

Identification géotypique La PCR

1-DEFINITION

La PCR a été mise au point au milieu des années 80 par Kary MULLIS (Prix Nobel de Chimie 93). C'est une technique d'amplification génique qui est devenu un outil quasiment universel dans le domaine de la Biologie (5, 33, 39). Elle est basée sur l'amplification d'un segment d'ADN compris entre deux régions de séquences connues par un procédé d'extension d'amorces (25). A l'instar du séquençage de l'ADN, elle a révolutionné la génétique moléculaire en ouvrant une toute nouvelle voie dans l'étude et l'analyse des gènes. Un gène spécifique est une cible difficile à atteindre, parce que rare dans un génome complexe. C'était l'un des problèmes majeurs que la plupart des techniques utilisées en génétique moléculaire essayaient de surmonter. Ces techniques très coûteuses impliquaient des étapes de clonage, puis de détection de séquences d'ADN spécifique. La PCR a changé tout cela en permettant de produire des nombres gigantesques de copies de séquences d'ADN spécifique, sans pour autant passer par une étape de clonage (13, 25, 30).

2-PRINCIPE

La PCR est basée sur la capacité de l'ADN polymérase qui utilise comme matrice de l'ADN monocaténaire pour la synthèse d'un nouveau brin complémentaire. Ces matrices d'ADN monocaténaire peuvent être

obtenues simplement en chauffant de l'ADN bicaténaire à des températures proches du point de fusion de la molécule.

La Taq polymérase requiert aussi pour son fonctionnement une petite région d'ADN double brin pour initier la synthèse. Le point de départ peut donc être spécifié par l'hybridation d'un oligonucléotide complémentaire à une séquence déterminée de la matrice pour servir d'amorce (Primer) (24, 30), c'est la première caractéristique essentielle de la PCR.

Les deux brins d'ADN peuvent servir de matrice pour la synthèse, sous réserve que l'on fournisse un oligonucléotide amorce pour chacun des brins. Dans cette technique, les deux oligonucléotiques amorces sont choisis de façon à encadrer la séquence d'ADN à amplifier de sorte que chaque brin nouvellement synthétisé s'étend au-delà de la position de l'amorce sur le brin opposé. Il se crée ainsi sur chacun des brins nouvellement synthétisés de nouveaux sites qui permettent la fixation des amorces. A la fin de chaque cycle, le nombre de brins d'ADN est multiplié par deux. Le résultat net de la PCR est qu'à la fin de n cycles, on dispose d'un maximum théorique de 2^n molécules d'ADN double brin qui sont les copies de la séquence située entre les deux amorces. C'est la seconde caractéristique de la PCR ; le résultat est l'amplification d'une région spécifique.

Dans la pratique, le rendement est beaucoup plus faible, et n'atteint jamais 100%. Toutefois l'expérience montre que si le rendement est inférieur à 70%, cas de séquences d'ADN difficiles à amplifier, les produits d'amplification sont détectables par simple coloration des gels d'électrophorèse lors de l'analyse du produit d'amplification.

Pour surmonter ces écueils, un nombre de cycles de 30 à 40 est recommandé ; car un nombre de cycle trop élevé provoque l'accumulation des produits non spécifiques.

3- REALISATION PRATIQUE

3-1- Extraction de l'ADN

Les acides nucléiques sont extraits à partir d'échantillons biologiques variés : le sang la culture cellulaire, le crachat, tissus divers,... Les méthodes utilisées pour libérer les acides nucléiques dépendent de :

- la nature du spécimen et, en infectiologie, de celle du micro-organisme étudié. La lyse d'un mycoplasme est obtenue par simple ébullition et le lysat de qualité suffisante pour être directement amplifié par PCR. En revanche, la libération des acides nucléiques contenus dans une mycobactérie nécessite un traitement plus drastique, à savoir un traitement basé sur l'utilisation d'ultrasons ou bien associant soit sonde et chauffage, soit détergent (SDS) et protéinase K, à cause des parois des mycobactéries qui sont très résistantes.

- la nature de l'ADN. On distingue deux familles particulières d'ADN. La première est celle de l'ADN génomique ou chromosomique d'organismes eucaryotes ou procaryotes. C'est celle qui est analysée en diagnostic clinique. La seconde famille rassemble les ADN recombinants d'origine plasmidique (ou phagique). A ces deux familles correspondent deux grandes méthodes d'extraction, qui présentent un certain nombre de points communs, les principes de base étant sensiblement les mêmes (30).

