

NOTE DE SÉCURITÉ:

Portez des gants pour manipuler l'acrylamide. Même après la polymérisation, l'acrylamide non-polymérisé peut être présent. Veillez à protéger vos yeux de la lampe UV!

Vous avez besoin de/des/ d':

Une unité d'électrophorèse horizontale, grande; Cleaver Scientific

Un moule en gel, plaques de verre et un niveau à bulle

Un coin de gel pour soulever la plaque de verre du moule (unité de coulée)

Une pompe péristaltique et tubulure pour recirculer le tampon pendant de longues périodes

Silane 3-(méthacryloyloxy) propyltriméthoxysilane)

Acide acétique, éthanol, tubes de 50 ml et lingettes non pelucheuses

Acrylamide-bis acrylamide solution 19:1, 40%

Des sachets APS-TEMED (Severn Biotech) ou persulfate d'ammonium et TEMED à utiliser pour constituer la solution APS-TEMED (fraîche)

Un tampon TAE

***Pour la vidéo du protocole hPAGE, voir:
<https://www.kirkhoustrust.org/hpagevideo>***

1. Préparez la solution de silane et la plaque de verre:

1. Préparez la solution de silane dans un tube de 50 ml en ajoutant 8 ml d'éthanol, 1,8 ml d'eau distillée, 200 µl d'acide acétique et 10 µl de silane (3-triméthoxysilyl-propyl-méthacrylate). Mélangez doucement la solution. Toute solution de silane restante doit être conservée au réfrigérateur (4 ° C) jusqu'à ce que la plaque doive être re-silanisée.
2. Pipetez environ 1 ml de la solution de silane sur une surface d'une plaque pleine. Pour la demi-plaque et le quart de plaque, réduisez proportionnellement le volume de silane appliqué.

3. Étalez la solution également sur la plaque de verre à l'aide d'une lingette non pelucheuse.
4. Couvrez la plaque de verre avec la lingette non pelucheuse (pour empêcher la poussière de se déposer sur la plaque en séchant). Laissez sécher à l'air pendant 1 heure.
5. Marquez la plaque de verre avec un marqueur permanent pour identifier le côté silanisé.
6. Après 1 heure, polissez la plaque de verre avec une lingette non pelucheuse humidifiée avec une petite quantité d'éthanol.

2. Nivelier le moule en gel:



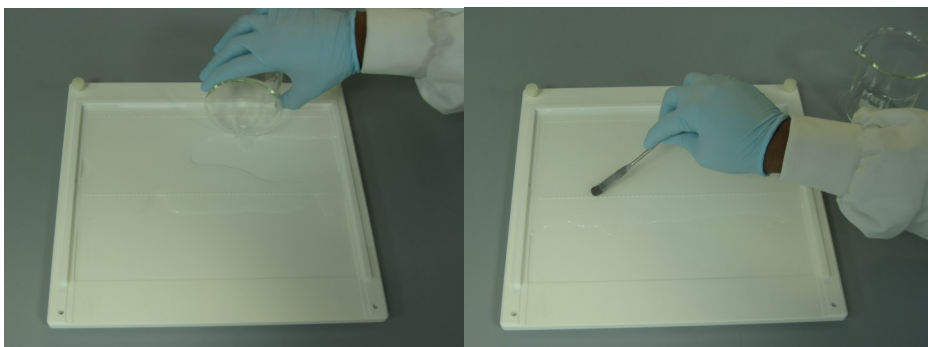
1. Placez le moule à gel sur un plateau de laboratoire et placez la bulle de niveau fournie dans le moule.
2. Tournez les vis situées en haut du moule jusqu'à ce que la bulle soit centrée.

3. Préparer le mélange de gel à l'aide de sachets

1. Le moule hPAGE nécessite 125 ml de solution de gel (voir le tableau de la page 4) pour les volumes mesurés pour les différentes tailles de plaque de gel. Pour un gel à 6%, ajoutez les éléments suivants dans une fiole conique en verre ou un bécher : 18,8 mL de solution de gel d'acrylamide-bis 40 %, 2,5 mL de tampon TAE, 53,7 mL d'eau. Utiliser 50 ml d'eau pour remettre en suspension le APS-TEMED dans le sachet (total 125 ml).
2. Immédiatement avant de verser le gel, préparez la solution APS-TEMED. Mettez 50 ml d'eau dans un tube à centrifuger. Ouvrez le sachet et ajoutez un peu de cette eau au sachet pour dissoudre l'APS-TEMED. Continuez à rincer le sachet jusqu'à ce que tous les cristaux soient dissous. Ajouter ces 50 ml de solution APS-TEMED à la solution de gel dans un bécher et agiter doucement pour que la solution de gel soit bien mélangée.

4. Versez le mélange de gel dans le moule:

1. Versez rapidement, mais avec précaution, le mélange de gel dans le moule. Verser d'abord autour des encoches du puits de gel. Pour s'assurer qu'aucune bulle ne se coince autour de celles-ci, il faut passer la pointe d'une spatule 2 ou 3 fois le long de chaque rangée d'encoches de puits de gel.



