions relatives des bandes marquées dans le gel.

Les preuves nécessaires pour établir une empreinte génétique peuvent être obtenues auprès de tout matériau biologique qui contient de l'ADN : tissus corporels, fluides organiques (sang et sperme), follicules pileux, etc. L'analyse d'ADN peut même être faite à partir de matériaux séchés tels que des taches de sang ou du tissu momifié. Si un échantillon d'ADN est en trop petite quantité, il peut être amplifié en utilisant des techniques de PCR. L'ADN est ensuite traité avec des enzymes de restriction qui coupent l'ADN en fragments de différentes longueurs.

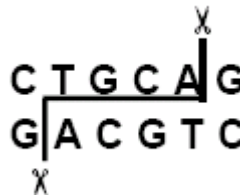
Digestion de l'ADN par des enzymes de restriction

Comme elles coupent l'ADN, les enzymes de restriction sont appelées les « ciseaux chimiques » des biologistes moléculaires. Lorsqu'une enzyme de restriction *particulière* « reconnaît » une **séquence spécifique** (appelée *site de restriction*) de quatre ou six paires de bases (pb) sur un segment d'ADN, elle coupe la molécule d'ADN au niveau de cette séquence. Les sites de restriction pour les deux enzymes les plus communément utilisées, **EcoRI** et **PstI**, sont montrées ci-dessous avec l'emplacement où l'ADN est coupé.

Pour l'enzyme **EcoRI**



Pour l'enzyme **PstI**

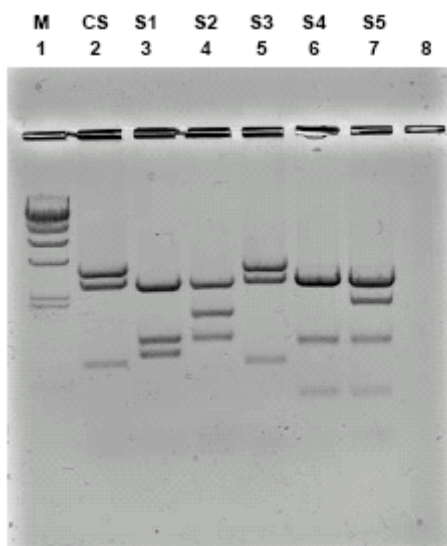


Comme toutes les enzymes, les enzymes de restriction fonctionnent le mieux dans des conditions de tampon et de température spécifiques. L'ADN a été inclus dans le tampon d'enzymes de restriction adéquat, de sorte que lorsque l'ADN réhydraté et les enzymes de restriction sont mélangés, les conditions idéales sont créées pour que les enzymes fonctionnent de manière optimale. Le tampon de réaction final se compose de 50 mM Tris, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DDT, pH 8,0, ce qui correspond aux conditions idéales pour le fonctionnement des enzymes *EcoRI* et *PstI*.

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 simultanément aux 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 profils de restriction ADN des différents échantillons d'ADN.

Le gel ci-dessous montre le profil génétique obtenu par les élèves après l'électrophorèse. L'ADN de la scène de crime a été étiqueté CS, celui du Suspect n°1, S1 etc. L'ADN de la scène de crime est placé dans la ligne 2 ; l'ADN des suspects est placé dans chacune des lignes 3, 4, 5, 6 et 7. La ligne 1 contient de l'ADN de phage lambda digéré avec *Hind*III et permet le repérage des poids moléculaires (étalonnage). Par convention, les lignes sont numérotées à partir du coin gauche supérieur. La tâche de l'élève est de regarder les profils des bandes d'ADN et de voir si les bandes des suspects coïncident avec l'ADN trouvé sur la scène de crime.



Il est facile de voir que l'ADN prélevé sur la scène du crime et l'ADN provenant de S3 sont identiques.