Notre travail se limite à l'étude de l'ADN génomique ou chromosomique.

3-1-1- Extraction de l'ADN génomique ou chromosomique

L'ADN peut être extrait par l'emploi de nombreux Kits d'extraction disponibles ou par l'emploi de méthodes standard Phénol/Chloroforme.

-Méthode du Phénol/Chloroforme

Elle comporte trois étapes : une étape de lyse de la cellule et de dénaturation des complexes nucléoprotéiques pour libérer l'ADN du milieu intracellulaire, une étape d'extraction proprement dite pour éliminer les protéines et en fin une étape de précipitation pour purifier l'ADN.

-Lyse :

Un système couramment utilisé, adaptable à tout type de spécimen, est le mélange détergent / protéinase K qui dissocie les cellules, les tissus, les enveloppes des virus et libère les acides nucléiques. Les détergents les plus usités sont le Sodium Dodécyl Sulfate ou SDS, qui est un agent de Lyse cellulaire ainsi qu'un activateur de la protéinase K, le Sarcosyl, le Tween 20, le Nonidet P40...(24).

-Extraction proprement dite :

L'ADN contenu dans le lysat est séparé des protéines en appliquant la technique du Phénol/Chloroforme. Le Phénol est un puissant agent déprotéinisant. Son addition à une phase aqueuse a pour effet de dénaturer les protéines en solution dans le milieu : après centrifugation, elles se situent à l'interface entre la phase aqueuse qui contient les acides nucléiques et la phase organique. Après transfert de la phase aqueuse dans un autre tube, les acides nucléiques sont traités par un mélange Chloroforme /alcool isoamylique. Cela a pour effet d'éliminer les traces de Phénol, composé organique qui présente l'inconvénient d'être non seulement un produit toxique mais également un inhibiteur de certaines enzymes dont la Taq Polymérase. A ce stade, après mélange, centrifugation et élimination de la

phase organique, les acides nucléiques sont à l'état soluble dans la phase aqueuse.

-Précipitation de l'ADN :

Elle permet l'obtention d'ADN pur et concentré. La précipitation se fait, soit à l'éthanol 100% (dans ce cas, elle a lieu à -80°C et en présence de sels tels que l'acétate de Sodium), soit à l'isopropanol (le sel n'est pas nécessaire et la précipitation se fait alors à $+4^{\circ}\text{C}$). Il faut ajouter deux volumes d'alcool par volume d'échantillon. L'isopropanol est utilisé volume/volume. Par conséquent, on préfère utiliser l'isopropanol pour des échantillons de grand volume. Un lavage ultérieur à l'éthanol 70% est indispensable pour éliminer les sels. Le précipité est repris par du tampon à faible force ionique : en général il s'agit du tampon TE (Tris 10 mM, EDTA 1mM).

3-1-2- Estimation des quantités d'ADN

Par lecture au spectrophotomètre

La quantité d'ADN simple et double brin peut être calculé par spectrophotométrie en mesurant à 260 nm et 280 nm la densité optique (D.O) d'une dilution au $1/50^{\text{e}}$ et $1/100^{\text{e}}$ de la solution à doser. Le calcul suivant permet d'en déduire la concentration.

$$\text{Concentration } (\mu\text{g/mL}) = 50 \times (\text{facteur de dilution}) \times \text{D.O}_{260\text{ nm}} \quad (1, 2)$$

La mesure de la D.O à 280 nm permet de s'assurer de l'absence de contamination significative par les protéines. Le rapport $\text{D.O}_{260\text{nm}}/\text{D.O}_{280\text{nm}}$ doit être compris entre 1,7 et 2. S'il est inférieur à 1,7, il existe une

contamination qui impose de pratiquer une seconde extraction. Un rapport supérieur à 2 témoigne de la présence d'une quantité importante d'ARN.

L'absorption à 270 nm permet de mettre en évidence une éventuelle contamination par le Phénol (25). Ainsi pour de l'ADN pur, l'appréciation de la quantité se fait par une lecture à 260 nm.