4. Versez le mélange de gel dans le moule (suite):

2. Prenez la plaque de verre **silanisée face vers le bas**, insérez-la dans le haut du moule et abaissez-la avec précaution en veillant à ce qu'aucune bulle ne se forme dans la solution de gel.
3. Pour contrôler le temps nécessaire à la prise de la solution de gel: environ 1 ml de solution doit être pipeté dans tube microfuge.
4. Le gel devrait commencer à polymériser après 5 à 10 minutes¹ selon la température ambiante. Laisser 60 minutes pour assurer une polymérisation complète avant de charger les échantillons.

5. Exécutez le gel:

1. Utilisez les deux coins de gel fournis (un de chaque côté de la plaque de verre) pour soulever doucement la plaque de verre du moule.



2. Placez la plaque de verre, côté gel vers le haut, sur le support de la cuve à gel.
3. Versez avec précaution du tampon de circulation supplémentaire² dans le réservoir afin qu'il recouvre la plaque de gel à une profondeur maximale **de 1 à 2 mm.**

Remarques:

¹ Cela laisse le temps de soulever la plaque et d'éliminer les bulles. Cependant, il est toujours nécessaire de positionner les plaques et les peignes le plus rapidement possible sinon le gel risque de polymériser de manière inégale.

² Le tampon de circulation peut être dilué avec de l'eau potable en bouteille.

5. Exécutez le gel (suite):

4. Pour faciliter le chargement des échantillons, les puits de gel peuvent être visualisés en plaçant un tapis noir dans l'espace sous le réservoir de gel.
5. Appliquez les échantillons dans le tampon de chargement (maximum 4 μL ³).
6. Réglez le bloc d'alimentation à une tension constante à 120 V (ou ~ 3-5 V / cm) et exécutez le marqueur de colorant bleu à environ deux tiers du gel sous les puits ou plus pour les gros fragments.

6. Coloration et photographie du gel apposé

Vous avez besoin de/des/d':
EtBr ou tampon d'électrophorèse (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ or 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ⁴
Un bac de coloration
Un transilluminateur UV, une hotte et un appareil photo
Un masque UV ou lunettes de sécurité UV

1. Une fois l'électrophorèse est terminée, retirez la plaque de gel de la cuve et essuyez l'excès de tampon.
2. Placez la plaque de gel dans le plateau de coloration et pipettez sur la surface du gel la quantité minimale de solution d'EtBr de façon à ce que tout le gel soit couvert de solution de coloration.
3. Tachez pendant 30-60 minutes⁵ puis retirez la plaque de gel du plateau de coloration en laissant la solution de coloration s'écouler du gel dans le plateau. Essuyez l'excès de coloration à la base de la plaque.

Remarques:

³ Le volume du puits de gel est = 4.5 μL

⁴ De 10 mg/mL solution de base: 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ is 1:20,000 dilution = 5 $\mu\text{L}/100 \text{ mL}$; 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ est 1:100,000 = 1 $\mu\text{L}/100 \text{ mL}$.

⁵ Une décoloration d'une heure ou plus dans de l'eau ou un tampon peut réduire le bruit de fond élevé ou inégal.

6. Coloration et photographie du gel apposé (suite):

4. Tournez la plaque de gel, avec le gel face vers le bas sur le transilluminateur UV. **Remarque:** cela inversera l'ordre des pistes de gel.
5. Photographiez, tachez puis jetez la solution EtBr⁶ (voir page 9).
6. Chargez les images de gel sur l'ordinateur. Retournez l'image pour refléter la séquence de chargement à l'aide du logiciel d'édition.

7. Élimination du gel de la plaque silanisée:

1. Grattez le gel polymérisé de la plaque de verre à l'aide du grattoir et jetez le gel dans les déchets de laboratoire.
2. Raclez la plaque une deuxième fois en éliminant toute trace de gel résiduel.
3. Nettoyez la plaque en l'essuyant avec de l'éthanol à 70% et une lingette non pelucheuse.

8. Nettoyage de la plaque de verre avant de re-silaniser:

1. Après avoir été utilisée environ 5 fois, la plaque doit être re-silanisée.
2. Préparez une solution de NaOH 2N.
3. Placez la plaque de verre dans un plateau, puis pipetez quelques mL de NaOH 2 N sur la surface silanisée de la plaque de verre. Utilisez un chiffon non pelucheux ou un mouchoir en papier (portez des gants!) Étalez uniformément sur la plaque. Laissez agir 30 minutes puis lavez la plaque avec beaucoup d'eau.

Remarques:

⁶ Ce protocole réduit le volume et la quantité d'EtBr au minimum, atténuant le problème d'élimination: la concentration d'EtBr restante est inférieure à 0,5 $\mu\text{g} / \text{mL}$, le niveau que la plupart considèrent comme sûr à éliminer sans précautions particulières.

