

1 ELECTROPHORESE EN CHAMP PULSE

PRINCIPE

Ce type d'électrophorèse a été développé par Schwartz et Cantor en 1984 afin de séparer les grandes molécules d'ADN (> 50 kb) que l'électrophorèse classique en gel d'agarose ne permet pas de résoudre, même en diminuant au maximum la concentration d'agarose (en dessous de 0.4% les gels sont impossibles à manipuler). La porosité d'un gel d'agarose classique est inférieure au micron alors que la longueur d'une molécule d'ADN de 50 kb complètement étirée est d'environ 18 microns. La vitesse de migration des molécules d'ADN dont la taille est supérieure à 20 kb n'est plus affectée par l'effet de filtration, elle est constante quelle que soit la taille de la molécule.

Le principe de l'électrophorèse en champ pulsé consiste à alterner l'orientation du champ électrique au cours du temps. Chaque changement de champ électrique réoriente la molécule d'ADN dans le gel augmentant ainsi la probabilité que la molécule d'ADN soit orientée de façon à passer à travers les mailles du gel. Cette probabilité dépend de la taille de la molécule et la vitesse de migration d'un fragment d'ADN dans le gel varie dans le sens inverse de sa taille. L'électrophorèse en champ pulsé permet ainsi de séparer des fragments d'ADN d'une taille allant de moins de 1 kb à une dizaine de mégabases. Pour ce type d'électrophorèse, il n'est pas possible d'utiliser des ADN purifiés par les techniques classiques car ces techniques les cassent en fragments d'une taille inférieure à 100 kb. Pour éviter la cassure mécanique des molécules d'ADN les cellules sont incluses dans des blocs d'agarose. Différentes techniques de champ pulsé ont été développées : OFAGE, CHEF, FIGE, TAFE, etc. Les conditions d'électrophorèse dépendent de la zone de taille à résoudre.

Le marqueur de tailles que nous utilisons le plus fréquemment, servant de référence pour la taille des fragments, est l'ADN de *Saccharomyces cerevisiae*.

Références :

- Schwartz, D.C. and C.R. Cantor (1984) Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*. 37 : 67.
- Chu, G., D. Vollrath and R.W. Davis (1986) Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric field. *Science*. 234:1582.

MATERIEL

- Appareil à champ pulsé, portoir et peigne
- Anses jetables en plastique

SOLUTIONS

- Agarose Seakem (FMC)
- Tampon TBE 10 X (pH 8,3) :

Tris base	121,1 g/l
Acide borique	61,1 g/l
EDTA disodique	9,3 g/l

- Bromure d'éthidium (BEt) : solution stock aqueuse à 10 mg/ml (Gibco BRL)
- ATTENTION : le bromure d'éthidium est mutagène. Porter des gants pour le manipuler.*

PROTOCOLE DE PREPARATION DU GEL

- Préparer 300 ml de tampon TBE 0,25 X.
- Peser la quantité d'agarose correspondant à la concentration désirée.
- Dans un erlenmeyer de capacité suffisante (2-3 fois le volume du gel), mettre le tampon et ajouter la poudre d'agarose. Peser le tout.
- Dissoudre l'agarose dans un four à micro-ondes jusqu'à disparition complète des particules d'agarose : la solution doit devenir limpide. Repeser et réajuster le volume avec de l'eau distillée.
- Refroidir l'erlenmeyer au bain marie à 50°C.
- Placer le cadre sur le portoir du gel puis positionner le peigne.
- Verser le gel d'agarose dans le moule et laisser solidifier (au moins 30 min).

PROTOCOLE D'ELECTROPHORESE

- Enlever délicatement le peigne et les barrettes.
- Placer les blocs et les marqueurs de taille dans les puits.
- Mettre du tampon TBE 0,25 X dans la cuve à champ pulsé et le refroidir à la température souhaitée pour la migration. Il faut avoir mis en marche le système de refroidissement de la cuve quelques heures auparavant.
- Immerger le gel dans la cuve d'électrophorèse.
- Programmer la migration. Ce programme dépend de la taille des fragments à séparer. Dans le cas de l'ADN de *Saccharomyces cerevisiae*, les conditions suivantes permettent de résoudre tous les chromosomes :

Temps de pulse initial	60 s
Temps de pulse final	120 s
Temps de migration	72 h
Volt/cm	6
Angle	120°
Température	14°C

Porter des gants pour manipuler le matériel contenant du bromure d'éthidium et porter un masque et des lunettes de protection spéciales devant l'appareil à UV

- Arrêter l'appareil à champ pulsé, sortir le gel et le déposer dans un bac contenant une solution de BEt à une concentration finale de 0,01 µg/ml. Colorer le gel pendant 30 min.
- Pour observer les fragments d'acides nucléiques, utiliser les UV $\lambda = 254$ nm, s'il s'agit de fragments d'ADN à extraire, utiliser les UV $\lambda = 320$ nm.