On peut alors discuter de la « force » ou « faiblesse » de cette preuve lors de l'accusation du suspect. La preuve apportée par l'ADN peut placer le suspect sur la scène du crime, mais d'autres preuves peuvent être nécessaires pour prouver qu'il est coupable ! On peut préciser aux élèves qu'il s'agit d'une simulation. Dans le cas d'une identification génétique réelle, les techniciens analysent des segments d'ADN nettement plus importants et de nombreuses autres bandes et lignes sont produites.

Fiabilité des preuves apportées par l'ADN

La fiabilité des technologies d'identification génétique en médecine légale dépend de la génétique de la population. Les statistiques génétiques permettent d'apprécier cette fiabilité.

Chez les humains, il y a des milliers de segments d'ADN ou sites RFLP qui peuvent être sélectionnés et utilisés pour l'analyse d'identification génétique. En fonction des facteurs démographiques tels que l'ethnicité ou l'isolation géographique, certains segments montreront plus de variations que d'autres.

Le degré de variation affecte la probabilité pour deux individus de posséder la même séquence. Si 90% d'une population donnée a le même profil génétique pour un certain segment d'ADN, on obtiendra très peu d'informations. Mais si les fréquences des différents profils d'ADN que l'on trouve dans une population pour un segment particulier sont extrêmement faibles, ce segment peut servir d'outil puissant pour discriminer les individus dans cette population.

Par conséquent, lors de l'analyse de la fiabilité de la preuve ADN, on doit se poser la question suivante :

« Statistiquement, combien de personnes peuvent avoir le même profil que celui prélevé sur une scène de crime : 1 sur 1 000 000 ? 1 sur 10 000 ? ou 1 sur 10 ? »

Liste de contrôle des postes de travail

Postes de travail des élèves. Matériel à placer sur chaque poste de travail avant de commencer chacune des deux étapes des travaux pratiques

Les composants fournis dans ce kit sont suffisants pour 8 postes de travail (4 élèves par poste).

Poste de travail de l'enseignant (Commun) : Matériel à placer sur un emplacement commun, accessible à tous les groupes d'élèves

Remarque : Pour éviter les risques de contamination et de renversements, on peut également choisir de répartir les solutions de base d'ADN et d'enzymes à la place des élèves.

Etape 1 du TP : Digestion par les enzymes de restriction des échantillons d'ADN

Poste de travail de l'élève	Quantité par poste	(√)
Système d'électrophorèse sur gel d'agarose (chambre d'électrophorèse, plateau, peigne à 8 puits)	1	
Mélange d'enzymes <i>EcoRI/PstI</i>	1 tube (80 µl)	
Cônes, 2 à 200 µl	15 cônes	
Micropipette, 2 à 20 µl	1	
Microtubes colorés : vert, bleu, orange, violet, rouge, jaune	1	
Marqueur indélébile	1	
Conteneur de déchets	1	
Portoir en mousse	1	
Scotch à autoclave	1	
Poste de travail de l'enseignant		
ADN scène de crime, avec tampon, réhydraté	1 flacon	
ADN suspect 1 avec tampon, réhydraté	1 flacon	
ADN suspect 2 avec tampon, réhydraté	1 flacon	
ADN suspect 3 avec tampon, réhydraté	1 flacon	
ADN suspect 4 avec tampon, réhydraté	1 flacon	
ADN suspect 5 avec tampon, réhydraté	1 flacon	
Agarose à 1% fondu avec TAE 1x (voir Préparation)	40 à 50 ml par gel	
Bain-marie ou incubateur à 37°C (en option)	1 par classe	
Microcentrifugeuse	1 par classe	
ou minicentrifugeuse	4 par classe	

