

Kit PCR Génotypage variation du gène de l'amélogénine

Le matériel :

- 1 Tube d'amorces 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

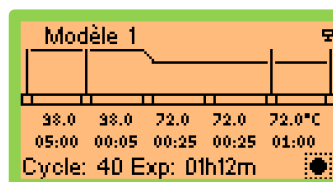


PHASE 1 : L'AMPLIFICATION

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 20 μ L du "PCR Master Mix" (■■■) et les placer dans le microtube PCR
2. Changer de pointe de micropipette
3. Prélever 20 μ L 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

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

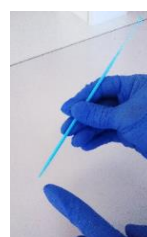


Figure 1



Figure 2

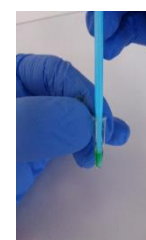


Figure 3



Figure 1



Figure 2

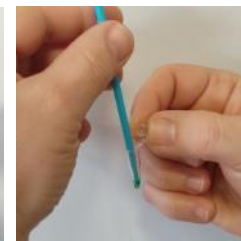


Figure 3

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

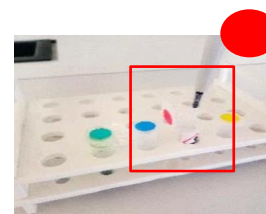
PHASE 2 : REVELATION



Electrophorèse

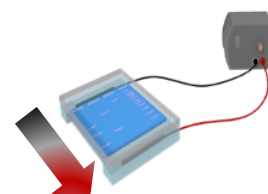
Préparation de l'ADN amplifié

- Pour chaque individu, nous avons 2 tubes (le témoin, le tube enzyme)
- 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

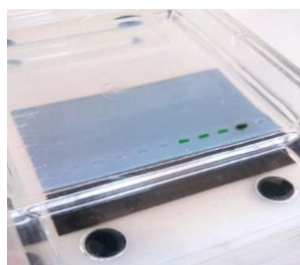
- Poser la cuve à électrophorèse sur une surface parfaitement horizontale
- Poser le gel dans son support à l'intérieur de la cuve, les puits vers la cathode (borne négative)
Glisser un morceau de papier noir sous la cuve
- Remplir la cuve de TAE 1X, jusqu'à légèrement recouvrir le gel de 1 à 2 millimètres



Dépôts et migration

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

- Déposer 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)
- Pour chaque individu, nous avons 2 microtubes PCR (le témoin, le tube « digéré »)
- 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