1D.O (à 260 nm) = 50 ng/μl pour le DNA double brin

1D.O (à 260 nm) = 40 ng/μl pour le DNA simple brin

- **Par Fluorimétrie**

On utilise une longueur d'onde d'excitation de 365 nm et d'émission de 460 nm. Cette technique est plus sensible que la spectrophotométrie. De plus, il est possible de travailler sur de faibles volumes (10μl). Cette méthode présente cependant un inconvénient : elle est sensible à la composition en bases (le fluorochrome se fixe préférentiellement sur les ADN riches en A et T). Le standard utilisé devra avoir une composition en GC proche de celle de l'ADN mesuré (les cellules eucaryotes ont une composition en GC de 39 à 46%, en moyenne, et les cellules procaryotes de 26 à 77%). Cette technique ne quantifie pas l'ARN.

- **Par Minigel**

Lorsqu'on ne dispose pas de DNA en quantité suffisante pour mesurer la D.O en U.V, une estimation sur minigel peut être effectuée (22). L'intensité de la tâche observée en U.V (après contact du Bet) est comparée à celle donnée par un DNA standard disposé en quantité connue.

3-1-3- Autres méthodes d'extraction d'ADN

L'emploi d'agents chaotropiques tels que l'iodure de Sodium (NaI) ou le thiocyanate de guanidium (GTC), suivi de précipitation par des alcools (éthanol, isopropanol), produit des acides nucléiques qui sont compatibles avec les techniques d'amplification génique.

- L'utilisation d'agents adsorbants ; en présence de GTC à forte concentration ; la Silice fixe l'ADN. L'usage des particules de verre et de certaines résines anioniques telles que le Chelex-100 à 20% (Biorad) aboutit à un résultat semblable. Après lavage, les acides nucléiques sont élués par un tampon de faible force ionique. Dans ces conditions, l'ADN obtenu a un grand degré de pureté, les agents contaminants étant éliminés au cours des étapes de lavage ;

- La capture sur des billes magnétiques ;

- L'ADN libéré par simple lyse des cellules à l'aide d'ultrasons peut être de qualité suffisante pour être amplifié ;

- Une simple ébullition est suffisante pour libérer les acides nucléiques et les rendre amplifiables par PCR (16).

3-2- Les acteurs de la PCR

- L'ADN généralement bicaténaire, contenant le fragment à amplifier,

- Deux amorces, sens et antisens choisies de façon à encadrer la séquence d'ADN à amplifier. En effet se sont de petits brins d'ADN d'environ 20 bases (appelées oligonucléotides) capables de s'hybrider de façon spécifique, grâce à la complémentarité des bases, sur le brin d'ADN ou son brin complémentaire (22)

- Une enzyme ; la Taq Polymérase (Taq Pol), est une ADN polymérase thermorésistante extraite de la bactérie *Thermus aquaticus*. En effet, elle est

capable de résister à des passages successifs à 95°C, ce qui a rendu possible l'automatisation de la procédure.

- Les 4 nucléotides ; dGTP , dATP , dCTP, dUTP appelés globalement dNTP (Désoxynucléotides Triphosphate), qui sont des éléments de base utilisés par la Taq pour synthétiser les brins complémentaires (13).

3-3- La Réaction

Une fois tous les acteurs de la PCR mis dans un tube, celui-ci est placé dans un thermocycleur automatisé (Minicycler, MjResearch). En effet, un total de 35 cycles est réalisé lors du processus d'amplification. Chaque cycle contient 3 phases:

- une phase de dénaturation : l'ADN contenant le segment à amplifier est chauffé à une température supérieure au melting temperature (T_m) (dans la pratique une température de 94°-95°C) pendant 30 secondes à 1 minute, en présence des composants nécessaires à la réplication. Ces brins serviront de matrice au cours des cycles d'amplification.

- une phase d'hybridation (ou annealing) faisant intervenir les deux primers pendant 30 secondes à 1 minute. Le milieu réactionnel contient deux amorces, chacune complémentaire d'un des brins. Celles-ci déterminent les bornes de la séquence à amplifier. Le milieu est amené, à une température inférieure à la température des amorces. Cette T_m , fonction de la séquence, est, en général, de l'ordre de 45 à 70 °C. Les amorces, en large excès, s'hybrident à tout ADN simple brin comportant la séquence complémentaire.

- une phase d'extension pendant 1 à 2 minutes :

La Taq polymerase allonge les amorces en y incorporant les désoxyribonucléotides complémentaires de la séquence de la matrice à laquelle elle est hybridée. La synthèse s'effectue dans le sens 5'----3' à 72°C, température optimale. A la fin du cycle, deux copies de la séquence d'ADN cible sont obtenues.

Un nouveau brin d'ADN, dont la séquence est complémentaire de celle du brin cible, vient d'être synthétisé. En effet, que se passe-t-il ?

