

## TP Séquençage de l'ADN par Sanger

### Matériel nécessaire :

- Le Kit en prêt au SAMS (Micropipette P20, 1 cuve électrophorèse MiniOne avec alimentation + support et peigne).
  - Les consommables à acheter : Agarose, GelGreen , TAE 10X, cônes pour pipette.
  - Le Kit prêt à déposer : 4 tubes A, B, C et D qui correspondent aux réactions de PCR avec ddntp et dntp, réalisées avec respectivement les bases A, C, G et T modifiées pour interrompre celles-ci.
- Deux solutions pour l'acquérir :**
- Acheter en dollar, en ligne : <https://www.edvotek.com/120>
  - Contacter la Conseillère technico-commerciale Occitanie jeulin pour l'acquérir par la voie de commande classique : [apaganin@jeulin.fr](mailto:apaganin@jeulin.fr) Tel : 06 88 24 35 35



### 1° - L'électrophorèse d'ADN avec la cuve MiniOne

#### a - Préparation du gel d'agarose

- Placer le support de gel dans son moule
- Préparer une solution de tampon TAE à partir de la solution concentrée 10 fois (verser 25 mL de la solution mère X10 dans une fiole jaugée de 250 mL et compléter à l'eau distillée jusqu'au trait de jauge)
- Dans un récipient en verre borosilicaté, verser 12 mL de la solution de TAE X1, peser 0,12g d'agarose
- chauffer le mélange en l'agitant doucement jusqu'à ce qu'il devienne complètement translucide, porter à ébullition
- ajouter 2  $\mu\text{L}$  de Gelgreen (colorant rouge) et continuer à agiter jusqu'à ce que le liquide soit uniformément coloré
- laisser refroidir à 50 – 60 °C.
- Couler le gel dans le moule, enlever les éventuelles bulles qui peuvent se former en les piquant avec la pointe d'un cône stérile
- poser le peigne à petites dents à sa place et attendre le refroidissement total du gel
- le gel peut ensuite être utilisé ou conservé quelques jours à température ambiante à l'abri de la lumière.

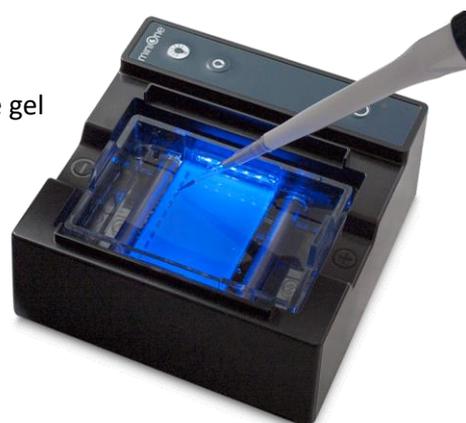


#### b - Préparation de la cuve à électrophorèse

- Retirer le peigne de manière à créer les puits.
- Placer le gel avec son support dans la cuve
- Verser 135 ml de la solution tampon TAE dans la cuve de manière à ce que le gel soit recouvert de tampon

#### c - Dépôts des solutions

Déposer dans chaque puits **8  $\mu\text{L}$**  de chaque solution en changeant la pointe de pipette pour chaque produit

