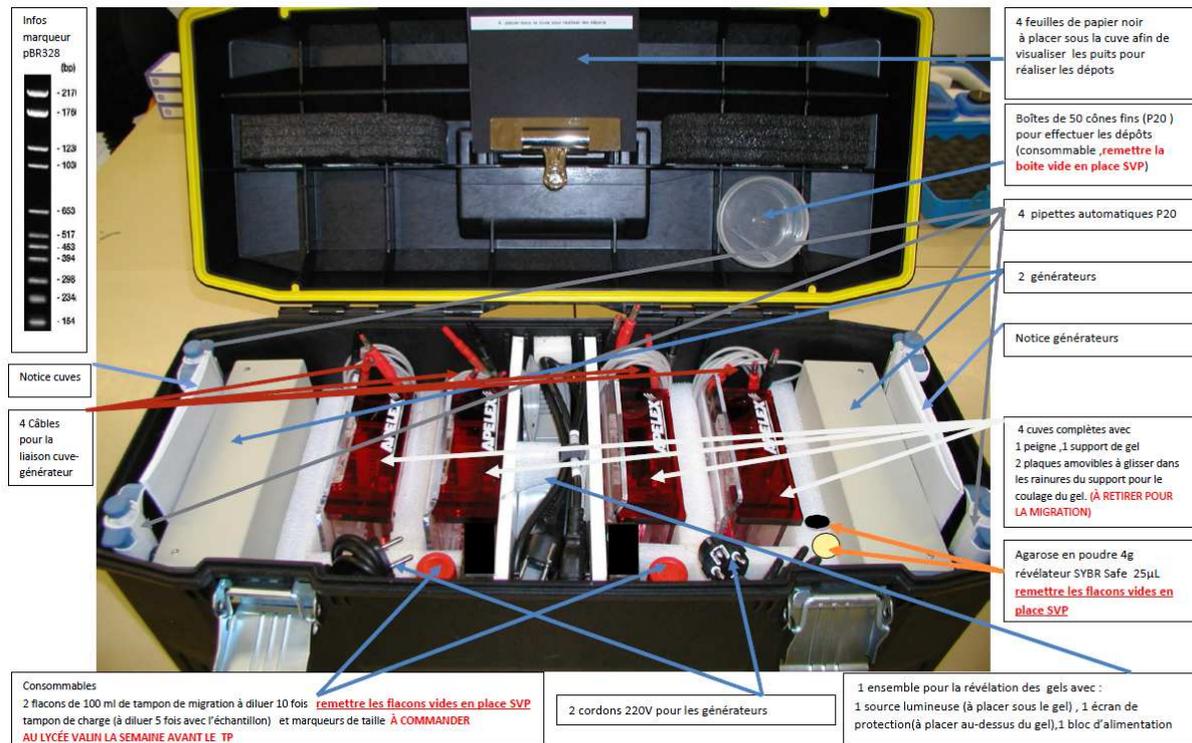


Mallette électrophorèse horizontale

1 MATERIEL



2 MATERIELS ET REACTIFS

- Mallette « ADN » : voir composition dans la feuille de « prêt »
- Tampon de charge 5X et tampon TE pour diluer les échantillons d'ADN

3 ECHANTILLONS A DEPOSER

- Marqueurs de taille
- Echantillons d'ADN à analyser

4 PREPARATION DU GEL

- Préparer 300 mL de tampon TBE 1X (50 mL/gel + 250 mL/tampon électrophorèse),
- Dans un erlen, introduire la masse d'agarose nécessaire à la préparation de 50 mL de gel à la concentration désirée,
- Ajouter les 50 mL de tampon TBE 1X,
- Porter à ébullition sur plaque chauffante pour hydrater l'agarose (solution limpide), laisser refroidir un peu,
- Ajouter 5 µL de SYBR SAFE, homogénéiser avant de couler le gel,
- Préparer le support du gel avec les peignes à 16 dents. Scotcher les bords délimités par les plaques,

Mallette électrophorèse horizontale

- Couler le gel sur ce support (vérifier que les dents plongent jusqu'à mi-hauteur),
- Après solidification du gel (environ 15 minutes), retirer les plaques et le scotch, puis recouvrir le gel de 1 à 2 mm de tampon d'électrophorèse TBE 1X (< 250 mL),
- Enlever ensuite les peignes avec précaution.