9. Utilisation de différentes tailles de plaques de verre fournies:

1. Un ensemble de plaques est fourni; une plaque complète, une demi-plaque et 4 quarts de plaque à utiliser avec la grande unité de gel horizontale. **Remarque:** pour polymériser la solution d'acrylamide, utilisez un sachet d'APS / TEMED pour une plaque complète, et utilisez la proportion appropriée pour les plaques plus petites.
2. La séparation des produits de PCR du même échantillon d'ADN peut être comparée en utilisant une concentration de gel différente sur chacune des 4 quarts de plaques. 35 mL de solution d'acrylamide sont nécessaires pour chaque quart de plaque. Par conséquent, si un seul quart de plaque est en cours de préparation, réduire APS / TEMED proportionnellement.
3. Lorsque vous n'effectuez qu'un petit nombre d'échantillons, utilisez le quart de plaque avec l'unité d'électrophorèse de taille moyenne fournie.
4. Lors de l'exécution d'un gel pendant une longue période, par exemple toute la nuit, utilisez la pompe péristaltique avec un tube placé dans les deux orifices du grand couvercle de la cuve à gel pour faire circuler le tampon pendant l'opération.
5. Voir la vidéo : 'The Kirkhouse Trust Horizontal Polyacrylamide Gel Electrophoresis System' sur le site: www.kirkhoustrust.org, aller à 'Resources → Training Videos → hPAGE system'.

Assiette pleine
27 x 21 cm
125 mL



Demi-plaque utilisée en orientation horizontale ou verticale
13.5 x 21 cm
60 mL



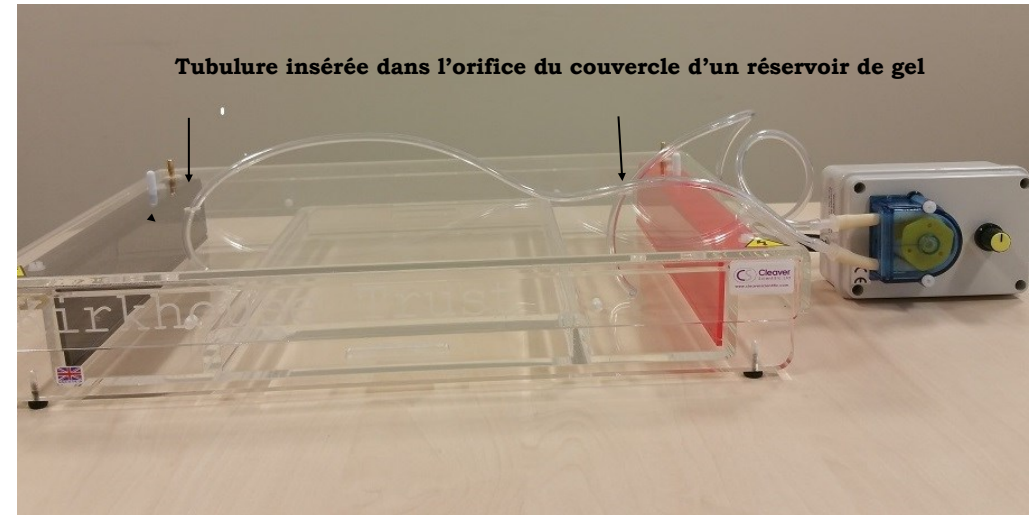
Quart d'assiette
13.5 x 12.5 cm
35 mL



Pour une assiette pleine (125 mL)	4 % Solution d'acrylamide (mL) pour le gel	6 % Solution d'acrylamide (mL) pour le gel	8 % Solution d'acrylamide (mL) pour le gel	10 % Solution d'acrylamide (mL) pour le gel
Solution de gel d'acrylamide-bis 40%	12.5	18.8	25	31.3
De l'eau (mL)	60	53.7	47.5	41.2
Le tampon TAE (mL)	2.5	2.5	2.5	2.5
De l'eau à dissoudre APS-TEMED	50	50	50	50

10. Utilisation d'une pompe péristaltique avec un grand réservoir de gel:

1. Une pompe péristaltique Aquadoser 24 V et un tube sont fournis pour être utilisés avec le grand réservoir de gel horizontal lors des longs trajets. Le but est de minimiser les changements dans les performances du tampon, c'est-à-dire la température et le pH du tampon, améliorant ainsi la qualité des bandes de gel produites.
2. L'alimentation électrique d'électrophorèse peut être réglée à environ 90 V pour les longs trajets, par exemple les passages de nuit.
3. Réglez la pompe Aquadoser pour qu'elle circule à environ 16 tr / min. Ceci peut être chronométré manuellement en observant les révolutions et la synchronisation de la tête de pompe.
4. Il peut être nécessaire d'amorcer le tube avant utilisation; placez les extrémités du tube dans le réservoir de gel afin qu'elles soient immergées dans le tampon mais sans toucher la base du réservoir de gel. Allumez la pompe et laissez-la fonctionner jusqu'à ce que des bulles ne soient plus visibles dans le tube. Vous devrez peut-être augmenter la vitesse de la pompe pour éliminer les bulles, puis la remettre à 16 tr / min.



Pompe péristaltique utilisée, montrant le cheminement des tubes à travers chacun des deux orifices du couvercle. Faites passer la tubulure par chaque port jusqu'à ce que l'extrémité de la tubulure se trouve sous la surface du tampon mais ne touche pas la base du réservoir.