Etape 2 du TP : Électrophorèse des échantillons d'ADN

Postes de travail de l'élève	Quantité par poste	(√)
Système d'électrophorèse sur gel d'agarose	1	
Gel d'agarose	1	
Échantillons d'ADN digéré	6	
Lambda digéré avec <i>HindIII</i> (marqueur ADN)	1	
Tampon de charge d'ADN	1	
Marqueur indélébile	1	
Cône, 2 à 20 µl	13	
Micropipette, 2 à 20 µl	1	
Conteneur de déchet	1	
Pellicule de support de gel (le cas échéant)*	1	
Colorant ADN Fast Blast, 1x ou 100x*	120 ml pour 2 postes	
Conteneurs importants pour détachage (le cas échéant)*	1 à 3 pour 2 postes	
Portoir en mousse	1	
Générateur	1	
Cuve pour coloration de gel	1 pour 2 postes	
Tampon d'électrophorèse (TAE 1x)	275 ml gel par station	
Poste de travail de l'enseignant		
Microcentrifugeuse	1	
or mini centrifugeuse (en option)	4	
Plate-forme basculante (en option)	1	

Préparation de la séance de TP au laboratoire

Cette section décrit la préparation que l'on doit faire avant chaque TP. À chaque section est jointe une estimation du temps de préparation.

Etape N°1 du TP : Digestion par les enzymes de restriction des échantillons d'ADN

Préparation

Objectifs : Réhydrater les échantillons d'ADN/tampon et les enzymes de restriction
Distribuer les enzymes de restriction
Couler les gels d'agarose. **Si vous préférez que les élèves coulent leurs propres gels durant le TP, préparer l'agarose à l'avance. S'il est préparé à l'avance, l'agarose dissous doit être conservé dans un bain-marie réglé à 50 à 55°C jusqu'à ce que le gel soit coulé.**
Régler la température du bain-marie ou de l'incubateur à 37°C .
Préparer les postes de travail de l'enseignant et des élèves.

Temps nécessaire : 30 minutes à 1 heure selon que vous choisissiez de préparer les gels d'agarose ou non.

Matériel nécessaire : Chambre d'électrophorèse, plateau et peignes
Tampon d'électrophorèse (TAE 50x)
Poudre d'agarose
8 microtubes clairs
3 litres d'eau distillée.

Procédures

Remarque : tous les flacons d'enzymes et d'ADN doivent contenir un résidu blanc qui peut apparaître comme de la poudre libre dans les flacons d'ADN. Les échantillons d'ADN lyophilisés ont des étiquettes à codage couleur sur les flacons en verre clair. Le mélange d'enzymes *EcoRI/PstI* lyophilisé se trouve dans un flacon ambre.

1. Réhydrater les échantillons d'ADN

Pour réhydrater les échantillons d'ADN/tampon, ajouter 200 µl d'eau stérilisée à chaque flacon d'ADN lyophilisé et agiter pour remettre en suspension. Laisser les échantillons d'ADN/tampon se réhydrater à température ambiante pendant 5 minutes ou jusqu'à ce qu'il soit dissout. Chauffer délicatement à 37°C pendant 10 minutes si besoin. Vous pouvez choisir de distribuer 10 µl de chaque échantillon d'ADN/tampon réhydraté dans les microtubes étiquetés, de 1,5 ml et codés par couleur : vert = scène de crime, bleu = suspect 1, orange = suspect 2, violet = suspect 3, rouge = suspect 4, jaune = suspect 5.

Les échantillons d'ADN réhydratés sont désormais à une concentration de 0,3 µg/µl dans 100 mM Tris, 200 mM NaCl, 20 mM MgCl₂, 2 mM DTT, pH 8,0. Une fois que l'ADN en tampon est ajouté à l'enzyme, la concentration finale sera de 50 mM Tris, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, pH 8,0, qui est la condition idéale pour le fonctionnement des enzymes *EcoRI* et *PstI*.

2. **Réhydrater le mélange d'enzymes lyophilisées *EcoRI/PstI*.** Pour réhydrater le mélange d'enzymes *EcoRI/PstI*, ajouter 750 µl d'eau stérile et agiter pour remettre en suspension les enzymes puis placer sur de la glace pendant 5 minutes. Il est important que le mélange d'enzymes soit maintenu **sur de la glace** mais non gelé une fois qu'il a été réhydraté. **Les enzymes réhydratées doivent être utilisées dans les 12 heures.**

3. **Distribuer le mélange d'enzymes.** Transférer 80 µl de mélange d'enzyme réhydraté dans chacun des huit microtubes de 1,5 ml étiquetés **ENZ**.

