

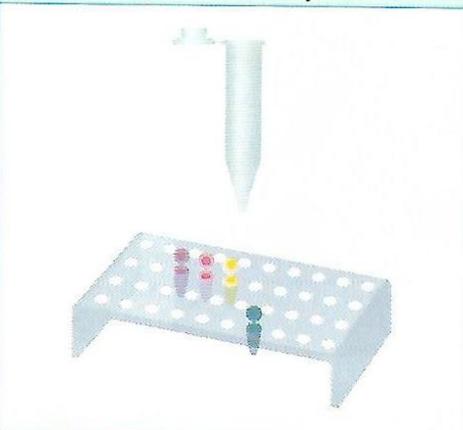
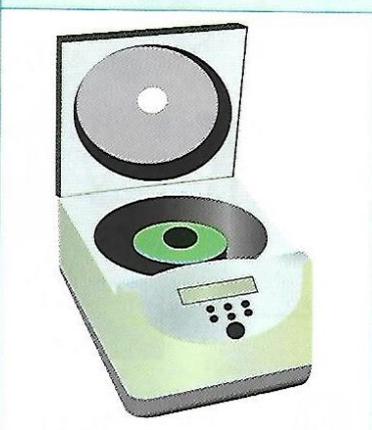
Manipuler les acides nucléiques en biologie moléculaire

Les acides nucléiques ADN et ARN sont manipulés en biologie moléculaire. Ils sont extraits des cellules, modifiés en utilisant des enzymes, amplifiés par PCR, etc. Le biologiste moléculaire travaille sur des **petits volumes** (20 à 50 μL final) et peut manipuler des **réactifs fragiles** (enzymes, etc.)

1

Prélèvement de petits volumes

1.1 Présentation du matériel adapté aux microvolumes

Pipettes à piston P10, P20, P50... et cônes adaptés	Microtubes de 1,5 ; 0,5 ; 0,2 mL... et porteoirs adaptés	Microcentrifugeuse
		

1.2 Pipetage de microvolumes avec une pipette à piston

- Travailler à **hauteur des yeux** en saisissant le récipient contenant la substance à prélever ou le récipient de travail, car il est indispensable de suivre l'évolution du liquide dans le cône, puis dans le tube.
- Ne pas trop tremper l'embout dans la substance à prélever et relâcher doucement le piston de la pipette à piston. Vérifier l'absence de liquide à l'extérieur de l'embout et, si c'est le cas, essuyer le cône au sommet et sur le bord du récipient.
- Déposer la substance prélevée dans le récipient de travail incliné en posant l'extrémité de l'embout contre la paroi, le plus profondément possible mais sans contact avec les solutions déjà présentes (expulsion de chaque solution à un endroit différent). Expulser en appuyant doucement le piston de la pipette au premier puis deuxième cran.
- Sortir la pipette du récipient de travail et relâcher doucement le piston. Éjecter le cône dans une poubelle adaptée et reposer la pipette sur le porte-pipettes.

1.3 Préparation d'un mélange de différentes substances en microtube

- Chaque solution doit être correctement homogénéisée juste avant son prélèvement :
 - soit en utilisant un agitateur rotatif si la solution n'est pas sensible à l'agitation mécanique, comme une solution tampon ;
 - soit par aspiration-refoulement à l'aide d'une pipette à piston si la solution est sensible à l'agitation mécanique, comme les solutions d'acides nucléiques. Le volume d'homogénéisation est choisi en fonction du volume total de la solution à homogénéiser.
- Déposer chacune des solutions sur la paroi du microtube receveur à un endroit différent, pour visualiser les dépôts.
- Fermer le microtube de travail, puis le centrifuger quelques secondes pour faire descendre dans le fond du tube les différentes solutions déposées.
- Homogénéiser le mélange en microtube par aspiration-refoulement si au moins l'une des solutions est sensible à l'agitation mécanique. Sinon, un agitateur rotatif peut être utilisé.