Le premier cycle a permis de synthétiser autant de brins complémentaires (plus courts puisque bornés par une amorce) que de brins cibles présents dans le tube. Ils deviennent à leur tour des ADNs cibles. Un nouveau cycle commence par l'étape de dénaturation, suivie successivement des étapes d'hybridation et d'extension. A chaque cycle correspond le doublement du nombre de copies de la séquence cible. Cette technique a évolué considérablement. De nouveaux types de PCR ont été introduits.

3.3.1 Optimisation de la PCR

Principe du choix des amorces

Des logiciels permettent de définir rapidement des amorces dans une séquence donnée, par exemple, Oligo 5. 0™ (National Biosciences / intelligenetics). Voici quelques principes généraux utiles pour <<dessiner>> une amorce :

- Taille : 20 à 30 pb
- Amorces, de séquence exactement complémentaire du fragment à amplifier, avec une composition de 50% en G+C
- Absence d'hybridation des amorces sur elles-mêmes et entre elles notamment en 3'
- Les amorces ne doivent pas faire des boucles (loops) sur elles-mêmes.

- La température de fusion ou melting temperature (T_m) des amorces doit être suffisamment élevée (au minimum 55°C , quand cela est possible). Idéalement, plus le T_m d'une amorce est élevé, moins le risque d'hybridation non spécifique est important.

Gamme de Concentration de MgCl_2

Pour optimiser une PCR, il est nécessaire de faire une gamme de concentration chlorure de magnésium (MgCl_2). En effet, l'ion Mg^{2+} est un cofacteur essentiel de la Taq Polymérase, c'est-à-dire un élément non protéique se liant à l'enzyme afin de la rendre active. Ce cation bivalent interagit également avec les charges (-) de la chaîne d'ADN, limitant ainsi les forces de répulsion entre brins d'ADN et favorisant donc la stabilité de l'hybridation. En général, on fait varier la concentration de MgCl_2 de 1,0 à 4,0 mM : le plus souvent, les concentrations de MgCl_2 qui réussissent le mieux vont de 1,5 à 2,0 mM. Il existe une relation inverse entre la quantité de dNTPs utilisée et la concentration de MgCl_2 (les dNTPs, en effet, chélatent une partie des ions Mg^{2+} et, par conséquent, une partie des dNTPs diminue la concentration disponible d'ions Mg^{2+} libres).

Concentration de Taq polymérase

Il est inutile de mettre trop d'enzyme. Pour 50 μl de réaction, 0,2 à 0,5, voir jusqu'à une unité suffit. Une quantité trop importante d'enzyme donne souvent un bruit de fond important (bandes parasites), voire une inhibition de la réaction.

Séquences à amplifier riches en GC

Les séquences riches en G et C, de même que les séquences riches en structures II^{aires}, posent un problème car les températures à fournir pour les dénaturer sont élevées et parfois peu efficaces. Les rendements de PCR sont en conséquences très abaissés, voire nuls. Plusieurs solutions sont ainsi possibles :

- ajouter 5 à 10 % de DMSO (V/V) dans le milieu réactionnel
- utiliser du glycérol à une concentration de 2 à 5 % (voire jusqu'à 20%).

PCR et les contrôles

Au niveau des tubes, pour chaque série de PCR, il est indispensable d'effectuer un contrôle positif et, de préférence plusieurs contrôles négatifs.

Le contrôle positif

On utilise un ADN témoin connu qui permet de vérifier les bonnes conditions de préparation du mélange réactionnel, d'amplification et de détection. Il faut un nombre de copies raisonnablement faibles afin de contrôler la sensibilité de la méthode.

Les contrôles négatifs

Deux contrôles sont utilisés : un premier contrôle, il s'agit d'un tube contenant tous les réactifs et l'enzyme mais sans ADN. Il permet de s'assurer que qu'aucun réactif ni l'enzyme n'est contaminé. Un second contrôle est constitué d'un tube contenant en plus des réactifs et de

l'enzyme, un ADN témoin non amplifiable avec des amorces utilisées, est ajouté. Il permet de vérifier la spécificité de la réaction.