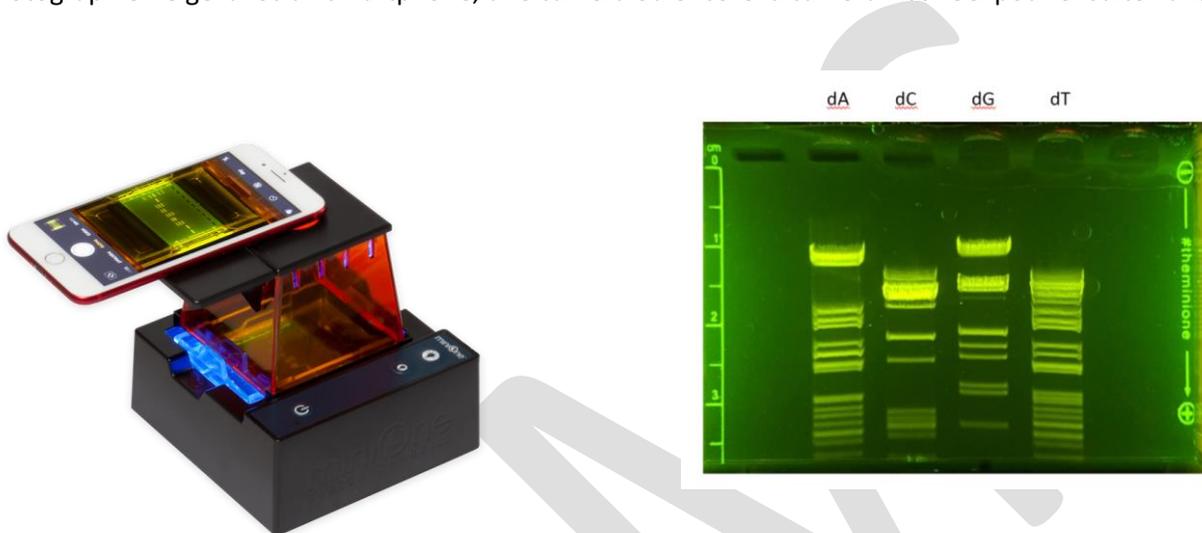


## d - Réalisation de l'électrophorèse

- Brancher le boîtier à son alimentation puis à une prise secteur.
- Positionner la chambre d'observation à sa place sur la cuve, puis appuyer sur le bouton marche du boîtier
- Arrêter la migration au bout de 15-20 minutes puis analyser le gel avec l'intensité lumineuse qui vous convient le mieux.

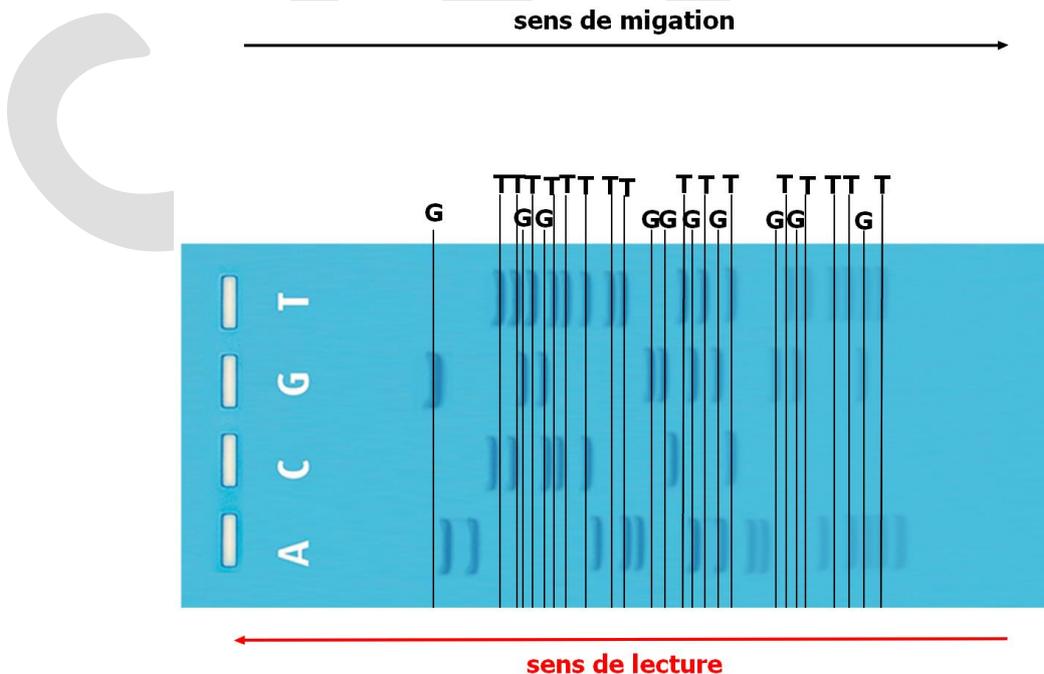
## 2° Les résultats obtenus – L'analyse des bandes d'ADN :

Photographier le gel avec un smartphone, une caméra ou encore la caméra FlashGel pour ensuite l'analyser.



