****

**Protocole 10.2 : Préparation d’un gel d’agarose**

**Objectif** **:** Préparer un gel d'agarose pour l'électrophorèse

**But** **:** L'électrophorèse sur gel est une méthode courante de séparation des fragments d'ADN selon leur taille. Le gel est préparé à l'aide d’un polymère d'agarose acheté sous forme de poudre, mis en suspension dans un tampon liquide et fondu avant utilisation. La concentration d'agarose nécessaire dans votre gel dépend de la taille des fragments d'ADN que vous souhaitez séparer. En règle générale, les gels d'agarose sont préparés à des concentrations de 0.7% à 2%.

**Matériel requis** **:**

* Agarose
* Tampon de migration TBE 1X (TBE = 0.089 M d'acide borique, 0.002 M d’EDTA)
* Solution de coloration pour ADN (bromure d'éthidium ou autre)
* Erlenmeyer
* Appareil d'électrophorèse et source de courant (power supply)

**Protocole :**

1. Coulez un gel d'agarose à 0.8% (p / v).
2. Installez le moule à gel conformément aux instructions de votre enseignant.
3. Préparez suffisamment de la solution de gel d'agarose à 0.8% pour couvrir le peigne de façon à préparer des puits de 2 à 3 mm de profondeur.

Exemple : vous souhaitez préparer 30 ml d'agarose à 0.9%. Quelle quantité d'agarose en poudre ajouterez-vous à 30 ml de tampon ?

concentration de soluté (p / v, %) = [(masse d’agarose, g) / (volume d’agarose, ml)] x 100

0.9% = [(X, g) / (30 ml)] x 100

[(0.9%) (30 ml)] / 100 = (X, g)

X = 0.27 g

* 1. Pesez la masse appropriée de poudre d'agarose, puis transférez la poudre dans une fiole Erlenmeyer.
  2. Ajoutez le volume approprié de tampon TBE 1X à la poudre d'agarose. Agiter doucement pour mélanger. Notez le volume de liquide dans l’Erlenmeyer.
  3. Chauffez le mélange au micro-ondes jusqu'à ébullition (1 à 2 minutes). Dès que la solution bout, arrêtez de chauffer.
  4. À l'aide d'un gant résistant à la chaleur, sortez *délicatement* l’Erlenmeyer du micro-ondes, en tenant l’ouverture de l’Erlenmeyer loin de votre face et de celles des autres.
  5. Très doucement, agitez pour mélanger, puis examinez la solution. S'il reste de la matière non dissoute, remettez l’Erlenmeyer au micro-ondes et continuez à chauffer jusqu'à ce que le mélange bout à nouveau. Répétez ce processus jusqu'à ce qu'aucune matière ne soit visible.

Important : veillez à ne pas éclabousser le liquide chaud ni à toucher avec vos mains l’Erlenmeyer qui deviendra très chaud.

* 1. Vérifiez le volume de la solution. S'il a diminué, ramenez-le au volume d'origine à l'aide d’H2O ultra pure. Agitez pour mélanger.
  2. Laissez refroidir la solution entre 50°C et 60°C (elle doit demeurer très chaude au toucher mais pas assez chaud pour brûler). Cela prend généralement 10 à 15 minutes.

1. Une fois que la solution est suffisamment froide, mettez des gants et ajoutez la solution de coloration de l’ADN de votre choix.
2. Si vous utilisez du bromure d'éthidium (EtBr) comme colorant d'ADN, ajoutez-en suffisamment pour atteindre une concentration finale de 0.5 μg / ml dans la solution d'agarose. Agitez pour mélanger.

Important : Soyez extrêmement prudent lors de la manipulation d'EtBr et d'autres colorants à ADN. Ce sont des mutagènes qui s'intercalent (s'insèrent) entre les bases de nucléotides.

Exemple : vous voulez 100 ml d'agarose avec 0.5 μg / ml d'EtBr et vous devez donc utiliser un volume inconnu de 10 mg / ml de stock d'EtBr. (N'oubliez pas que 10 mg / ml = 10 μg / μl). En utilisant l'équation C1V1 = C2V2:

(100 ml) (0.5 μg / ml EtBr) = (X) (10 mg / ml)

(100) (0.5 μg) = X (10 μg / μl)

X = 5 μl

1. Versez le mélange d'agarose / EtBr dans le moule à gel, en faisant attention à ne pas introduire de bulles. Insérez le peigne pour créer les puits.
2. Laissez le gel refroidir pendant 20 à 30 minutes.
3. Une fois le gel solidifié, retirez très soigneusement le peigne en le tirant lentement vers le haut. Une fois le peigne retiré, soulevez doucement la plateforme de gel hors du support à coulage.
4. Placez la plate-forme avec le gel solidifié dans l’appareil à électrophorèse. Les puits doivent être à l'extrémité de la cathode (-) de la boîte, où le fil noir sera connecté.
5. Versez le tampon TBE 1X dans l'appareil à électrophorèse jusqu'à ce que votre gel soit submergé par ~ 1/4 de pouce de tampon.
6. Chargez vos échantillons et faites migrer le gel conformément aux instructions de votre enseignant et au protocole d**'Électrophorèse sur gel** (10.3).

**Conseils utiles** **:**

* Si vous souhaitez obtenir une meilleure résolution et une meilleure séparation des petits fragments, vous pouvez utiliser un gel d'agarose à 2%.
* Le tampon de migration TAE peut remplacer le TBE.
* Lors de l’utilisation du micro-ondes pour faire fondre l’agarose, utilisez un Erlenmeyer ou une bouteille qui peut contenir au moins 10 fois le volume chauffé pour empêcher les débordements.