

1. Préparation de la solution de gel d'agarose:

Vous avez besoin de/d'
L'Agarose
Le Tampon de 50X TAE
Solution de bromure d'éthidium 10mg/ML
Le micro-onde
Le réservoir de gel, alimentation électrique
Le flacon en verre

Vidéo d'instruction sur le site de KT dans la section Ressources : <https://www.youtube.com/watch?v=eXkTudcrrr4>

1. Choisissez une bouteille en verre ou un flacon conique qui représente 2 à 4 fois le volume de la solution car l'agarose déborde facilement.
2. Saupoudrez de poudre d'agarose pré-mesurée sur un tampon 1X à température ambiante et agitez doucement pour mélanger. Pesez la bouteille ou le flacon pour noter le poids initial.
3. Chauffez le récipient à puissance ÉLEVÉE pendant environ 45 secondes ou jusqu'à ce que des bulles apparaissent. ***Attention*** La solution peut devenir surchauffée et déborder. Lorsque vous retirez le récipient, tournez-le doucement, portez des gants et tenez-le à bout de bras.
4. Réchauffez à puissance ÉLEVÉE jusqu'à ébullition de la solution. Retirez, tourbillonnez doucement et vérifiez que toutes les particules sont dissoutes et que la solution est bien mélangée.
5. Vérifiez que le poids final est le même que le volume initial - ajoutez de l'eau distillée pour compenser les pertes.
6. Pour ajouter du bromure d'éthidium avant d'exécuter votre gel : Ajoutez le bromure d'éthidium à l'agarose fondu jusqu'à une concentration finale de 0,5 µg/mL. Ne faites pas fondre l'agarose qui contient déjà du bromure d'éthidium ; ajoutez-le après le chauffage, lorsqu'il est tiède et pas chaud.

2. Versez le gel:



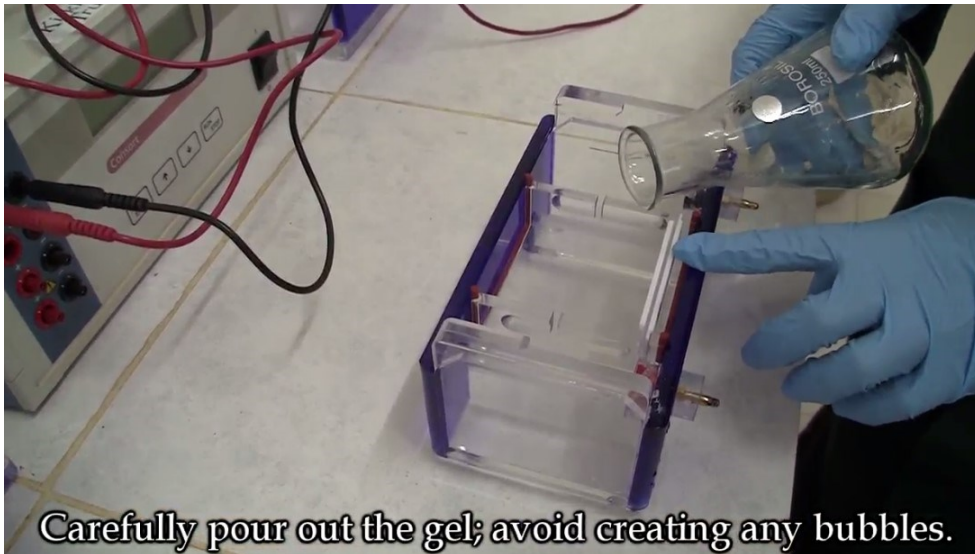
1. **Important : Laissez la solution d'agarose refroidir à 50-60°C** ¹. Si une méthode de coloration « en gel » doit être utilisée, ajoutez le colorant d'acide nucléique et agitez doucement pour bien mélanger.
2. Les unités horizontales d'électrophorèse sur gel sont fournies en différentes tailles. Pour couler un gel, les plateaux n'ont pas besoin d'être scellés. Une copie électronique du manuel d'instructions est disponible sur www.kirkhoustrust.org, allez dans «Resources → Research Resources → Equipment Manuals».
3. L'épaisseur du gel a un effet profond sur la résolution des plus petits fragments - pour une résolution optimale des gels horizontaux coulés de 3 à 4 mm d'épaisseur.
4. Après avoir versé le gel, laissez reposer pendant 1 heure (avec le couvercle de l'unité de gel si possible).

Note:

1. **Si la solution d'agarose est plus chaude que 50-60°C cela entraînera la déformation du plateau en Perspex.**
2. **Vous pouvez passer la base du flacon sous l'eau froide pour refroidir le mélange de gel jusqu'à ce qu'il soit chaud à la main.**

3. Chargement et fonctionnement du gel:

1. Ajoutez 1 μ L de tampon de chargement de colorant ADN¹ pour 5 μ L d'échantillon et mélangez bien.
2. Des échelles d'ADN (50 pb, 100 pb et 1 ko) sont fournies prêtes à l'emploi pour le chargement du colorant.



Remarques:

¹ Le colorant de chargement d'ADN Thermo Scientific 6X est fourni dans un flacon de 1,0 ml. Utiliser avec des échantillons sur des gels d'agarose ou de polyacrylamide. Il contient deux colorants, le bleu de bromophénol et le xylène cyanol FF, pour un suivi visuel facile de la migration de l'ADN pendant l'électrophorèse à une concentration 6X. Composition Tris-HCl 10 mM (pH 7,6) 0,03% bleu de bromophénol, 0,03% xylène cyanol FF, 60% glycérol 60 mM EDTA. Ajoutez 1/6 volume de colorant de chargement d'ADN 6X à votre échantillon d'ADN.

3. La profondeur du tampon doit être de 3 à 5 mm.

Pour <1 Kb, la tension doit être 5 V/cm².

Le gel doit être coulé jusqu'à ce que la bande d'intérêt ait migré de 40 à 60% sur la longueur du gel.

Regardez le processus sur la vidéo - voir le lien sur le site de Kirkhouse Trust dans la section :

Ressources-Vidéos de formation-Biologie moléculaire



Le Kirkhouse Trust fournit une solution de bromure d'éthidium dans un flacon compte-gouttes. La concentration est de 10mg/mL. Une goutte est suffisante pour 50 ml d'agarose et deux gouttes pour 100 ml.

4. Photographier le gel:

Voir Protocole de photographie sur gel - page 9.

Remarques:

2. l'alimentation électrique : Une tension trop élevée entraînera des rayures et des traînées de bande, si la tension est trop faible, elle provoquera un élargissement de la bande en raison de la diffusion.