5 DEPOTS DES ECHANTILLONS

Les échantillons doivent être préparés de la manière suivante dans le tampon de charge :

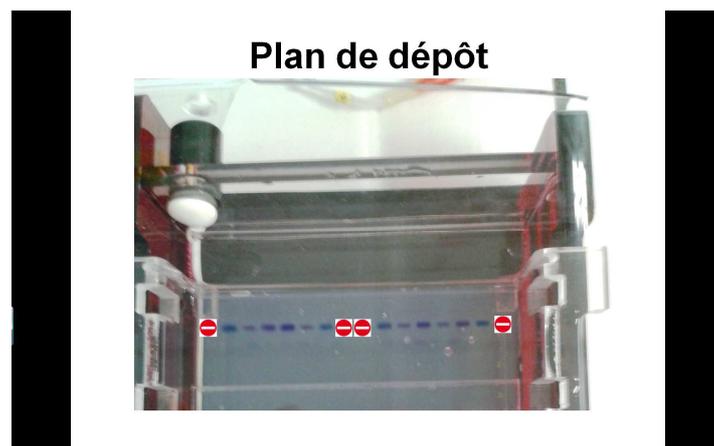
- **8 μ L d'échantillon,**
- **2 μ L de tampon de charge 5 X** (déjà réalisé pour le marqueur de taille).

Déposer « en sous-marin » 10 μ L des marqueurs de taille et des échantillons à analyser selon le plan de dépôts :

% gel :

Tampon :

Date :



Puits n°	Nom et composition du produit déposé
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	
11	
12	
13	
14	
15	
16	

Mallette électrophorèse horizontale

6 MIGRATION ELECTROPHORETIQUE ET VISUALISATION

Réaliser une électrophorèse pendant 30 à 45 minutes à 150V.

Couper au cutter le gel entre les puits 8 et 9 et observer au transilluminateur (**ne pas oublier de mettre le couvercle protecteur : écran ambré**).



7 EXPLOITATIONS

- Présenter les résultats à partir des photos numériques des gels obtenus (à légénder) et effectuer l'**analyse du gel d'électrophorèse avec ImageJ**
- Exploiter les résultats des gels à l'aide du tableur Excel, en vérifiant la relation suivante : **Log (nombre de pb) = f(distance de migration)**
- Déterminer la taille des fragments des échantillons à analyser.

8 ANALYSE DU GEL AVEC IMAGEJ

Sur l'image d'un gel entier, on va d'abord calibrer les mesures :

- tracer une ligne avec l'outil « ligne » (5e bouton) d'une longueur connue
- grâce à la fonction « analyze > set scale », rentrer la longueur réelle de la ligne en mm ou cm et indiquer l'unité.

Ensuite, il suffit de :

- tracer une ligne entre le puits et la première bande du marqueur (touche maj pour une ligne bien verticale)
- utiliser le raccourci clavier Ctrl + M (ou « analyze > Measure ») (la longueur de la ligne en mm apparaît dans la fenêtre de résultat)
- recommencer pour chaque bande du marqueur, puis pour les bandes à mesurer (noter l'ordre).

Mallette électrophorèse horizontale

- copier les valeurs dans la fenêtre de résultat et les coller dans un tableur (seule la dernière colonne, « length », nous intéresse)
- penser à remplacer les «. » par des «, » (ctrl + F)
- On peut alors réaliser un graphique Log (nombre de pb) = f(distance de migration)



File	Edit	Font	Area	Mean	Min	Max	Angle	Length
1			128	6.164	0	40	-90	128