3.3.2 Contamination

Le risque de contamination est le problème majeur et permanent de la PCR. C'est ainsi que, pour réaliser une PCR plusieurs précautions sont à prendre:

- aliquoter tous les réactifs en petits volumes
- stériliser les tampons, les pointes de pipettes, les tubes
- décontaminer les pipettes à l'eau de javel diluée ou utiliser un système chimique anticontamination.
- disposer d'une pièce de pré amplification avec des pipettes et des réactifs réservés pour chaque aire de travail
- ne jamais apporter les produits amplifiés dans la zone de pré amplification
- ne pas oublier d'irradier aux UV la zone de travail pendant environ 15 minutes, une fois le travail terminé.

3.3.3 Application

a- Nested-PCR :

- Nainn-Tsyr Jou et al (33), ont développé une Nested-PCR pour mettre en évidence les *M. tuberculosis*. Ils ont utilisé l'ADN comme matériel de base. Dans ces conditions le gène amplifié est la séquence d'insertion IS6110 et non le gène 85B.

Les primers utilisés sont spécifiques à cette séquence, et il s'agit :

- primers extérieurs : MRL29 et MRL30
- primers intérieurs : MRL31 et MRL32

Résultats

Cette technique a permis de distinguer les *Mycobactéries tuberculosis* des autres germes dans les cultures après 7 jours d'incubation.

Elle a montré une sensibilité de 83% contre 75% pour les cultures et sa spécificité est de 100%. Elle a l'avantage d'éviter les inhérentes contaminations potentielles.

b-Reverse-Transcriptase PCR (RT-PCR)

Elle a été utilisée pour distinguer les organismes viables des non-viables en se basant sur la demi-vie courte de l'ARN_m bactérien.

Les amorces choisies sont spécifiques du gène codant pour la protéine 85B des Mycobactéries :

- primers extérieurs : MRL41 et MRL42
- primers intérieurs : MRL43 et MRL44

Résultats

L'obtention d'un signal positif à 216 pb sur gel d'agarose indique la présence d'un organisme récemment viable. L'antigène 85B des Mycobactéries a donc été amplifié. Avec une sensibilité de 83%, cette technique a 100% de spécificité.

3.4 –PCR multiplex

-Principe

La PCR multiplex est l'amplification simultanée de plusieurs séquences cibles (deux au moins) dans un même tube d'amplification. Chaque amplification (dans le même tube) doit être indépendante des autres, le résultat devant être identique à celui obtenu isolément dans un tube avec un seul couple d'amorces. Chaque produit d'amplification doit avoir une taille peu différente de celle des autres pour obtenir à peu près la même efficacité de PCR, mais la différence doit être suffisante pour qu'on puisse les distinguer (par exemple, sur un gel d'agarose) (24, 33).

-Avantages

- plusieurs cibles peuvent être détectées en même temps dans un seul tube.
- des gènes de grande taille tels que le gène codant pour la dystrophie (2000 kb) peuvent être analysés par PCR multiplex.

-Inconvénients

La mise au point de cette technique est plus difficile que pour une PCR simple.

-Amorces

- . Chaque couple d'amorce doit être essayé seul.
- . La Tm des amorces doit être peu différente

- . Il ne doit pas y avoir des séquences homologues entre les amorces (pas de complémentarité partielle, surtout en 3').
- . Éviter les séquences répétitives dans les amorces
- . Chaque amorce doit avoir la même longueur (20 à 25 pb) et posséder le même contenu en pourcentage GC (proche de 50%).
- . Choisir les amorces pour lesquelles la concentration de MgCl₂ doit être identique.

3.4.1- Application

-Patricia Del Portillo, et al (36) ont développé une PCR pour l'identification différentielle des mycobactéries à partir des échantillons cliniques.

Pour la détermination du genre *Mycobacterium*, c'est le gène codant pour la protéine de surface alpha 32-KDa qui a été amplifié. Cette protéine n'est présente que chez les mycobactéries. Chaque espèce a une séquence unique sauf les membres du complexe *M.tuberculosis* pour qui le gène est identique. Le couple d'amorces utilisé est : MT1 et MT2
Une bande de 506 pb a été obtenue.

Pour la détermination de l'espèce *tuberculosis*, c'est le gène MTP40 qui a été amplifié (12). Ce gène code pour une protéine présente chez certains membres du complexe *M.tuberculosis* : *M.tuberculosis* et *M.africanum*

Le couple d'amorces utilisé est le suivant : PT1 et PT2

Une bande de 396 pb a été obtenue.

Pour la détermination du complexe *tuberculosis*, c'est la séquence d'insertion IS6110 qui a été amplifiée. Cet élément d'insertion ne se présente que chez les membres du complexe *M.tuberculosis*, c'est pourquoi il est utilisé pour mettre en évidence ce complexe mais il ne

permet pas d'en distinguer les différents membres. Le couple d'amorces étant : IS5 et IS6, une bande de 984 pb a été obtenue.

