

## NOTICE TECHNIQUE

### Kit de préparation

### de gel d'agarose



Réf. : DT-06

Conception, réalisation, production :  
École de l'ADN - 30015 Nîmes, [www.ecole-adn.fr](http://www.ecole-adn.fr)

Édition :  
APBG - 69356 Lyon, [www.apbg.org](http://www.apbg.org)

Produit français, fabriqué à Nîmes (Gard) conforme à la réglementation européenne.

Rédaction oct 2013, version 1309-RL

## 1- PRESENTATION

### 1-1 Principe

L'analyse des fragments d'ADN en fonction de leur taille est un procédé usuel en biologie moléculaire. Cette méthode repose sur une technique électrophorétique qui peut s'utiliser sur différents supports. L'électrophorèse est une méthode de séparation de particules chargées électriquement par migration différentielle sous l'action d'un champ électrique. Elle se réalise sur des supports gélatineux, de type acrylamide, agarose ou semi solide de type capillaire. Le gel d'acrylamide ou l'électrophorèse capillaire, méthodes délicates et onéreuses, permettent d'analyser des fragments d'ADN de très petites tailles et donnent la possibilité d'une résolution de l'ordre de la paire de base. L'agarose, qui est un polysaccharide extrait d'une algue, la *Rhodophyceae*, permet d'analyser de manière très simple des fragments d'ADN d'une centaine à quelques dizaines de milliers de nucléotides, obtenus après hydrolyse par des endonucléases de restriction ou amplifiés par PCR.

Ce kit propose les réactifs nécessaires à la fabrication d'un gel d'agarose, ainsi qu'à la coloration des fragments d'ADN.

Dans ce kit sont fournis l'agarose, le tampon TBE en poudre et l'Azure A concentré.

### 1-2 Méthodologie

Il s'agit de réactifs complémentaires destinés aux enseignants ou aux techniciens de laboratoire, mais l'utilisation peut être aussi étendue aux élèves.

La réalisation d'un gel d'agarose est une application concrète d'un processus de biotechnologie et concourt à une orientation positive vers des études scientifiques, en particulier dans le domaine des sciences de la vie.

## 2- PRESENTATION DU KIT

Ce kit présente des réactifs qui permettent de réaliser 1 litre de gel à 1% d'agarose, la solution de TBE pour la migration ainsi que le colorant Azure A concentré.

### 2-1 Constitution du kit

- 1 flacon de 10 g d'Agarose;
- 1 bouteille de TBE 10 X en poudre à reconstituer avec 200 ml d'eau distillée;
- 5 x 1ml de solution d'Azure A à diluer 100 fois dans une solution à 20° d'éthanol.

### 2-2 Caractéristiques et conseils d'utilisation des réactifs

L'agarose est à dissoudre à la concentration souhaitée selon le protocole ci-après. Le TBE doit être reconstitué, la solution d'Azure A est à diluer dans de l'eau distillée.

Tous ces réactifs se conservent exclusivement à température ambiante. Ne pas congeler.  
Dans tous les cas se référer aux spécifications de stockage mentionnées sur l'étiquette.

## 3- PROTOCOLE

### 3-1 Matériels complémentaires nécessaires au laboratoire:

- Éprouvette, cristalliseur, erlenmeyer;
- Balance;
- plaque chauffante, ou micro-onde ;
- Cuve d'électrophorèse ;
- Plaque de moulage pour gel.

### 3-2 Consommables

- Pas de consommables spécifiques

### 3-3 Réactifs complémentaires non fournis

- Eau distillée ;

### 3-4 Opérations préalables avant la préparation du gel:

- **Stérilisation du matériel et des réactifs**  
Aucune stérilisation ni préparation de matériel spécifique.

- **Préparation des solutions:**

Flacon de TBE 10 X :  
Ajouter 200ml d'eau distillée, homogénéiser et laisser stabiliser 30 minutes à température ambiante.  
À partir de cette solution réaliser une dilution au 1/10° afin d'obtenir une solution 1 X.

Exemple :  
Pour obtenir 500 ml de TBE 1 X :  
À l'aide d'une éprouvette mesurer 50 ml de solution TBE 10 X ;  
Compléter à 500 ml avec de l'eau distillée ;  
Homogénéiser l'ensemble ;  
La solution 1 X est prête à l'emploi.