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 dépôt d'échantillons et la manutention du gel. **Pour préparer les gels d'agarose, bien utiliser un tampon électrophorèse et non pas de l'eau.**

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 en 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 de l'agarose.** Celle-ci peut être réalisée 1 à 2 jours à l'avance au laboratoire ou pendant la séance par chaque groupe d'élèves.

I. Pour obtenir une solution d'agarose à 1%, utiliser 1 gramme d'agarose pour 100 ml de tampon électrophorèse TAE 1x. Bien vérifier que vous utilisez le tampon électrophorèse et non de l'eau.

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 four à micro-ondes. **DESSERRER LE BOUCHON SI VOUS UTILISEZ UNE BOUTEILLE.** Utiliser une puissance moyenne et programmer 3 minutes de chauffage. Arrêter le micro-ondes toutes les 30 secondes et agiter la fiole pour mettre en suspension 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 à 55 à 60°C avant de verser.

* On peut se procurer auprès de Bio-Rad des gels pré-coulés 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.

Méthode avec 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 à 55 à 60°C avant de verser.

c. Procédure pour couler le gel

Cette activité de travaux pratiques exige que chaque gel ait au moins 7 puits. Suivre les instructions ci-dessus pour préparer l'agarose après avoir déterminé quel volume d'agarose à 1% sera nécessaire pour l'ensemble des groupes. Verser suffisamment d'agarose pour couvrir de gel les dents du peigne 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 ruban 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 pailleuse 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 moins de 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 dans un 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 suite du TP, 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 suite du TP, 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 45 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 d'aborder le TP, 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 du mode d'utilisation des micro pipettes :

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.

Etape N°2 du TP : électrophorèse sur gel d'agarose et visualisation des fragments d'ADN

Préparation

Objectifs Préparer l'ADN lambda digéré avec *HindIII* (marqueur d'ADN) et distribuer (en option)
Distribuer un échantillon de 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 *HindIII* (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 les microtubes clairs avec un « M ». Distribuer 15 µl de marqueurs d'ADN contenant le tampon de charge pour 8 micro tubes clairs étiquetés « M ».
- 2. Distribuer le tampon de charge.** Étiqueter huit microtubes propres « TC » pour déposer le colorant et distribuer 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.
 - 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.
 - Préparer le volume requis de tampon TAE 1x si vous ne l'avez pas déjà préparé.
 - Plonger le gel dans environ 2 mm de tampon TAE 1x.
 - 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. De plus faites bien attention à lire les documentations fournies avec vos cuves à électrophorèse. Certaines cuves fonctionnent en gel immergé alors que d'autres fonctionnent en gel non immergé. Seul votre fournisseur de cuve peut vous renseigner à ce sujet. Si vous ne respectez pas les règles de mise en œuvre votre alimentation disjonctera.

- 4. Préparer le colorant ADN Fast Blast**
 - 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 dimension appropriée et mélanger. Couvrir la fiole et la stocker à température ambiante jusqu'à ce qu'elle soit prête à être utilisée.
 - 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 dimension appropriée 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 profils 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 une blouse de laboratoire 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 :

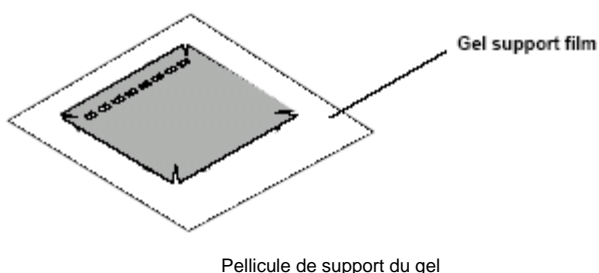
- Nous vous recommandons l'utilisation de 120 ml de Fast Blast dilué pour colorer deux gels d'agarose 7 x 7 cm ou 7 x 10 cm dans des cuves de coloration individuelles fournies avec le kit (vous pouvez pratiquer des encoches aux coins du gel pour en faciliter l'identification). Si vous utilisez d'autres 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 durant une 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 pour 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 du kit d'empreinte génétique

