

Kit PCR Génotypage séquence ALU locus PV92



Le matériel

- 1 Tube d'amorce AME (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
- 1 microtube PCR 0,2 mL
- 1 anse stérile : prélèvement des cellules de l'épiderme
- Thermocycleur
- Micropipette + cônes stériles
- Gants
- Feutre à pointe fine
- Blouse

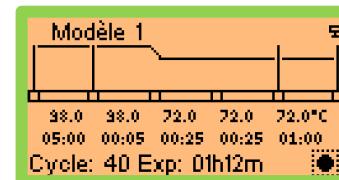


PHASE 1 : L'AMPLIFICATION



Paramétrage du thermocycleur

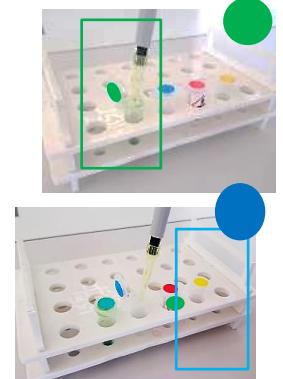
- Allumer et programmer le thermocycleur
 - Principe : une amplification de 40 cycles
- Correspond au **modèle 1** du thermocycleur Jeulin



Préparation des tubes réactionnels

Préparer un microtube PCR 0,2 mL et faire un repère pour identifier l'expérimentateur

1. Prélever 18 µL du "PCR Master Mix" () et les placer dans le microtube PCR
2. Changer de pointe de micropipette
3. Prélever 18 µL du "Primer Mix" () et les placer dans le microtube PCR
Mélanger par pipetage doux
4. Changer de pointe de micropipette
5. Faire le prélèvement des cellules de l'épiderme comme indiqué ci-dessous et déposer les cellules prélevées dans le tube



Prélèvement des cellules de l'épiderme

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)

Ou



Figure 1



Figure 2

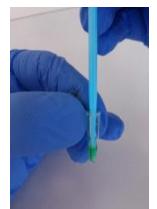


Figure 3

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.



Figure 1



Figure 2

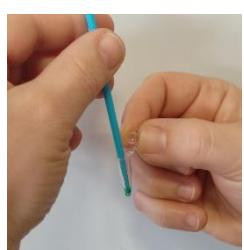


Figure 3

Fermer le microtube PCR.

Placer les tubes dans le thermocycleur

Sélectionner le programme **Modèle 1** et le lancer (**1h10 environ**)



Ecran thermocycleur : Placer le curseur sur [●] puis appuyer OK → [■] =cycle en cours

PHASE 2 : REVELATION



Electrophorèse

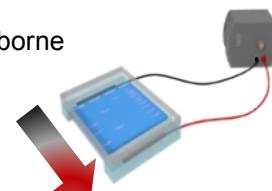
Préparation de l'ADN amplifié

- A faire pour chaque microtube : ouvrir délicatement le microtube et y ajouter 1,8 µL de la solution "DNA-Release" (tube à pastille ■)
Mélanger par pipetage doux



Préparation du dispositif pour électrophorèse

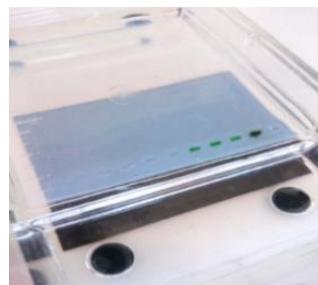
- Poser la cuve à électrophorèse sur une surface parfaitement horizontale
- Poser le gel dans son support à l'intérieur de la cuve, les puits vers la cathode (borne négative)
Glisser un morceau de papier noir sous la cuve
- Remplir la cuve de TAE 1X, jusqu'à légèrement recouvrir le gel de 1 à 2 millimètres



Dépôts et migration

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

- Déposer 8 à 10 µl du marqueur de Poids Moléculaire (« échelle moléculaire » du gel ■)
- ADN amplifié : Déposer 8 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 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