

Kit PCR A la recherche du gène AMEL chez les oiseaux



Le matériel

- 1 tube échantillon de sang de poulet en solution (tube à pastille rose ■)
- 1 tube d'amorces (tube à pastille bleue ■)
- 1 tube PCR Mix [Nucléotides + Taqpolymérase] (tube à pastille verte ■)
- 1 tube DNA release [bloqueur de réaction] (tube à pastille rouge ■)
- 1 tube marqueur de poids moléculaire [échelle de fragments calibrés d'ADN] (tube à pastille jaune ■) pour l'électrophorèse
- 2 microtubes type Eppendorf 1,5 mL
- 2 microtubes PCR 0,2 mL
- Thermocycleur
- Micropipette + cônes stériles
- Feutre à pointe fine
- Gants et blouse

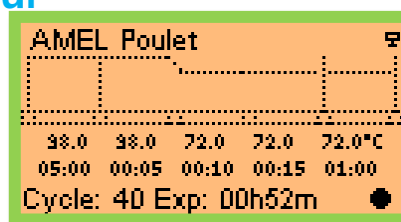


PHASE 1 : EXTRACTION et AMPLIFICATION



Paramétrage du thermocycleur

- Allumer et programmer le thermocycleur
- Principe : une amplification PCR de 40 cycles
[ou utiliser le logiciel pour PC ou tablette]



Préparation des tubes PCR

Identifier les tubes PCR destinés à recevoir les échantillons *Homo sapiens* homme, *Homo sapiens* femme, poulet *Gallus gallus*

Préparation des mélanges réactionnels

- Dans chaque microtube PCR 0.2 ml,
- **Prélever 20 µL** du "PCR Mix polymérase" (■) et les placer dans le microtube PCR. Changer de pointe de micropipette.
- **Prélever 20 µL** du "Mix Amorces" (■) et les placer dans le microtube PCR. Mélanger par pipetage doux. Changer de pointe de micropipette
- **Rajouter** un seul échantillon cellulaire (Humain ou poulet) suivant les protocoles proposés ci-après :



Prélèvement des cellules de l'épiderme (2 possibilités : Cellules buccales ou du dessus de la main)

Prélèvement buccal : à l'aide de l'embout pointu de l'anse stérile (fig.1),

- Effectuer un prélèvement intérieur de la joue en balayant cette dernière doucement de haut en bas 3 à 4 fois. Anse perpendiculaire (fig.2)

- Placer l'anse dans le microtube PCR et la faire tourner comme un mélangeur 3 à 4 fois puis la sortir en prenant soin de ne pas emporter trop de volume réactionnel (fig.3)

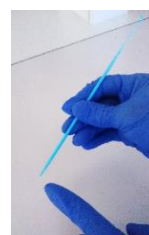


Figure 1



Figure 2

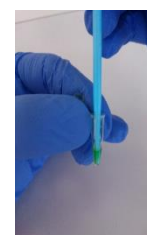


Figure 3

Ou

Prélèvement du dessus de la main : les mains doivent être propres et sèches.

- A l'aide de l'embout pointu de l'anse stérile, effectuer un prélèvement en appuyant et en frottant la peau du dessus de la main en balayant doucement de gauche à droite 3 fois sur une distance de 4 centimètres environ.

- Placer l'anse dans le microtube PCR et la faire tourner comme un mélangeur 3 à 4 fois puis la sortir en prenant soin de ne pas emporter trop de volume réactionnel (fig.3)



Figure 1



Figure 2

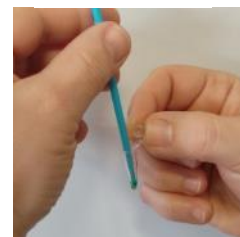


Figure 3

Echantillon chez le poulet

- Agiter le tube pour remettre les cellules en suspension
- Prélever **1 µL** de sang dilué (■) et l'introduire dans le microtube PCR
- Mélanger par pipetage doux au mélange réactionnel PCR
- Refermer les tubes

⇒ **maintenir les tubes dans le portoir réfrigéré jusqu'à l'amplification**



Amplification PCR

- Placer les dans le thermocycleur.
- Sélectionner le programme AMEL Poulet précédemment enregistré.
- Placer le curseur sur [●] puis appuyer OK → [■]=cycle en cours (0h55 environ)



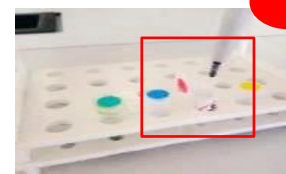
PHASE 2 : REVELATION



Electrophorèse

Préparation de l'ADN amplifié

- A faire pour chaque microtube : ouvrir délicatement le microtube et y ajouter **2 µL** de la solution "DNA-Release" (tube à pastille ■) Mélanger par pipetage doux



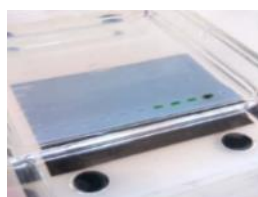
Préparation du dispositif pour électrophorèse

- 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

- Déposer **10 µl** du marqueur de Poids Moléculaire (« échelle moléculaire » du gel – ■)
- ADN amplifié : Déposer 10 µl d'ADN amplifié par PCR (1 puit par tube)
- Poser le couvercle sur la cuve
- Relier la cuve au générateur, en prenant bien garde à la polarité. Allumer et régler.



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