Bon à savoir

Le volume d'eau (ou de diluant) d'un mélange est ajouté en premier pour que les autres composants soient à la bonne concentration lorsqu'ils sont ajoutés.

2

Précautions à prendre pour protéger la manipulation des nucléases ubiquitaires

L'ADN et l'ARN sont des molécules sensibles respectivement aux DNases et aux RNases, enzymes catalysant la réaction d'hydrolyse des liaisons phosphoester et engendrant une dégradation des acides nucléiques. Ces enzymes sont ubiquitaires, c'est-à-dire présentes partout (main du manipulateur, paille, eau, etc.). Le biologiste moléculaire doit protéger les acides nucléiques qu'il manipule de ces enzymes ubiquitaires :

- en utilisant de l'**eau de qualité BM** (Biologie Moléculaire), qui est garantie sans DNase ni RNase (*nucleases free* en anglais) ;
- en stockant et en manipulant les acides nucléiques dans de la **glace à 4 °C** pour limiter l'action des éventuelles enzymes nucléases présentes ;
- en utilisant des tampons avec de l'EDTA, qui piège les ions magnésium, cofacteur ionique indispensable au fonctionnement des DNases ;
- en travaillant dans des **tampons pH 8**, peu favorables à l'activité des DNases.

Réaliser une électrophorèse d'ADN en gel d'agarose

1 Principe

L'électrophorèse en gel d'agarose permet la **migration dans un champ électrique** des **ADN chargés négativement** dans le tampon de migration. Les ADN linéaires sont **séparés en fonction de leur taille**. Après migration, les molécules d'ADN séparées sont révélées, le plus souvent en utilisant des agents intercalants fluorescents.

2 Préparation du gel d'agarose

2.1 Pesée de la poudre d'agarose

La masse de poudre à peser dépend de la concentration en gel d'agarose (% ou g d'agarose pour 100 mL de tampon) désirée et du volume à préparer (volume correspondant à la capacité du support dans lequel est coulé le gel) :

$$m_{\text{poudre agarose}} = \frac{\%_{\text{(agarose ; gel)}}}{100} \times V_{\text{gel}} \text{ ([g] = [g} \cdot \text{mL}^{-1} \times \text{mL])}$$

La pesée peut être réalisée directement en fiole d'Erlenmeyer.

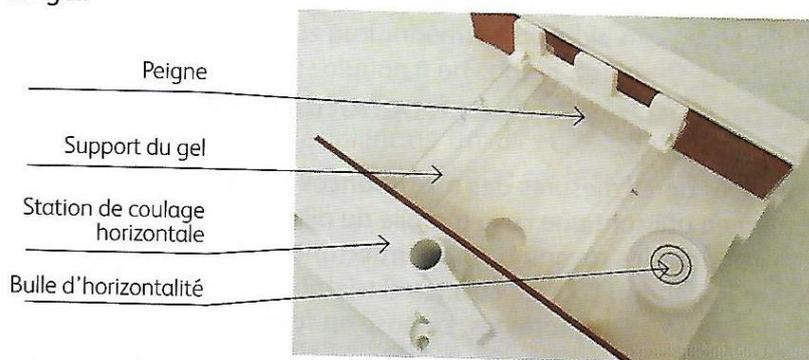
2.2 Dissolution de la poudre et chauffage

- Mesurer le volume de tampon de migration à l'aide d'une éprouvette et l'ajouter à la poudre.
- Homogénéiser le mélange et le chauffer pendant quelques secondes à l'ébullition, en utilisant une plaque chauffante ou un four microondes.
- Après chauffage, homogénéiser le mélange délicatement et vérifier la bonne dissolution de l'agarose.
- Pendant que le gel d'agarose refroidit, installer la station de coulage du gel.

Les astuces...

...du biotechnologiste !

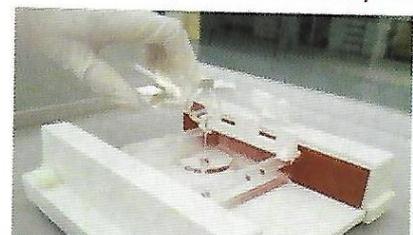
La solution est suffisamment chauffée lorsqu'elle devient translucide.



