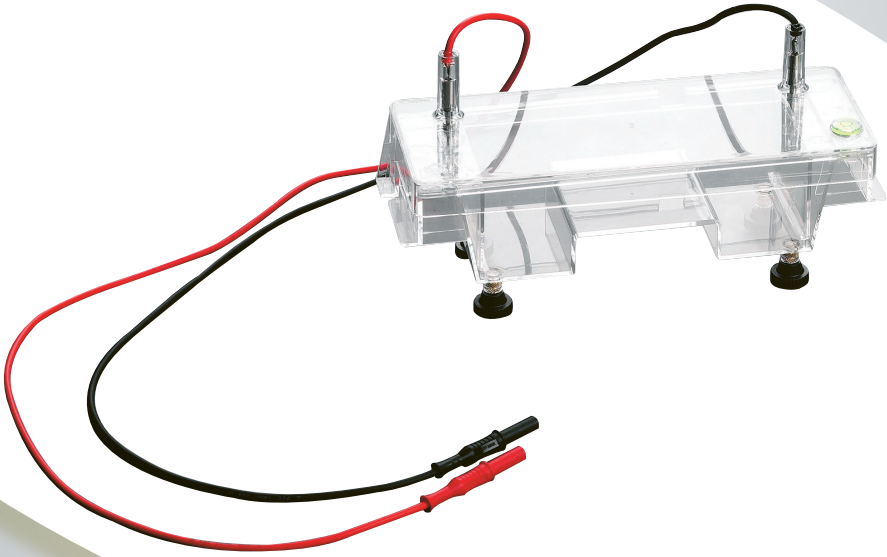
Cuve Électrophorèse ADN et Protéines 13386

NOTICE



Retrouvez l'ensemble de nos gammes sur : www.pierron.fr

PIERRON
ÉQUIPEMENT PÉDAGOGIQUE SCIENTIFIQUE

PIERRON - ASCO & CELDA • CS 80609 RÉMELFING • 57206 SARREGUEMINES Cedex France
Tél. : 03 87 95 14 77 • **Fax :** 03 87 98 45 91
E-mail : education-france@pierron.fr

Finalité du produit

La méthode habituellement utilisée pour caractériser l'ADN est l'électrophorèse sur gel d'agarose.

L'agarose est un galactane iolé à partir d'agar qui est extrait d'algues marines. Il se présente sous forme d'une poudre jaunâtre. Il peut être mis en solution e milieu aqueux par chauffage à 95-100°C. En refroidissant, il forme un gel qui peut être utilisé pour l'analyse d'ADN.

La mobilité des acides nucléiques dans un gel d'agarose dépend de la concentration en agarose, de la taille et de la forme de la molécule d'ADN. En général, plus la concentration en agarose est faible, plus la taille des molécules à analyser peut être grande. Cependant on arrive à une limite en concentration d'agarose (0,2 à 0,3 %) car les gels formés deviennent très fragiles. Habituellement, on utilise des gels dont la concentration en agarose va de 0,7 à 1 %. Le gel est placé horizontalement dans une cuve à électrophorèse reliée à un générateur de courant continu. Sous l'effet du champ électrique, les acides nucléiques chargés négativement au pH utilisé (pH 8) se déplacent dans le gel à une vitesse qui est inversement proportionnelle à leur poids moléculaire. Après électrophorèse, les ADN et les ARN peuvent être visualisés dans le gel grâce à un colorant spécifique qui se fixe aux acides nucléiques.

La technique est simple et rapide à mettre en oeuvre. Elle permet par exemple, de vérifier l'intégrité et la pureté de l'ADN (absence d'ARN), de séparer des fragments d'ADN entre eux et de les purifier.

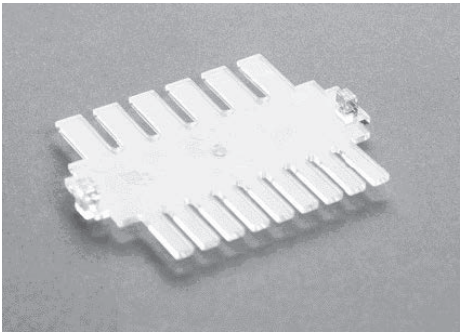
Le protocole proposé permet d'analyser sur gel d'agarose l'ADN préparé à l'aide du kit MT15807 ou acheté dans le commerce (ADN de thymus de veau par exemple).