## 4- PREPARATION DU GEL D'AGAROSE

### 4-1 Protocole

Note : les réactifs sont fournis de sorte à réaliser 1 litre de gel à 1%, il est important de se référer à la méthode utilisée pour ajuster la concentration du gel.

Ici l'exemple choisi correspond à une analyse des fragments du Kit Empreintes et diagnostic génétique, DNATOOLS DT-03.

Choix de la concentration du gel en % (c'est un pourcentage massique pour un volume donné).

Dans cette expérience le gel doit être à 1 % d'agarose.

Méthode de calcul :  
masse à peser (m en gramme), pour un volume (v en ml) :  
 **$m = v \times \text{pourcentage} / 100$**

Exemple de calcul :  
gel à 1 % pour un volume de 100 ml  
 **$100 \times 1 / 100 = 1 \text{ g à peser}$**

- Peser précisément (+/- 0,1g) sur la balance la masse d'agarose dans un erlenmeyer taré ;
- Préparer une solution de TBE à 1 X à partir de la solution fournie;
- Mesurer le volume de TBE 1 X dans une éprouvette (+/- une demi-graduation);
- Ajouter le TBE 1 X à l'agarose et chauffer (micro-onde ou plaque chauffante) de sorte à dissoudre totalement l'agarose ;

- Verser le gel dans les plaques de moulage.

- Attendre 30 minutes à température ambiante la solidification du gel.

### 4-2 Coloration et décoloration du gel

#### Coloration à l'Azure A

Préparation de la solution d'Azure A :

Ajouter 1 ml de solution Azure A fournie pour 100 ml d'éthanol à 20°, homogénéiser et laisser reposer. Vous avez une solution d'Azure A prête à l'emploi.

Après la migration, sortir le gel et le traiter comme indiqué :

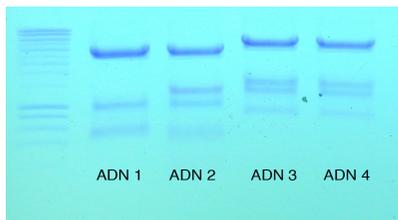
- Coloration de l'ADN : Plonger le gel pendant 6 min dans la solution d'Azure A préparée. Récupérer la solution et la stocker à 4°C, elle est réutilisable une dizaine de fois.

- Décoloration du gel : Après l'incubation de coloration, placer le gel dans un bac, puis le rincer à l'eau froide du robinet, en agitant doucement le gel et en renouvelant l'eau du bac régulièrement. Le résultat est visible au bout de vingt minutes de décoloration. Pour une lecture plus nette, décolorer le gel vingt minutes supplémentaires, puis le déposer au réfrigérateur emballé dans un film plastique. La coloration y sera ainsi optimale au bout de quelques heures, et se maintiendra une semaine minimum.

## EXEMPLE DE RESULTATS

Photos de gels après coloration et décoloration :

Réf. : DT-03 diagnostic de pathologie



## 5- CONSIGNES DE SECURITE

Les réactifs qui constituent ce kit pédagogique ne présentent aucun caractère dangereux, toxique ou pathogène. La fiche de sécurité MSDS est disponible, sur simple demande, auprès de l'École de l'ADN.

Dans le cadre d'une manipulation réalisée par les élèves, il est néanmoins important de les sensibiliser sur les risques encourus lors des manipulations :

Mesures d'hygiène : se laver les mains avant et après l'expérimentation ;  
Se référer aux mesures de sécurité d'utilisation des appareils électriques et matériels. Utiliser les précautions d'usage pour toutes manipulations de produits dangereux ou toxiques. En cas d'ingestion informez le médecin responsable ou contactez le centre antipoison le plus proche.

### Contact commande

APBG - B.P. 8337  
69356 Lyon cedex 08  
tel 04 78 74 47 22  
fax 04 78 01 22 14  
[apbg@wanadoo.fr](mailto:apbg@wanadoo.fr)  
[www.apbg.org](http://www.apbg.org)

### Informations Renseignements

Ecole de l'ADN  
19, Grand Rue  
BP 81295  
F-30015 Nîmes Cedex 1  
Tel/fax : +33 (0) 466 67 82 29  
E-mail : [patrice@ecole-adn.fr](mailto:patrice@ecole-adn.fr)  
[www.ecole-adn.fr](http://www.ecole-adn.fr)

DNATOOLS est une marque  
déposée par l'école de l'ADN

Action soutenue par

**ThermoFisher**  
SCIENTIFIC

