**Séparation des acides nucléiques : (électrophorèse sur gel d'agarose) :**

1.Définition :

L'électrophorèse sur gel d'agarose est une méthode utilisée en biochimie et en biologie moléculaire pour séparer l'ADN, l'ARN ou des protéines en fonction de leur poids moléculaire. La technique de l'électrophorèse sur gel d'agarose est basée sur la séparation des acides nucléiques chargés négativement sous l'effet d'un champ électrique. Cette séparation s'effectue à travers la matrice du gel d'agarose : les molécules de plus petites tailles se déplacent plus rapidement et migreront plus loin que les molécules de tailles supérieures

2. Principe général:

L’électrophorèse est basée sur la séparation des acides nucléiques chargés négativement à pH 7~8, vers l'anode (+) sous l'effet d'un champ électrique. Cette séparation s'effectue à travers la matrice du gel en fonction de la taille des molécules. Deux sortes de matrice de gel sont utilisées: l'agarose et le polyacrylamide. Le gel agit à la manière d'un tamis moléculaire au travers duquel les molécules d'ADN en mouvement doivent passer ; les molécules de grande taille ont plus de difficulté pour passer à travers les mailles (pores) crées par le réseau des microfibres du gel et vont donc migrer plus lentement que les petites molécules.

3. Applications de l’électrophorèse :

• Séparation de fragments ADN digérés

• Estimation du poids moléculaire de fragment d'ADN après une digestion par des enzymes de restriction

• Analyse d'ADN après une amplification par PCR Les avantages de l'électrophorèse sur gel d'agarose sont les suivants: • préparation aisée, rapide, et peu coûteuse des gels d'agarose

• pas de dénaturation des échantillons

• l'agarose plus ferme et moins toxique que le gel de polyacrylamide

• les échantillons peuvent être récupérés en vue d'analyses supplémentaires

4. Facteurs affectant la migration :

Les facteurs les plus importants sont :

• la longueur de la molécule d'ADN : la séparation se fait en fonction du poids moléculaire et donc de la taille de l'ADN.

• la concentration du gel : L'augmentation de la concentration d'agarose dans un gel réduit la vitesse de migration et permet la séparation de fragment d'ADN de plus petite taille.

• le voltage : plus le voltage est important, plus la vitesse de migration augmente. Toutefois le voltage est limité en intensité (5V/cm): un fort voltage induit une augmentation de température ce qui peut faire fondre le gel.

• La conformation de l’ADN : l'ADN plasmidique, non digéré par une enzyme de restriction, migre à différentes vitesses (du plus lent au plus rapide) Plus on veut un gel discriminant, plus on augmentera le pourcentage d'agarose.

Agarose : L’agarose est un polymère à base d'agar purifié. Différentes puretés d'agarose sont disponibles. En général, de l'agarose de grande pureté à la solidification lente est utilisé lorsque l'ADN doit être extrait du gel après migration.

L'agarose est utilisé à des concentrations de 0,5% à 2% (poids/volume) et permet de séparer des molécules de très grande taille, principalement de l'ADN ou de l'ARN.

Tampons : Il existe un nombre très varié de tampons. Les plus souvent utilisés sont le Tris/Acétate/EDTA (TAE), le Tris/Borate/EDTA (TBE) et le sodium borate (SB). Le TAE possède le plus faible pouvoir tampon mais produit une meilleure séparation pour les fragments d'ADN de grande taille. Le SB est relativement nouveau et inefficace pour la séparation de fragments d'ADN d'une taille supérieure à 5000 paires de bases (5 kb). Cependant sa faible conductivité permet l'utilisation d'un plus fort voltage (jusqu'à 35V/cm), ceci réduisant considérablement le temps de migration. Des fragments d'ADN avec seulement quelques paires de bases de différences sont séparés en utilisant un gel d'agarose à 3 % et avec un tampon SB de très faible conductivité (1 mM lithium borate).

Révélation de l'ADN :

La méthode de révélation la plus utilisée est la révélation au bromure d'éthidium ou BET. Le bromure d'éthidium est un agent d'intercalation couramment utilisé comme marqueur d'acide nucléique dans les laboratoires de biologie moléculaire. Lorsqu'il est exposé à des rayonnements ultraviolets, il devient fluorescent avec une couleur rouge-orangée, 20 fois plus intense lorsqu'il est lié à l'ADN. Dans toutes les électrophorèses, des marqueurs de taille (ou de poids moléculaire) sont déposés et migrent parallèlement au DNA étudié. Une fois l'électrophorèse terminée, les molécules fluorophores, comme le bromure d'éthidium, qui se fixe à l'ADN en s'intercalant entre les bases. Les bondes d'ADN (regroupent toute les molécules d'ADN de taille identique) sont visualisées sous UV (figure 1).



1

6.1 Limites de résolution :

L'électrophorèse sur gel d'agarose permet théoriquement la séparation de fragments d'ADN d'une taille allant de 50 paires de bases à plusieurs millions. Cependant, elle est généralement utilisée pour la séparation de fragment d'une taille allant de 100 pb à 20 kpb. La durée moyenne de migration est d'une heure. Les petits fragments d'acides nucléiques sont mieux séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Les fragments de tailles importantes sont plus difficiles à séparer. En général, l'utilisation de gel d'agarose à forte concentration (3 à 4 %) est alors nécessaire pour des fragments inférieurs à 150 pb, car elle permet une meilleure séparation et résolution des différentes bandes en fonction de leur différence de taille. Le principal désavantage est le temps de migration, qui peut aller jusqu'à plusieurs jours. Pour pallier ces problèmes, il est avantageux d'effectuer une électrophorèse en champ pulsé. Après la migration d'électrophorèse, le gel est éclairé sous ultraviolet afin d'observer les bandes d'ADN fluorescente. Les bandes peuvent être alors découpées et séparées du gel, puis dissoutes afin de récupérer l'ADN purifié.

6.2.Détermination de la taille des fragments :

L'estimation de la taille des fragments est faite grâce à la comparaison avec l'échelle de marqueur de taille moléculaire (DNA-ladder) utilisée simultanément dans un autre puits lors de la migration. La mobilité relative est donc le rapport entre la distance de migration d'une bande et la distance de migration du front de migration.

7. L'électrophorèse en champ pulsé :

Pour séparer des fragments de taille supérieure à 50 kb. Le principe de cette électrophorèse consiste à changer l'orientation et/ou la polarité du champ électrique alternativement au cours du temps. A chaque modification du champ, la molécule d'ADN doit se réorienter parallèlement au nouveau champ. Le temps nécessaire à la réorientation est proportionnel à la longueur de la molécule. Lorsque le champ est rétabli dans son sens initial, la molécule doit une nouvelle fois se réorienter. Ces temps de réorientation provoquent un retardement de la migration nette qui est proportionnel à la taille de la molécule. Le support de migration est un gel d'agarose à 1% et la taille des fragments séparés est de l'ordre de 50 kb à quelque mégabases. Il n'est pas possible d'utiliser les méthodes classiques pour analyser des échantillons d'ADN (longueur environ 50 kb). Aussi les cellules dont on souhaite analyser l'ADN sont incluses dans un bloc d'agarose et la digestion par les enzymes de restriction est effectuée in situ. Puis on utilise le principe de l'électrophorèse en champ pulsé.