Composition :

Matériel pour la préparation du gel (livré avec la cuve)

Il comprend :

- une boîte de coulage dans laquelle est coulé le gel qui est aussi un portoir à gel permettant de manipuler le gel ;
- un peigne en plastique permettant de faire 6 puits dans le gel d'un coté et 9 puits de l'autre, dans lesquels seront déposés les acides nucléiques.

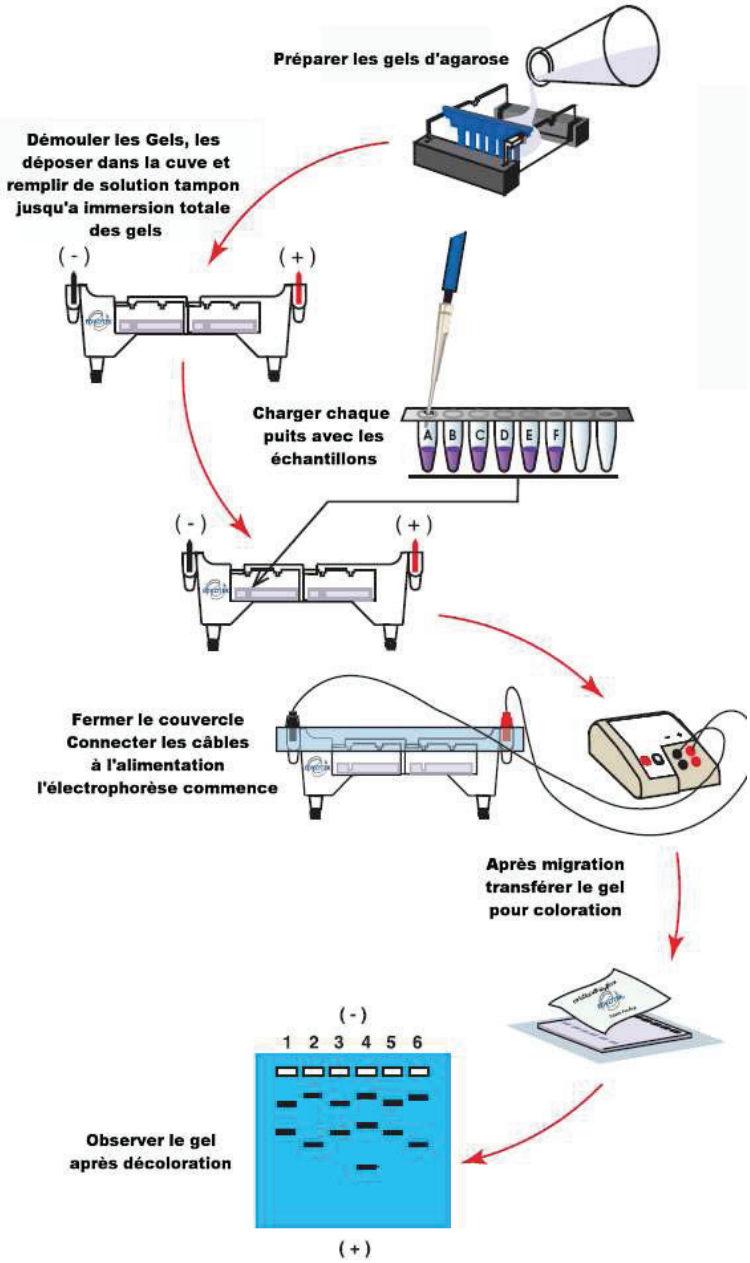


Cuve à électrophorèse ADN

Le système à électrophorèse est constitué d'une cuve et d'un couvercle en plastique transparent. La cuve est munie à chacune de ses extrémités d'une électrode pouvant être reliée a un générateur de courant continu (alimentation électrophorèse 13387).

Environnement nécessaire :

- Alimentation électrophorèse 13387
- Lot de produits pour solution tampon et gel d'Agarose réf:13914
- Tampon électrophorèse. réf:13570
- Solution de dépôt renfermant dans H_2O: 15% glycérol, 2mM EDTA, pH 8, 0,02% Bleu de Bromophénol (BB).
- Agarose en poudre
- Colorant des acides nucléiques 01262030
- Boîte pour coloration de gel réf:01626
- Feuilles de cellophane réf: 13626

