

Kit PCR Détection d'une résistance à un antibiotique



Le matériel :

- 1 Tube d'ADN d'un plasmide bactérien, « bactérie 1 » (tube à pastille rose )
- 1 Tube d'ADN d'un plasmide bactérien, « bactérie 2 » (tube à pastille blanche )
- 2 Tubes d'amorces AMP [Primer Mix] (tube à pastille bleue )
- 3 Tubes Taq polymérase + Nucléotides [PCR master Mix, prêt à l'emploi] (tube à pastille verte )
- 1 Tube marqueur de poids moléculaire [échelle de fragments calibrés d'ADN] (tube à pastille jaune  pour l'électrophorèse)
- 40 microtubes PCR 0,2 mL
- Thermocycleur
- Micropipette + cônes
- Gants
- Feutre à pointe fine
- Blouse



PHASE 1 : L'AMPLIFICATION



Paramétrage du thermocycleur

- Créer et enregistrer un programme « PCR Antibio » reprenant les caractéristiques ci-contre



Préparation du tube témoin T (une seule pour toute la classe)

«ADN avant amplification», il s'agit d'un tube avec l'ADN plasmidique mais sans Taq polymérase ni amorces.

1. Préparer un microtube PCR 0,2 mL et faire un repère pour identifier le tube T
2. Prélever **25 µL** d'eau distillée les placer dans le microtube PCR
3. Changer de pointe de micropipette
4. Prélever **2 µL** d'ADN à amplifier tube ()

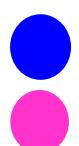


Préparation des tubes réactionnels (2 par binôme)

Dans un premier microtube PCR 0.2mL :

15 µl de PCR mix + 10 µl d'amorces AMP + 2 µl d'ADN à amplifier

1. Faire un repère pour identifier le tube B1
2. Prélever **15 µL** de Taq polymérase + nucléotide "PCR Master Mix" ()
3. Changer de pointe de micropipette
4. Prélever **10 µL** d'amorces "Primer Mix" () et mélanger par pipetage doux
5. Changer de pointe de micropipette
6. Prélever **2 µL** d'ADN à amplifier « bactérie 1 », le tube ()
Fermer le microtube PCR.



Prendre **un second microtube** PCR 0.2 ml, identifier le tube B2, refaire les étapes 2 à 5, y ajouter le point 7.

7. Prélever **2 µL** d'ADN à amplifier « bactérie 2 », le tube (blanc)
Fermer le microtube PCR.



Placer les tubes dans le thermocycleur.



S'assurer que le tube témoin T est présent.

Fermer le couvercle.

Sélectionner le programme « PCR Antibio ».



Placer le curseur sur puis **appuyer** OK → =cycle en cours (38 minutes environ)

PHASE 2 : RÉVÉLATION



Electrophorèse

Préparation du dispositif pour électrophorèse

- Poser la cuve à électrophorèse sur une surface parfaitement horizontale
- Poser le gel dans son support à l'intérieur de la cuve, les puits vers la cathode (borne négative)
Glisser un morceau de papier noir sous la cuve
- Remplir la cuve de TAE 1X, jusqu'à légèrement recouvrir le gel de 1 à 2 millimètres



Dépôts et migration

Les puits sont situés du côté du pôle négatif (noir) de la cuve à électrophorèse

Pour la classe :

- Déposer 8 à 10 µl du marqueur de Poids Moléculaire suivant le nombre d'électrophorèses (« échelle moléculaire » du gel – 
- Déposer 10 µl d'ADN fourni (tube  : permet de visualiser le plasmide et de déterminer sa taille
- Déposer 10 µl du tube témoin T « ADN avant amplification », ce témoin correspond à la concentration d'ADN présente avant l'amplification.

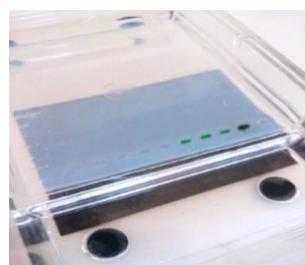


Chaque binôme :

- Dépose 10 µl d'ADN amplifié « bactérie 1 »
- Dépose 10 µl d'ADN amplifié « bactérie 2 »
- Poser le couvercle sur la cuve, ce qui ferme le circuit, régler l'alimentation en fonction du tampon utiliser (ex TAE 100 à 150 V maxi)



Allumer et attendre la migration **pendant 25 min** en 140 V.



Dépôt ADN
Un revêtement noir glissé sous la cuve, permet de mieux voir la position des puits

Lecture

- Utiliser le transilluminateur pour révéler les bandes d'ADN