## a - Analyse classique.

L'analyse peut être réalisée manuellement en traçant des lignes sur l'image au niveau de chaque bande pour reconstituer une séquence.



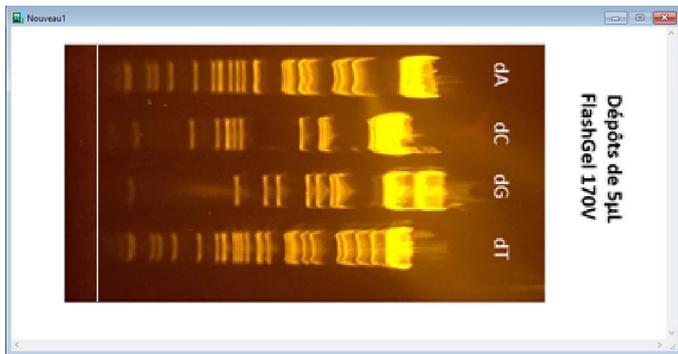
## Analyse partielle d'une séquence (image edvotek) (positions des G et T)

Si le résultat n'est pas assez précis sur toute la séquence on peut simplement demander une analyse restreinte sur la partie de l'image la plus nette.

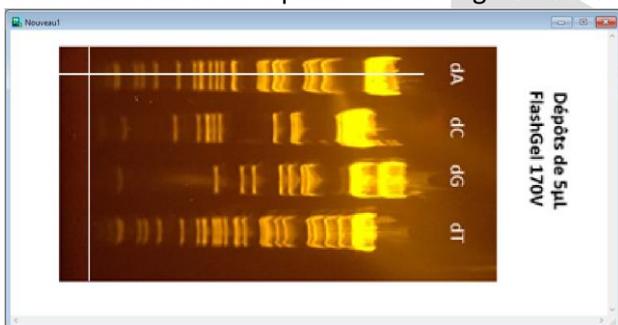
## b – Analyse en utilisant Mesurim (pro ou 2)

Pour « modéliser » les résultats obtenus dans les laboratoires de recherche, on peut utiliser Mesurim et obtenir des pics colorés pour chaque «trait» de migration.

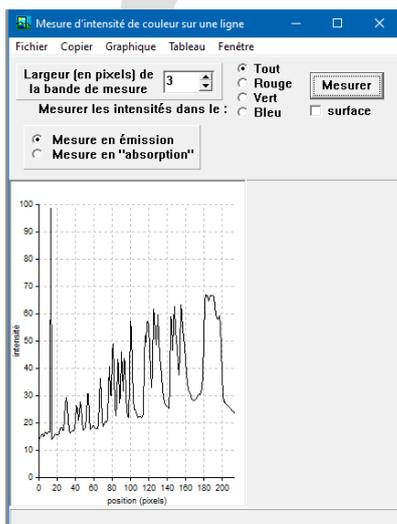
- Ouvrir l'image de l'électrophorèse des fragments d'ADN avec Mesurim\_pro (ici image obtenue avec un dispositif d'électrophorèse « FlashGel »)
- Noter sur l'image les dépôts réalisés après PCR.
- Orienter l'image. Zommer ou dézoomer si nécessaire.
- Placer un repère (trait blanc) sur l'image en avant des plus petits fragments.



- Cliquez sur choix puis outil de mesure puis lumière sous une bande
- Tracer une bande de 3 pixels sur les fragments dA



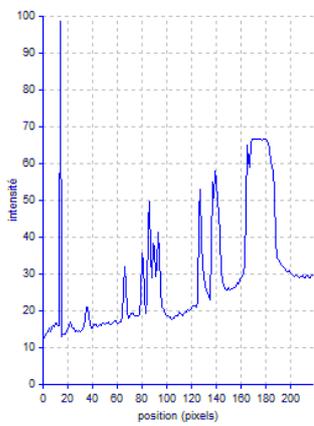
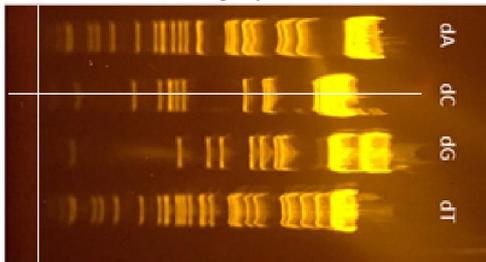
- Choisir une mesure en émission avec toutes les couleurs et choisir un fond blanc (Graphique, fond blanc)