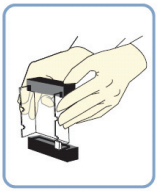

Préparer les gels d'agarose
Démouler les Gels, les déposer dans la cuve et remplir de solution tampon jusqu'a immersion totale des gels
(-)
(+)
Charger chaque puits avec les échantillons
A
B
C
D
E
F
(-)
(+)
Fermer le couvercle
Connecter les câbles à l'alimentation
l'électrophorèse commence
Après migration transférer le gel pour coloration
(-)
1 2 3 4 5 6
Observer le gel après décoloration
(+)

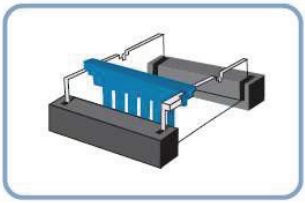
Sécurité au laboratoire

1. Portez toujours des gants et des lunettes de protection
2. Attention aux EPI que vous utilisez à proximité de la chaleur.
3. **NE JAMAIS PIPETTER A LA BOUCHE**
4. Faites extrêmement attention lorsque vous utilisez des appareils électriques.
5. Toujours bien se laver les mains après avoir manipulé du matériel biologique.

PRÉPARATION DU GEL D'AGAROSE

1. Fermez les cotés libres du bâti a l'aide de pièces en caoutchouc ou de ruban adhésif.





2. Placez le gabarit dans la première série d'encoches au bout du lit. Assurez-vous du bon maintient du gabarit et qu'il repose bien au fond.

3. Pour préparer la solution utilisez un Erlenmeyer ou un bécher de 250mL. Introduire les composants dans l'Erlenmeyer en suivant les proportions indiquées dans le tableau 1.

Tableau A / Gel d'agarose à 0.8%

Dimensions Moule (cm)	Qté d'agarose (g)	Qté de tampon Conc. (10x) (ml)	Eau distillée (ml)	Volume total
7 x 7	0.24	3	27	30

Vu les petites quantité pour un gel, il est préférable de préparer plusieurs gels en même temps.

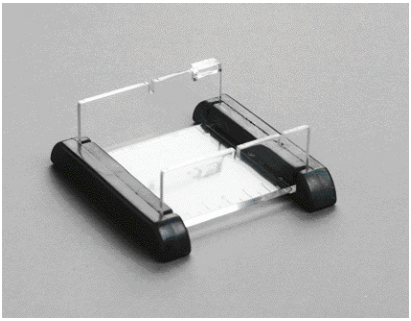
4. Mélangez la mixture pour dissoudre les blocs de poudre d'agarose.
5. Avec un feutre, marquez le niveau de la solution sur l'Erlenmeyer.
6. Chauffez la solution pour bien dissoudre toute la poudre. Au final , la solution doit être claire, sans particules en suspension.

A. Avec un micro-ondes.

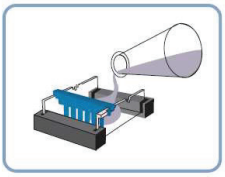
- Bouchez l'Erlenmeyer avec un film plastique pour minimiser l'évaporation.
- Chauffez la solution pendant 1 minute a puissance maximale.
- Mélangez la solution et remettez là au four par périodes de 25s jusqu'à dissolution complète.

B. Avec une plaque chauffante

- Bouchez l'Erlenmeyer avec du papier aluminium pour éviter l'évaporation.
- Chauffez jusqu'à ébullition en agitant occasionnellement. Continuez jusqu'à ce que l'agarose soit totalement dissoute.



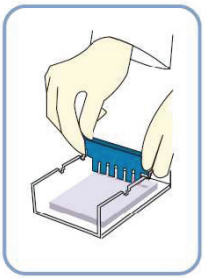
7. Refroidissez la solution jusqu'à 55°C en agitant précautionneusement, pour favoriser la dissipation de la chaleur. Si vous remarquez une éventuelle évaporation, ajoutez de l'eau distillée jusqu'au trait de niveau que vous avez fait a l'étape 5.



Après que le gel soit refroidi à 55°C.

- **Si vous avez utilisé les pièces en caoutchouc, allez directement a l'étape 9.**
- **Sinon continuez dans l'ordre.**

8. A l'aide d'une pipette compte goutte, formez un joint avec de l'agarose froide entre le ruban adhésif et le bâti. Attendez 1 minute que l'agarose se solidifie.
9. Versez la solution refroidie dans le bâti. Assurez vous que le bâti est de niveau.
10. Attendez la solidification totale du gel. Il deviendra ferme et froid au toucher après 20 minutes environ.



11. Après que le gel soit devenu solide, enlevez doucement et précautionneusement les pièces de caoutchouc ou le ruban adhésif.

