	Instruction P32 P33	
	Bleu-Form. SSR/AFLP acryl.	

Bleu-Formamide pour AFLP et microsattellites en gel de polyacrylamide

Sommaire

1. Objectif /Principe	1
2. Consignes de sécurité.....	1
3. Matériel utilisé	2
4. Réactifs	2
5. Opérations préalables	3
6. Protocole expérimental.....	3
A. Déionisation de la formamide.....	3
B. Préparation du Bleu-Formamide.....	4
7. Hygiène et élimination des déchets.....	4

1. Objectif /Principe

Le formamide est pratiquement indispensable pour obtenir l'ADN dénaturé qui sera soumis à l'électrophorèse.


La solution de "Bleu Formamide" préparée inclut également deux colorants indicateurs de la migration et du sucrose qui densifie l'échantillon afin qu'il reste au fond des puits des gels.

Le présent mode opératoire correspond au Bleu Formamide pour migration en gel d'acrylamide, à concentration 2X.

Le formamide sera préalablement déionisé.

2. Consignes de sécurité

Le formamide (synonymes carbamaldéhyde, méthanimide, formule brute CH_3NO) est considéré comme hautement toxique : irritation des voies respiratoires, risque d'effets sur le système nerveux central, cause d'irritation oculaire et cutanée, risque d'effets sur la reproduction et sur le fœtus, nocif si avalé, inhalé ou absorbé par la peau, hygroscopique ; organes-cibles: système nerveux central, foie, yeux, système reproducteur, peau, muqueuses. Noter que chauffé à plus de 90°C , le formamide se décompose en acide cyanhydrique (HCN) et vapeur d'eau.

	Instruction P32 P33	
	Bleu-Form. SSR/AFLP acryl.	

Se protéger des vapeurs en travaillant sous hotte ; utiliser obligatoirement blouse et gants.

Respecter les consignes générales de sécurité en laboratoire P33.

3. Matériel utilisé

- hotte
- béchers, entonnoirs, pipettes


4. Réactifs

<i>Nom du réactif</i>	<i>Formule chimique, caractéristiques</i>
formamide	synonymes: carbamaldehyde, methanamide, CH ₃ NO, MW 45.04
bleu de bromophénol	3,3',5,5'-Tetrabromophenol sulfonphthalein; 4,4'-(3H-2,1-benzoxathiol-3-ylidene)bis[2,6-dibromophenol] S,S dioxide
xylène cyanole	synonymes xylene cyanole FF, cyanol FF, MW 538.61
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid disodium salt dihydrate, C ₁₀ H ₁₈ N ₂ O ₁₀ Na ₂ , MW 372.20
soude 4N	sodium hydroxyde, natriumhydroxid, NaOH, MW 40
sucrose	saccharose

Voir les fiches correspondant à ces différents produits pour leur toxicité et les précautions réglementaires.

A titre indicatif :

<i>Nom du réactif</i>	<i>Toxicité</i>	<i>Protection cutanée</i>	<i>Protection oculaire</i>	<i>Protection respiratoire</i>
formamide	Toxique - Eviter l'exposition - En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin	X	selon conditions opératoires	X (hotte)
bleu de bromophénol	faiblement irritant (peau, yeux, ingestion)	X		
xylène cyanole	irritant - irritant pour yeux - éviter contact yeux - contact yeux: rincer immédiatement bcp eau, médecin - vêtements de protection adaptés	X		
EDTA	non toxique			

	Instruction P32 P33	
	Bleu-Form. SSR/AFLP acryl.	

sucrose	non toxique			
soude 4N	corrosif - graves brûlures - contact yeux : laver immédiatement et abondamment avec eau et consulter spécialiste	X	selon conditions opératoires	

5. Opérations préalables

Vérifier les stocks existants ; décider pour une préparation de 1 l ou 0.5 l.

Vérifier que la hotte sera libre.

Préparer verrerie, filtre ..

6. Protocole expérimental


A. Déionisation de la formamide

pour 500 ml de formamide :

- mettre un papier alu sur le plateau de l'agitateur magnétique sous la hotte
- allumer la hotte
- peser dans un bécher de 1 liter, 25 g de résine AG® 501-X8 (BIORAD®-Analytical Grade Mixed Bed Resin)
- poser le bécher sur le support (+alu) sous la hotte et qsp. 500 ml de formamide (armoire produits dangereux)
- avec barreau magnétique, agiter lentement 2 h ; couvrir avec alu, inscrire "FORMAMIDE !!"
- filtrer, toujours sous la hotte, avec entonnoir plastique + papier Whatmann dans une bouteille recouverte d'alu. Rq.: ne pas verser en grande quantité dans l'entonnoir pour ne pas déchirer le filtre
- essuyer l'entonnoir, vider le reste de résine dans le papier alu, essuyer le bécher, jeter les déchets dans la poubelle formamide (salle PCR P33)
- rincer bécher et entonnoir et envoyer en laverie

pour 1000 ml de formamide :

- même protocole, avec bécher 1,5 l et quantités :
 - 50 g résine AG® 501-X8
 - qsp. 1000 ml de formamide

	Instruction P32 P33	
	Bleu-Form. SSR/AFLP acryl.	

B. Préparation du Bleu-Formamide

pour 500 ml :

- remettre un papier d'aluminium sur le support d'agitation
- dans une fiole jaugée de 500 ml + petit entonnoir en verre, peser :
 - 62,5 g de saccharose (sucrose)
- sur petite balance, peser sur une feuille d'aluminium :
 - 0,25 g de bleu de xylène-cyanol
 - 0,25 g de bleu de bromophénol
- verser les 2 bleus dans l'entonnoir de la fiole, sous la hotte
- peser 3,7 g EDTA (20mM final), verser dans l'entonnoir
- rajouter un peu de formamide déionisée pour rincer l'entonnoir
- ajouter 1250 µl de NaOH 4N (10mM final)
- qsp. 500 ml avec la formamide déionisée
- mettre un barreau magnétique + parafilm, agiter manuellement par retournement puis avec l'agitateur magnétique à vitesse moyenne, pendant 1h pour bien dissoudre le sucre
- filtrer (entonnoir en verre) dans la bouteille marquée " Bleu-Formamide µ-sat & AFLP" + date

pour 1 l :

- même protocole, dans fiole jaugée 1000 ml avec quantités :
 - 125 g de saccharose (sucrose)
 - 0,5 g de bleu de xylène-cyanol
 - 0,5 g de bleu de bromophénol
 - 7,4 g EDTA (10mM final)
 - 2500 µl de NaOH 4N (10mM final)
 - qsp. 1000 ml avec la formamide déionisée

7. Hygiène et élimination des déchets

- blouse et gants obligatoires, lunettes fortement conseillées
- poubelle spéciale

Christopher Viot