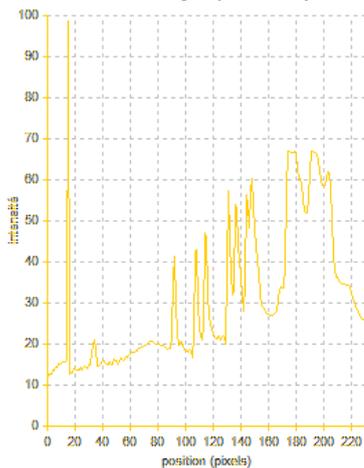
- Cliquer sur copier et ouvrir PhotoFiltre
- Dans PhotoFiltre, changer la couleur du graphique : Réglage, Remplacer une couleur Choisir la couleur 1 (noir) avec la pipette et la couleur 2 en vert.



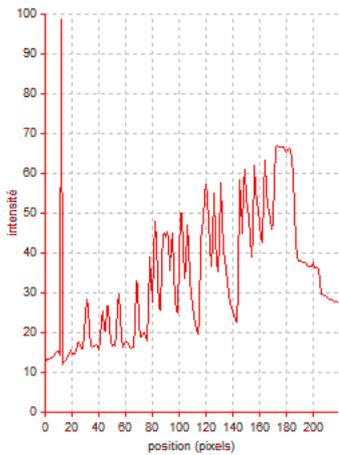
- Ne pas fermer PhotoFiltre
- Retourner dans Mesurim\_pro
- Refaire la même démarche en traçant une ligne sur les fragments dC
- Mesurer l'émission sous cette bande pour obtenir un autre graphe.
- Colorer le graphe en Bleu



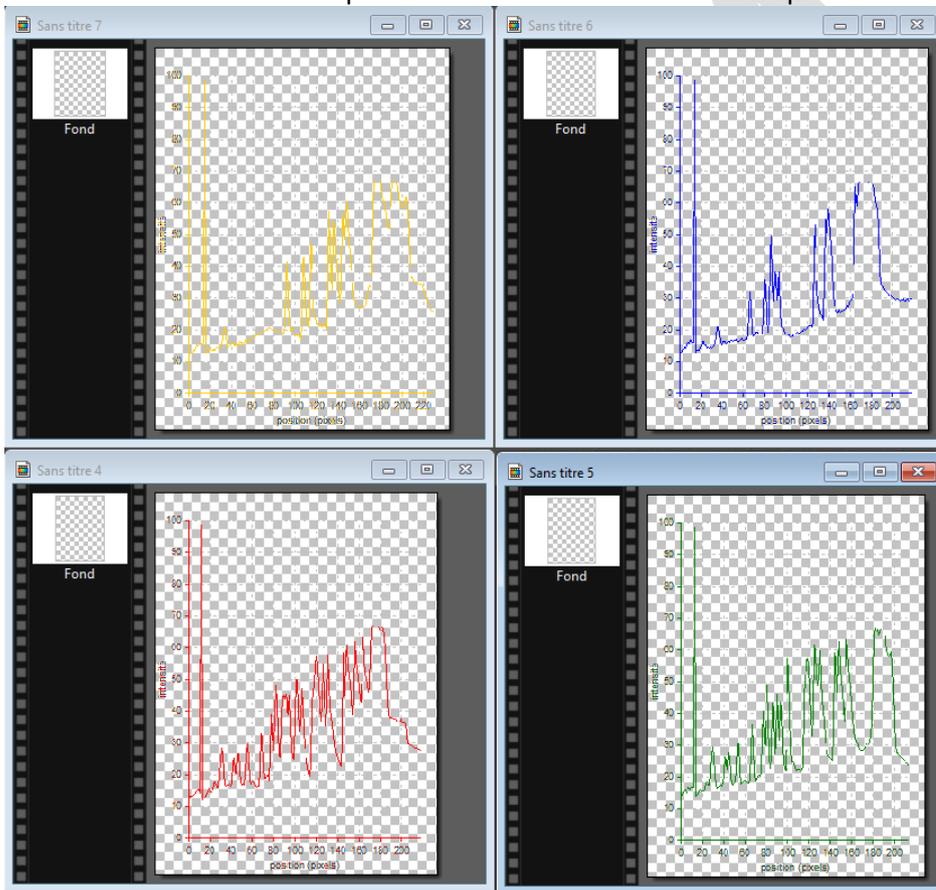
- Retourner dans Mesurim\_pro et refaire la même démarche pour les dG
- Colorer le graphe en jaune