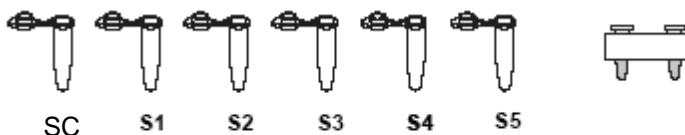
Etape 1 du TP : Digestion par enzyme de restriction

1. Placer le tube contenant le mélange d'enzymes de restriction, étiqueté ENZ, sur de la glace.



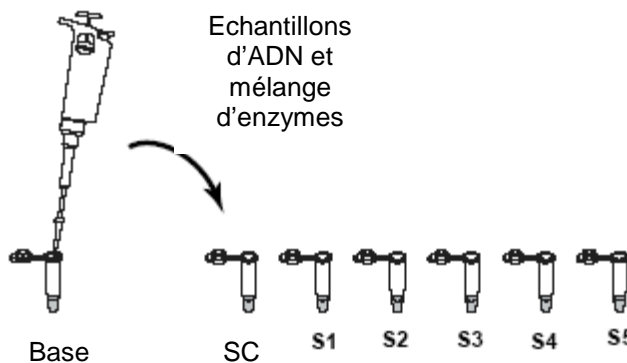
2. Étiqueter chaque tube coloré comme suit :

tube vert **SC** (scène de crime)
tube bleu **S1** (suspect 1)
tube orange **S2** = suspect 2
tube violet **S3** = suspect 3
tube rouge **S4** = suspect 4
tube jaune **S5** = suspect 5



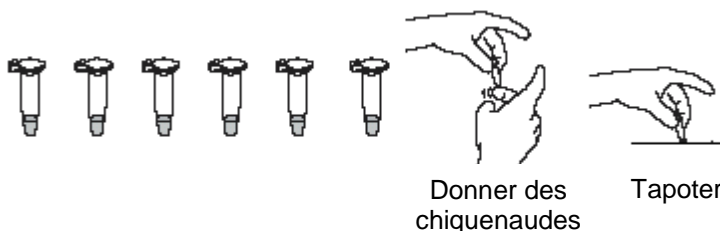
Étiqueter les tubes avec votre nom et la date et l'heure du TP. Placer les tubes dans le portoir.

3. En utilisant un nouveau cône pour chaque échantillon, pipeter 10 µl de chaque échantillon d'ADN à partir des tubes de base et transférer dans les tubes correspondant. S'assurer que l'échantillon est transféré vers le fond de tubes.

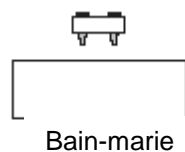


4. Pipeter 10 µl de mélange d'enzyme (ENZ) tout à fait au fond de chaque tube. Utiliser un nouveau cône pour transférer l'échantillon ENZ dans chaque tube.

5. Bien fermer les tubes et mélanger les composants en donnant des chiquenaudes délicates. Si vous disposez d'une microcentrifugeuse centrifuger avec des impulsions pour collecter la totalité du liquide dans le fond du tube. Sinon tapoter délicatement le tube sur la table.



6. Place les tubes dans le portoir en mousse faire incuber pendant 45 min à 37°C ou à température ambiante toute la nuit dans une quantité importante d'eau chauffée à 37°C.