Soyez attentifs a ne pas le gel en enlevant les blocs de caoutchouc. Prenez une petite spatule et passez la entre le gel et le bloc pour supprimer les éventuelles tensions de surface.

12. Retirez le gabarit en tirant doucement vers le haut. Faites cette manipulation soigneusement en évitant de déchirer les puits.
13. Placez le bâti avec le gel dans la cuve d'électrophorèse en vous assurant de la bonne orientation et de la mise a niveau du bâti dans la chambre.
14. Remplissez la cuve de l'appareil à électrophorèse avec le volume nécessaire de solution tampon 250 ml dans le cas de notre cuve.
15. Vérifiez l'immersion totale du gel dans la solution tampon.
16. Procédez a la mise en place des échantillons et a l'électrophorèse.

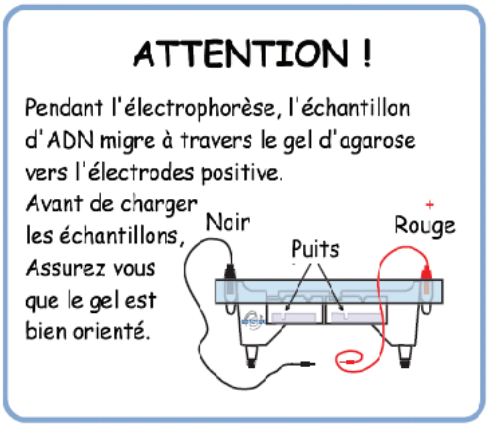
CHARGEMENT DU GEL

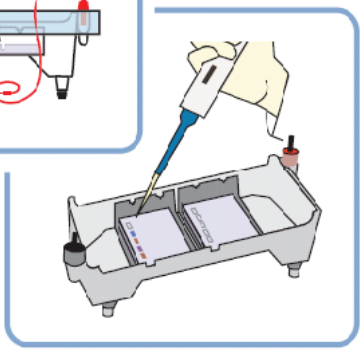
Une bonne technique de positionnement des échantillons assure d'avoir les meilleurs résultats possibles. Une mauvaise manipulation peut endommager l'échantillon en le diluant dans la solution tampon.

Si vous n'êtes pas habitués a faire cette manipulation. Il est recommandé de vous entraîner avant de le faire avec les échantillons réels.

1. Placez les échantillons dans les puits en faisant attention à ne pas rompre les puits avec le bout de la pipette.
2. Remplacez le gel d'entraînement par un gel neuf pour réaliser l'expérience.

Si vous avez utilisé le gel d'entraînement dans la cuve d'électrophorèse, l'échantillon factice sera dilué dans la solution tampon contenue dans la cuve. Une petite quantité de ce gel n'interfère en rien sur l'expérience, il est donc inutile de changer la solution tampon.

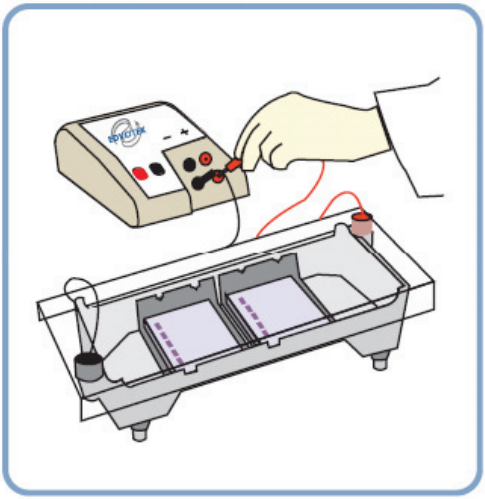




RÉALISATION DE L'ÉLECTROPHORÈSE

1. Après que les échantillons ont été déposés, fermer et connecter délicatement la cuve.

- **Assurez vous que les borne + et – sont correctement orientée.**



2. Connecter la borne noire de la cuve sur l'alimentation (noir sur noir), Connecter la borne rouge de la cuve sur l'alimentation (rouge sur rouge),
3. Mettre en route l'alimentation à la bonne tension et pour une durée déterminée. 100V pour l'ADN et 160V pour la migration des proteines,
4. Vérifier que le courant passe normalement (des bulles doivent se former autour des électrodes).
5. Une fois l'électrophorèse terminée, débrancher l'alimentation et ouvrir la cuve.
6. Enlever les gel pour coloration. Et analyse

GUIDE DE L'INSTRUCTEUR.

