

ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE

1. Rappels Théoriques

L'électrophorèse en gel d'agarose est une technique de base au laboratoire de biologie moléculaire. Elle est utilisée :

- soit à des fins analytiques: pour séparer et identifier des fragments d'ADN, pour déterminer leur taille, pour en estimer la quantité,
- soit à des fins préparatives: pour purifier un fragment d'ADN de taille connue. La taille des fragments qu'il est possible de séparer est comprise entre 0,2 et 50 kb. Les fragments d'ADN sont facilement détectés sur le gel grâce à un colorant fluorescent, le bromure d'éthidium (BET). On peut ainsi visualiser en lumière UV des quantités très faibles d'ADN (de l'ordre de 5-10 ng).

L'électrophorèse en gel d'agarose est donc une technique très sensible; elle est de plus rapide et simple à mettre en œuvre.

1.1. Structure

L'agarose est un polyside hautement purifié extrait de l'agar. Ce polymère linéaire est constitué de la répétition d'un motif de type diholoside.

L'agarose n'est pas chargé électriquement. Seuls sont retrouvés dans la plupart des préparations quelques anions tels des pyruvates et des sulfates qui peuvent provoquer une certaine endosmose. L'agarose ultrapur utilisé en biologie moléculaire a en général une teneur en sulfates inférieure à 0,35 % et ne donne donc lieu qu'à un très faible courant d'électroendosmose.

1.2. Propriétés

L'agarose est une poudre blanche qui se dissout dans l'eau à ébullition. La solution d'agarose reste à l'état liquide tant que la température est supérieure à 40-45 °C (surfusion). Quand la température devient inférieure à 40°C, la solution se solidifie en un gel stable qui ne fond pas tant que la température reste inférieure à 100°C.

La réticulation d'un gel dépend de sa concentration en agarose: la taille des pores est d'autant plus petite que la concentration de l'agarose dans le gel est plus élevée. On utilise le plus souvent des concentrations allant de 0,4 à 2% (masse/volume) .

La cohésion entre des chaînes polyosidiques est maintenue par des liaisons faibles, hydrogènes essentiellement. Les gels d'agarose sont donc fragiles, on doit les manipuler avec précaution.

REMARQUE: L'agarose à bas point de fusion se liquéfie à 65°C (en dessous de la Tm de la plus part des acides nucléiques), reste liquide à 37°C, mais se fige rapidement à 25°C. Les caractéristiques de résolution de cet agarose sont semblables à celles de l'agarose classique Ses propriétés le destinent à la récupération de fragments d'ADN après électrophorèse.

2. Le matériel d'électrophorèse

On réalise des électrophorèses horizontales. L'appareillage comporte:

- une cuve pour électrophorèse
- un support où le gel est coulé
- des peignes pour la formation des puits (où sont déposés les échantillons).

Plusieurs types d'appareillage sont disponibles dans le commerce:

- pour la réalisation de mini gels :

avantages	consommation d'agarose faible
	migration rapide (30 à 60 minutes)
inconvénients	nombre de dépôts faibles (8)
	volume des puits faible (8 à 20µL)
utilisation	systématique pour les contrôles rapides
- pour la réalisation de grands gels

avantages	nombre de dépôts élevé (20 ou plus)
	volume des puits important (20 à 50µL)

inconvenient utilisation	meilleure séparation des fragments migration longue (quelques heures) analytique et préparative
--------------------------	---

3. Les facteurs de la migration électrophorétique

A pH neutre les molécules d'ADN sont chargées négativement du fait de la présence des phosphates et migrent donc vers l'anode quand elles sont soumises à un champ électrique. Leur rapport charge/taille étant constant, ces molécules se séparent essentiellement en fonction de la facilité avec laquelle elles progressent à travers le réseau d'agarose. La séparation est ainsi assurée par l'effet de filtration du gel. La vitesse de migration d'une molécule d'ADN est fonction de deux paramètres: sa taille et la concentration en agarose du gel, mais le voltage et la force ionique du tampon interviennent également.

3.1. Taille et conformation de l'ADN

a) Taille

Les molécules d'ADN bicaténaire linéaires migrent en fonction de leur longueur: la vitesse de migration est inversement proportionnelle au logarithme du nombre de paires de bases.

b) Conformation

Les molécules d'ADN plasmidiques circulaires se présentent sous trois conformations de taille identique:

- la forme surenroulée (forme 1 ou circulaire contrainte),
- la forme relâchée (forme 2), résultant d'une coupure d'un des brins qui entraîne la disparition du surenroulement,
- la forme linéaire (forme 3) résultant d'une coupure des deux brins.