-Résultats :

Les résultats qui en découlent témoignent de la rapidité, de la sensibilité et de la spécificité de la méthode pour un diagnostic rapide de la tuberculose.

- Mustafa A.S, Abal A.T et Chugh T.D (3), ont aussi développé une PCR multiplex pour l'identification de *M. tuberculosis* du complexe *tuberculosis* et des mycobactéries non tuberculeuses.

L'objectif était d'évaluer la capacité des techniques PCR de co-amplification à identifier et différencier les *M. tuberculosis* des Mycobactéries non tuberculeuses.

Quatre différents fragments d'ADN de la séquence d'insertion IS6110, caractéristique du complexe *tuberculosis* ont été amplifiés. Les amorces utilisées sont :

- * KD1 et KD2, une bande de 123 paires de bases étant la taille de l'amplicon attendu.
- * HM1 et HM2, une bande de 245 paires de bases étant la taille de l'amplicon attendu.
- * SA1 et SA2, une bande de 375 paires de bases étant la taille de l'amplicon attendu.

- * SM1 et SM2, une bande de 580 paires de bases étant la taille de l'amplicon attendu.

La séquence d'insertion IS1081 caractéristique du complexe *tuberculosis* a aussi été amplifiée. Les amorces utilisées étant :

* SK1 et SK2, l'amplicon attendu est à 248 paires de bases.

Enfin, le gène codant pour le complexe antigène 85 spécifique du genre *Mycobacterium* aussi avait été amplifié. Les amorces utilisées sont :

* MD1 et MD2, l'amplicon attendu est à 162 paires de bases.

Deux co-amplifications sont réalisées, la première ayant comme cibles trois fragments d'ADN à savoir, le 375 paires de bases, le 248 paires de bases et le 162 paires de bases correspondant respectivement à l'amplification des séquences d'insertions IS6110 et IS1081, et du gène codant pour le complexe antigène 85, la deuxième amplifie deux fragments, l'un à 245 paires de bases et l'autre à 162 paires de bases correspondant respectivement à la séquence d'insertion IS6110 et au complexe antigène 85.

Résultats

Ces techniques ont permis de différencier les *M.tuberculosis* des Mycobacteries non tuberculeuses. La sensibilité des deux techniques était de 88%. Bien que ces deux techniques aient montré une spécificité de 100%, la sensibilité supérieure de la première laisse penser qu'elle pourrait être plus utile dans la diagnostic rapide de la tuberculose et dans la différenciation de *M.tuberculosis* du complexe *tuberculosis* des mycobactéries non tuberculeuses.

3.5- Autres types de PCR

La technique PCR ayant connu une évolution considérable, de nouveaux types de PCR ont été mis au point: il s'agit de la Single-Tube PCR, Double Repetitive Element-PCR (17).....

4-Electrophorèse

Les produits amplifiés peuvent être séparés par électrophorèse sur gel d'agarose. Les gels forment des mailles au sein desquelles les acides nucléiques passent. Dans ce type de gel, les migrations des fragments d'ADN dépendent de la taille du fragment plus que de la charge de celui-ci. Plus le fragment a une taille élevée, moins la migration électrophorétique par rapport au puit d'inclusion sera importante. La détermination précise des tailles des fragments séparés par électrophorèse est effectuée en faisant migrer les marqueurs de poids moléculaire en parallèle avec les échantillons à analyser. La détection de l'ADN sur ce type de gel est réalisée par exposition aux rayons U.V après réaction avec un réactif spécifique: le Bromure d'éthidium (BET), agent s'intercalant entre les brins d'ADN. Le BET, une fois intercalé entre les bases présente une fluorescence blanche sous lumière ultraviolette (UV de longueur d'onde 312 nm). En pratique, on ajoute du BET dans le gel, et après migration des acides nucléiques, l'ADN est visualisé sous forme d'une bande blanche, par illumination sous UV.

L'électrophorèse des fragments d'ADN en gel d'agarose permet des séparations de 0,5-50 Kb.

Des fragments de taille restreinte (inférieure à 500pb) peuvent être séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

D'autres techniques électrophorétiques existent: électrophorèse en champ pulsé, techniques DGGE (Denaturing Gel Gradient Electrophoresis) et SSCP (Single Strain Chain Polymorphism).