- Après chauffage, l'agent révélateur de type intercalant peut être ajouté au gel d'agarose encore liquide. *Attention ! Lire les données de sécurité de l'agent intercalant et utiliser les préventions adaptées.*

2.3 Coulage du gel d'agarose

Couler le gel d'agarose suffisamment refroidi, mais encore liquide, dans le support disposé dans la station de coulage.



3 Préparation des solutions d'ADN à analyser

Cette préparation dépend du **volume total de dépôt** correspondant à la capacité des puits formés dans le gel et du **volume d'ADN à déposer**. Le volume d'ADN à déposer est mélangé à une **solution de dépôt** (*loading buffer* en anglais) qui contient :

- un alourdisseur (glycérol, saccharose), molécule de forte densité qui entraîne l'échantillon dans le fond du puits ;
- un ou plusieurs colorant(s) chargé(s) négativement permettant de suivre la migration (bleu de bromophénol, bleu de xylène cyanol, etc.).

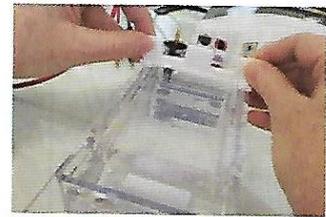
La solution de dépôt est fournie plus concentrée, en général « 6X », c'est-à-dire 6 fois plus élevée que sa concentration finale dans le volume total de dépôt. Elle doit donc être diluée au 1/6^e dans le volume total de dépôt.

Homogénéiser l'échantillon doucement par aspiration-refoulement avant de le déposer dans le puits du gel d'agarose.

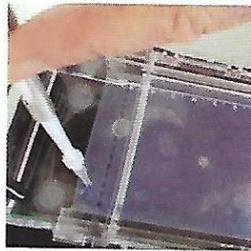
4 Préparation de la cuve à électrophorèse

1. Déposer le gel dans la cuve à électrophorèse (*Attention ! Positionner les puits du côté négatif (borne noire),*), puis l'immerger dans du tampon de travail (électrophorèse sous-marine horizontale).

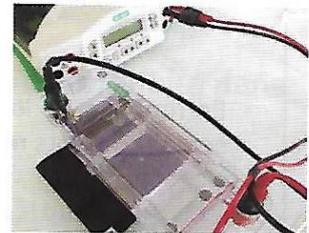
2. Retirer les peignes délicatement et bien verticalement.



3. Déposer les échantillons et le marqueur de taille dans les puits avec une pipette à piston adaptée.



4. Fermer la cuve à électrophorèse et la relier à un générateur. (*Attention ! Positionner correctement les branchements.*) Mettre la cuve à électrophorèse sous tension.



5 Migration

Les ADN étant incolores, la migration est suivie visuellement grâce aux colorants de la solution de dépôt présents dans les échantillons.

Bon à savoir

Le bleu de bromophénol est un colorant migrant aussi vite que les petits fragments d'ADN. Il sert de marqueur de « front de migration ».

6 Révélation

La révélation dépend de la méthode choisie et du matériel disponible :

- l'utilisation d'un **agent intercalant fluorescent** (GelRed®, bromure d'éthidium, etc.) nécessite de disposer d'une **table UV** (transilluminateur UV) ou d'un appareil complet avec table UV, caméra et analyseur d'images ;
- l'utilisation de **colorants de l'ADN** (bleu de méthylène, Azur A, etc.) ne nécessite pas de table UV. Il est alors nécessaire de réaliser une coloration en bain suivie de plusieurs rinçages.

Bon à savoir

Un agent intercalant s'insère dans la molécule d'ADN en créant des interactions hydrophobes. Après interaction avec l'ADN, l'agent intercalant fluoresce lorsqu'il est exposé aux rayons ultraviolets (UV).