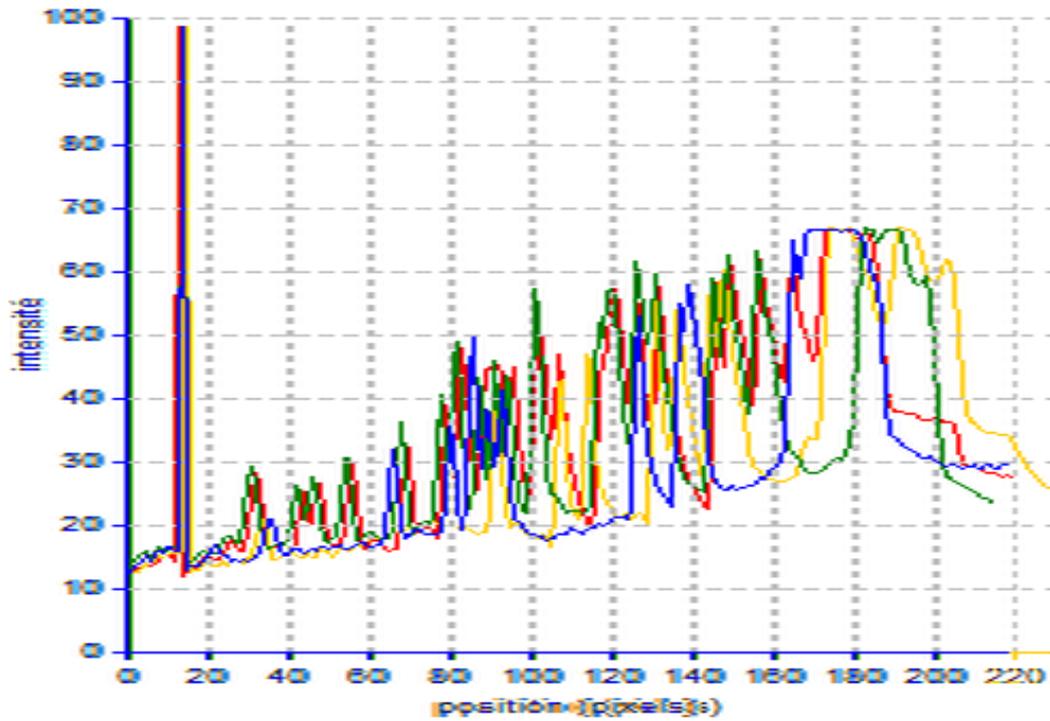
- Retourner dans Mesurim\_pro et refaire la même démarche pour les dT
- Colorer le graphe en rouge



- Dans PhotoFiltre, rendre trois des quatre images transparentes : Image, couleur de transparence, choisir le blanc comme couleur de transparence. Refaire la même démarche pour les 3 images.



- Dans PhotoFiltre, afficher l'image non transparente et superposer les images grâce à un copier-coller. Le pic correspondant à la ligne de repère tracée initialement, permet de superposer les graphes correctement.



En étirant en largeur la taille de l'image, on peut rendre le graphe plus « lisible »

c - Lecture d'une séquence

On peut alors déterminer l'ordre des 10 ou 15 premiers nucléotides grâce aux pics colorés

Ex : ATGCATATATCATATC