La taille de la classe, la longueur de la séance, et la disponibilité des équipements sont des facteurs qui doivent être pris en considération pour programmer l'exécution de cette expérience avec vos élèves. Ce guide peut être adapté à vos besoins spécifiques.

NORMES NATIONALES DE CONTENU ET DE COMPÉTENCES.

En réalisant cette expérience, les élèves vont apprendre à charger les échantillons et a réaliser une électrophorèse sur plaque de gel d'agarose. L'analyse de l'expérience va permettre aux élèves de transformer un concept abstrait en une explication concrète. Visitez notre site web pour de plus amples informations sur les contenus des expériences et les normes nationales.

RESSOURCES ÉDUCATIVES.

Conseils sur l'électrophorèse et FAQ

Les expériences électrophorèse sont simples a réaliser et assurent des chances de succès maximum en classe. Cependant, même les élevées les plus expérimentés peuvent commettre des erreurs ou de mauvaises manipulations.

PRÉPARATION DES GELS POUR L'ÉLECTROPHORÈSE

Il y a plusieurs options pour la préparation des gels pour une expérience électrophorétique.

Moulage individuel.

- Chaque groupe d'élèves moule son propre gel pour réaliser son expérience.

Préparation groupée.

- Une grande plaque de gel peut être préparée pour être ensuite partagée entre toute la classe, pour gagner du temps. Voir les instructions pour le moulage d'un tel gel.

Préparation a l'avance.

- Les gels doivent être préparés et stockés pour être utilisés plus tard. Les gels solidifiés peuvent être stockés dans du tampon au réfrigérateur pendant 2 semaines.

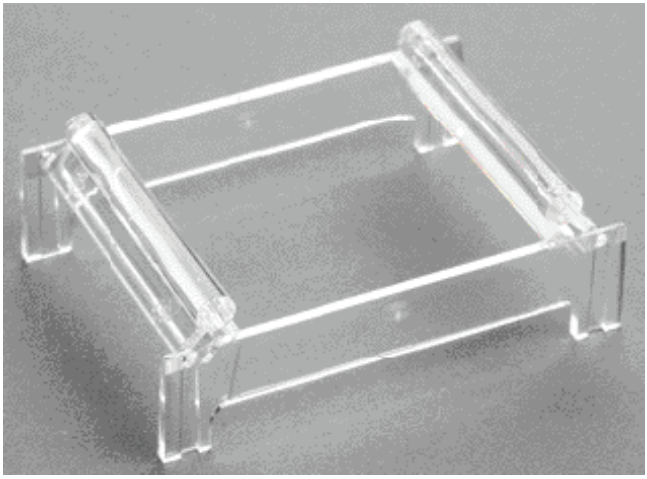
Ne pas stocker à –20°C. La congélation détruira le gel

- Les gels qui ont étés enlevés de leurs supports pour être stockés, doivent être «ancrés» de nouveau sur un support, avec quelques bouts d'agarose chaude et humide avant d'être placé dans la cuve a électrophorèse. Cela empêchera le gel de glisser sur le support et dans la cuve.

- Pour l'électrophorèse des protéines, vous équiperez votre cuve de l'accessoire livré, il vous permet des disposer deux ou trois bandes d'acétate de cellulose (Réf: 13050 lot de 100 bandes) sur la largeur du support, le support est construit de telle façon que les bandes sont disposées de manière convexe et que chaque extrémité plonge dans la solution tampon.

Principe de fonctionnement.

L'éléctrophorèse est une méthode d'analyse et de séparation, basée sur la migration différentielle de particules chargées électriquement sous l'influence d'un champ électrique. Les particules chargées sont séparées par des vitesses de transport différentes.
Les protéines, molécules amphotères, ont leur charge modifiée en fonction du pH dans lequel elles se trouvent.
Placées dans un milieu basique, elles acquièrent une charge globale négative et migrent de la cathode (pôle -) vers l'anode (pôle +).
Les protéines se déplaçant dans le gel sous l'influence du champ électrique, la migration est arrêtée dès que la séparation est suffisante.
On effectue alors une fixation par un colorant.



PIERRON
ÉQUIPEMENT PÉDAGOGIQUE SCIENTIFIQUE

PIERRON - ASCO & CELDA • CS 80609 RÉMELFING •
57206 SARREGUEMINES Cedex France
Tél. : 03 87 95 14 77
Fax : 03 87 98 45 91
E-mail : education-france@pierron.fr