La forme 1 migre le plus rapidement puis ensuite la forme 3, la plus retardée étant la forme 2.

3.2. Concentration en agarose

La concentration en agarose est exprimée en % masse d'agarose/volume de gel.

Un fragment d'ADN d'une taille donnée migre d'autant plus vite que le pourcentage d'agarose est plus faible.

Un gel de concentration donnée permet donc de séparer une fourchette donnée de fragments d'ADN, comme le montre le tableau ci-dessous.

concentration en agarose	domaines de séparation de molécules d'ADN bicaténaire linéaire (taille en kb)
0,3	5-60
0,6	1-20
0,7	0,8-10
0,9	0,5-7
1,2	0,4-6
1,5	0,2-3
2,0	0,1-2

3.3. Autres facteurs

a) Tension du courant

Pour une tension faible, la vitesse de migration de l'ADN linéaire est proportionnelle à cette grandeur. D'une manière générale, la résolution des fragments est d'autant meilleure que le voltage est faible, idéalement 5 V par cm de gel.

b) Tampon

Deux tampons d'électrophorèse sont surtout utilisés:

- tampon TAE: Tris Acétate EDTA => Tris-acétate 40m M, EDTA 1mM; pH 7,8
- tampon TBE: Tris Borate EDTA => Tris-borate 90mM, EDTA 2mM, pH 8,2

Dans des gels identiques et à intensité constante, la migration est plus rapide dans le TBE que dans le TAE. Le tampon TBE est le plus souvent utilisé pour les contrôles rapides mais l'ADN s'élue difficilement de ce type de gel. Pour la récupération de fragments d'ADN, on utilise de préférence le TAE.

c) Température

La vitesse de migration n'est pas modifiée entre 4 et 30°C: on peut donc faire migrer les gels à température ambiante.

4. Suivi de la migration et révélation

4.1. Suivi de la migration

Les échantillons d'ADN avant d'être déposés dans les puits sont mélangés avec une solution de charge qui contient:

- un alourdisseur (glycérol ou Ficoll ou saccharose) pour entraîner l'ADN au fond des puits
- des marqueurs de mobilité (bleu de bromophénol et xylène cyanol),
- éventuellement un agent dénaturant (SDS) pour arrêter les réactions enzymatiques

Les deux marqueurs migrent à des vitesses différentes: le bleu de bromophénol (violet) migre avec les fragments de petite taille, le xylène cyanol (bleu turquoise) avec les fragments de grande taille. On peut ainsi suivre indirectement la migration de l'ADN.

4.2. Révélation

Le bromure d'éthidium (BET) est un colorant fluorescent très utilisé en biologie moléculaire pour le marquage et la détection des acides nucléiques.

Du fait de la planéité de sa structure, cette molécule possède la propriété de s'intercaler entre les paires de base des acides nucléiques, où sa fluorescence dans le visible est exaltée. Elle est révélée par excitation sous illumination par UV courts (vers 300 nm) en plaçant le gel sur un transilluminateur ("table UV").

Le BET doit être manipulé avec d'extrêmes précautions car c'est un produit hautement mutagène. Une photographie du gel peut être prise avec un appareil instantané (Polaroid) et conservée.

5. Étalonnage d'un gel

On étalonne les gels avec des marqueurs de taille. Un marqueur de taille est un mélange de fragments d'ADN linéaires bicaténaux dont les tailles sont connues. Il existe deux types de marqueurs de taille:

- des marqueurs fabriqués à partir d'une molécule d'ADN naturelle digérée par des endonucléases de restriction. Un marqueur de ce type, très fréquemment utilisé, est l'ADN du phage lambda digéré par une ou deux endonucléases. Comme la séquence de l'ADN de lambda est connue on peut calculer le nombre et la taille des fragments obtenus par digestion avec n'importe quelle endonucléase de restriction. Ce marqueur peut être soit préparé au laboratoire, soit acheté dans le commerce.

- des marqueurs composés d'une série de fragments, chacun constitué de une à plusieurs répétitions d'un segment d'ADN de taille connue. Ces marqueurs sont achetés dans le commerce. Un exemple est l'échelle d'ADN de 1 kb de GIBCO BRL les différents fragments sont formés de 1 à 12 répétitions d'un segment de 1018 pb. En plus de ces 12 fragments l'échelle, contient des fragments qui varient entre 75 et 1636 pb. Ce marqueur peut être utilisé pour mesurer des fragments d'ADN linéaires bicaténaux longs de 0,5 à 12 kb.