7. Après incubation retirer les tubes du bain marie et les placer au réfrigérateur jusqu'au prochain TP. S'il reste suffisamment de temps pour continuer, passer directement au 2 de la deuxième étape du TP



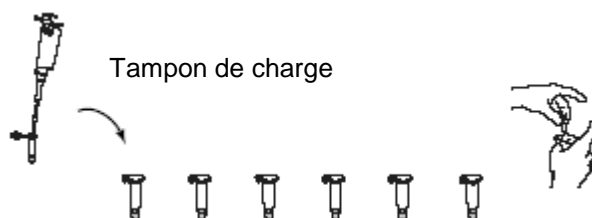
Etape 2 du TP : Électrophorèse sur gel d'agarose

1. Retirer les échantillons digérés d'ADN du réfrigérateur (le cas échéant).

2. Si vous disposez d'une centrifugeuse, faire tourner avec impulsion les tubes dans la centrifugeuse pour amener tout le liquide dans le fond du tube ou tapez délicatement sur le haut du tube.

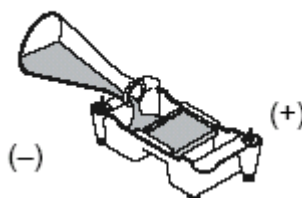


3. En utilisant un cône séparé pour chaque échantillon, ajouter 5 µl de tampon de charge « TC » dans chaque tube. Boucher le tube et mélanger en donnant des chiquenaudes délicates sur les tubes. Rassembler l'échantillon dans le premier tube en le tapant délicatement sur la table ou en le passant à la centrifugeuse.



4. Retirer le gel d'agarose du réfrigérateur (le cas échéant) et le retirer de l'emballage en plastique.

5. Placer un gel d'agarose dans l'appareil d'électrophorèse. Remplir la chambre d'électrophorèse avec un tampon TAE 1x pour couvrir le gel en utilisant environ 275 ml de tampon.



6. Vérifier que les puits des gels d'agarose sont proches de l'électrode noire (-) et que le bord inférieur du gel est proche de l'électrode rouge (+).

7. En utilisant un cône séparé pour chaque échantillon, déposer le volume pour chaque échantillon dans 7 puits, en suivant l'ordre suivant

Ligne 1: **M**, marqueur de taille d'ADN, 10 µl

Ligne 2: **SC**, vert 20 µl

Ligne 3 : **S1**, bleu 20 µl

Ligne 4 : **S2**, orange, 20 µl

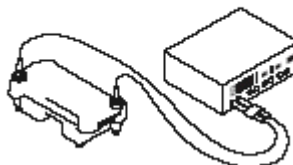
Ligne 5 : **S3** violet, 20 µl

Ligne 6 : **S4**, rouge 20 µl

Ligne 7 : **S5** jaune 20µl



8. Placer délicatement le couvercle sur la chambre d'électrophorèse. Le couvercle s'attachera à la base dans un seul sens. Les fiches rouges et noires du couvercle correspondent aux fiches rouges et noires de la base. Brancher les électrodes dans l'alimentation, rouge dans rouge et noir dans noir.



9. Mettre sous tension et procéder à l'électrophorèse de vos échantillons à 100 V pendant 30 minutes.

Visualisation des fragments d'ADN

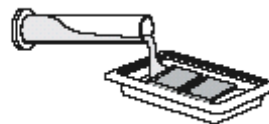
1. Lorsque l'électrophorèse se termine, couper l'alimentation et retirer le haut de la chambre. Retirer délicatement le gel et le plateau de la chambre. Faire attention, le gel est très glissant. Faire glisser le gel dans la cuve pour coloration.



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 pour 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.

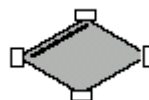


d. Décolorer en lavant deux fois dans de l'eau du robinet chaude pendant 5 minutes en secouant légèrement pour obtenir de meilleurs résultats.

e. Consigner les résultats.

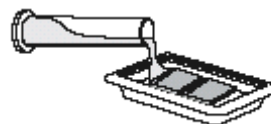
f. Découper et mettre au rebut toutes les lignes non chargées.

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 pour 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.

